

Cytochrom Oxidase Blobs und Orientierungsselektivität
Eine funktional-anatomische Studie am primären visuellen
Kortex von Primaten

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Matthias Felipe Valverde Salzmann

aus Dortmund

Tübingen

2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

27.06.2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Almut Schüz

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Andreas Nieder

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. Mark Hübener

"With each trajectory Feynman associated two numbers, one for the size – the amplitude – of a wave and one for its phase – whether it is a crest or a trough. The probability of a particle going from A to B is found by adding up the waves associated with every possible path that passes through A and B."

Stephan Hawking über Richard Feynman's "Sum Over Histories", aus:
The Grand Design, Stephan Hawking and Leonard Mlodinow, Bantam
Books (2010), New York.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung:	3
1 Einleitung	4
1.1 Problem, Fragestellung, Ziel.....	4
1.2 Experimentelles Vorgehen und seine Darstellung.....	7
2 Reviews	9
2.1 Orientierungsselektivität	9
2.2 Pinwheels	11
2.3 Okuläre Dominanzkolumnen	12
2.4 Cytochrom Oxidase Blobs	14
2.5 ODK, Blobs und Orientierungspinwheels.....	17
2.6 Farbsehen und die retino-thalamo-kortikalen Informationspfade in Primaten.....	19
2.7 Das intrinsische Signal.....	23
2.8 Literatur Fazit	26
3 Methodik.....	27
3.1 Intrinsisches Optical-Imaging.....	27
3.2 Methodik der Datenverarbeitung.....	28
3.3 Problematik der Alignierung von funktionellen und anatomischen Daten	31
3.4 Elektrophysiologie.....	32
3.6 Besonderheiten des visuellen Systems von Weißbüschelaffen.....	35
4 Publikationen	39
4.1 Multimodal Vessel Mapping for Precise Large Area Alignment of Functional Optical Imaging Data to Neuroanatomical Preparations in Marmosets.....	39
4.2 Color Blobs in Cortical Areas V1 and V2 of the New World Monkey <i>Callithrix jacchus</i> , Revealed by Non-differential Optical Imaging.....	58
4.3 The Topology of Hemodynamic Responses to Orientation Stimuli in Orientation-Preference Pinwheels. An Optical Imaging Study in the Common Marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>).	73
5 Ergebnisse	99
5.1 Ergebnisse der Studie: <i>Multimodal Vessel Mapping for Precise Large Area Alignment</i>	99
5.2 Ergebnisse der Studie: <i>Color Blobs in Cortical Areas V1 and V2 of Marmosets</i>	101
5.3 Ergebnisse der Studie: <i>The Topology of Hemodynamic Responses to Orientation Stimuli in Orientation-Preference Pinwheels</i>	103
6 Diskussion.....	106

6.1 Diskussion der Ergebnisse der Studie: <i>Multimodal Vessel Mapping for Precise Large Area Alignment</i>	106
6.2 Diskussion der Ergebnisse der Studie: <i>Color Blobs in Cortical Areas V1 and V2 of Marmosets</i> .	107
6.3 Diskussion der Ergebnisse der Studie: <i>The Topology of Hemodynamic Responses to Orientation Stimuli in Orientation-Preference Pinwheels</i>	109
6.4 Diskussion Fazit	111
Eigenanteil an der Arbeit:	115
Literatur	118

Zusammenfassung:

Eine der herausragenden Eigenschaften des visuellen Kortex in Primaten ist seine ausgeprägte Tendenz zur Musterbildung, die sich in seiner anatomischen und funktionellen Struktur zeigt. Durch histologische Färbungen lässt sich diese Musterbildung auf anatomischer Ebene bei der Verteilung von Zelltypen, thalamischer Afferenzen, neurochemischer Gradienten und Blutgefäßdichten aufzeigen. Für die Darstellung der funktionellen Strukturen hat sich die Optical-Imaging-Technik hervor getan. Sie ermöglicht, topographische Karten von dem Verlauf funktioneller Bereiche wie etwa Okulärer Dominanzkolumnen (ODK) oder farb- und orientierungsselektiver Gewebereiche zu erstellen. Verschiedene Modelle sind in den letzten Jahrzehnten entwickelt worden, um die Informationsverarbeitungsmechanismen des visuellen Systems zu erklären und dabei die Topographie der funktionellen Strukturen mit anatomischen Strukturen wie z.B. den thalamischen Eingangsbereichen (z.B. Blob- und Zwischenblobbereiche) und darüber wiederum mit den verschiedenen Informationspfaden des visuellen Systems (Magno-, Parvo-, Koniopfade) in Übereinstimmung zu bringen. Solche Untersuchungen werden durch eine Reihe von methodischen Schwierigkeiten beeinträchtigt, die es notwendig machen, dass ein verlässlicher methodischer Ansatz genutzt wird, der die Genauigkeit des anatomisch-funktionellen Abgleichs in dem Maß gewährleistet, wie es die Größe der zu untersuchenden Strukturen erfordert.

Am Tiermodell *Callithrix jacchus* wurde von uns eine Stimulationsmethode entwickelt, die es ermöglicht, mittels der Optical-Imaging-Technik die Blobs *in vivo* darzustellen. Dadurch ist es möglich geworden, die Aktivierung von Blob- und Interblobbereichen in Weissbüschelaffen durch verschiedene visuelle Reize zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass Blobs in Weissbüschelaffen mit dem parvozellulären System assoziiert sind und durch Farbreize aktiviert werden. Diese Funde bestätigen frühere Daten, die an Makaken erhoben wurden, und lassen vermuten, dass die Blobs auch in Neuweltaffen spezielle funktionelle Bereiche für die Wahrnehmung von Farbe darstellen.

Um den verlässlichen Abgleich zwischen den funktionell dargestellten Blobs und ihren histologischen Gegenstücken durchführen zu können, wurde ein Alignierungsverfahren entwickelt, das eine 3D Rekonstruktion des geschnittenen Gewebes erlaubt und darüber einen präzisen Abgleich gewährleistet, der den Alignierungsfehler in bisherigen Studien um ~50% reduziert.

Des Weiteren wurde von uns ein Phänomen untersucht, das sich in den topographischen Orientierungskarten zeigt und das gemeinhin als "Pinwheels" bezeichnet wird. Dabei handelt es sich um eine spezielle Anordnung von orientierungsselektiven Bereichen um nulldimensionale Zentren herum. In Makaken korreliert das Vorkommen von Pinwheels mit dem Verlauf der ODK. Wir konnten zeigen, dass in Weissbüschelaffen, die keine ODK aufweisen, Pinwheelzentren grundsätzlich auf den Rändern von Orientierungskolumnen liegen. Dadurch konnten wir nachweisen, dass das intrinsische Signal in Pinwheelzentren eine ähnlich gute Auflösung der dort vorliegenden zellulären Kompartimentisierung bietet, wie es durch 2-Photonenmikroskop-Studien gezeigt wurde. Zudem ergaben sich Hinweise dafür, dass Pinwheelzentren durch spezielle Blutgefäßstrukturen gebildet werden.

1 Einleitung

1.1 Problem, Fragestellung, Ziel

Trotz jahrzehntelanger Forschung und einer großen Menge dabei gewonnener Daten und Erkenntnisse ranken sich um die Organisation des primären visuellen Kortex von Primaten eine Vielzahl von Rätseln über die Zusammenhänge von anatomisch gezeigten Strukturen und ihrer Einbindung in die funktionelle Arbeitsweise des visuellen Systems. Zweifellos gehört der primäre visuelle Kortex -auch als Brodman Area 17 oder V1 bezeichnet- zu den am besten untersuchten Arealen des Kortex. Durch eine Vielzahl von Besonderheiten bietet er seit den Anfängen der modernen Neurowissenschaften einen einzigartigen Ansatz, um die Abhängigkeit von Funktion und Anatomie von neuronalen Netzwerken zu untersuchen und damit die grundlegenden Prinzipien der Informationsverarbeitung im Kortex von Primaten zu verstehen.

Eine dieser Besonderheiten des primären visuellen Kortex in Primaten ist seine ausgeprägte Tendenz zur Musterbildung bei der Ausbildung von anatomischen und funktionellen Strukturen.

Durch eine Vielzahl von histologischen Färbetechniken zeigt sich diese Musterbildung auf anatomischer Ebene in Form einer ausgeprägten Kompartimentisierung bei der Verteilung von Zelltypen, thalamo-kortikalen Projektionen, metabolische Enzym-Gradienten und Blutgefäßverläufen.

Für die Darstellung der funktionellen Strukturen hat sich in den letzten 30 Jahren vor allem die Optical-Imaging-Technik hervorgetan. Die Optical-Imaging-Technik nutzt das haemodynamische Signal, um neuronale Aktivierung nachzuweisen. Sie ermöglicht, dadurch sehr präzise topographische Karten von der Verteilung und dem Verlauf funktioneller Bereiche zu erstellen (siehe Bild 1).

Beispielsweise lassen sich so die in Makaken besonders deutlich ausgeprägten Okulären Dominanzkolumnen (ODK) zeigen, die die Ebene von V1 in einer einem Fingerabdruck ähnelnden Weise in streifenförmige Bereiche unterteilen. Es wird vermutet, dass in diesen streifenförmigen Bereichen, die auch durch verschiedene histologische Verfahren gut darstellbar sind, die vom Thalamus eingehenden Informationen über das gesehene Bild des linken und des rechten Auges zunächst räumlich getrennt voneinander verarbeitet werden, um dann durch einen Abgleich der Unterschiede der gesehenen Bilder eine Raamtiefenwahrnehmung (Stereoperzeption) zu ermöglichen. In ähnlicher Weise durchzieht das fleckenartige Muster der Cytochrom Oxidase (CytOx) Blobs einem Lochraster gleich die Ebene von V1 und teilt sie auf in funktionelle Bereiche für Farbwahrnehmung und Orientierungsselektivität bzw. Richtungsselektivität.

Jedoch konnte weder für Blobs noch für die ODK bisher geklärt werden, welche neuronalen Mechanismen zu ihrer anatomischen Manifestation führen und auf welche Weise diese Mechanismen bei der Wahrnehmung z.B. von Farbe, Form und Bewegung beteiligt sind (Adams und Horton, 2009).

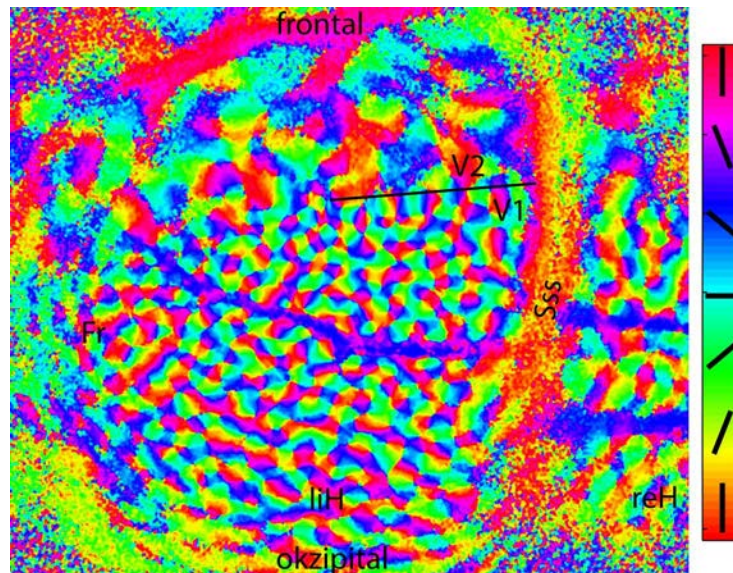


Bild 1. Funktionelle Organisation des visuellen Kortex. Zu sehen ist eine topographische Karte orientierungsselektiver Bereiche in V1 und V2 eines Weißbüschelaffen, aufgenommen mittels der Optical-Imaging-Technik. Die verschiedenen Orientierungspräferenzen sind farblich kodiert (rechte Tabelle). Sss = Sinus sagittalis superior; Fr = Bereich der fovealen Repräsentation.

Verschiedene Modelle und Theorien sind in den letzten Jahrzehnten entwickelt worden, um die Informationsverarbeitungsmechanismen des visuellen Systems zu erklären und die Daten der anatomischen und funktionellen Studien miteinander in Übereinstimmung zu bringen.

Letztere zeichnen vor allem ein recht genaues Bild der Informationsweiterleitung von der Retina zum Kortex. Bekannt ist, dass zumindest drei Hauptinformationspfade (M+L, M-L, S-[M+L]) existieren, die verschiedene Modalitäten des gesehenen Bildes (wie Farben sowie räumlich und zeitliche Auflösung) getrennt voneinander prozessieren und über verschiedene Bereiche (magno-, parvo- und koniozelluläre Schichten) des LGN im Thalamus an V1 weiterleiten. Dort werden die Blob- und Interblobbereiche der Eingangsschichten 2/3 und 4 unterschiedlich stark bzw. unterschiedlich direkt von den drei Pfadssystemen innerviert. Sicher scheint, dass Blobbereiche vor allem mit Farbwahrnehmung assoziiert sind und die Interblobbereiche mit der Wahrnehmung der Orientierung von Linien oder Kanten und deren Bewegungsrichtung. Diese Zusammenhänge sind bisher vor allem durch histologische Methoden (Tracerstudien und autoradiographische Verfahren) und elektrophysiologische Ableitungen an Makaken untersucht worden. Ebenfalls konnte durch die Optical-Imaging-Technik an Makaken die Assoziation von Blobs und Farbwahrnehmung, sowie von Interblobs und Orientierungsselektivität nachgewiesen werden (Sincich und Horton, 2005).

Zudem zeigt sich in einigen Studien am Makaken ein auffälliger Zusammenhang bei der räumlichen Anordnung zwischen Blobs, ODK und dem Verlauf orientierungsselektiver Bereiche. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde geschlussfolgert, dass es im visuellen Kortex grundlegende funktionelle Module gibt

die diese drei Strukturen miteinander verknüpfen und daraus das funktionelle Grundgerüst des visuellen Kortex konstituieren. Für andere Primatenarten fehlt bisher der Nachweis für solche Zusammenhänge.

So bleiben einige grundlegende Sachverhalte weiterhin unklar. Zum Beispiel das Phänomen der sogenannten Pinwheels, die sich in Optical-Imaging-Karten aus einer speziellen radiären Anordnung von orientierungsselektiven Bereichen um ein nulldimensionales Zentrum herum bilden. Sie gelten als Paradebeispiel für die funktionelle Organisation des visuellen Kortex. Jedoch konnten die funktionalen Pinwheels bisher weder einer anatomischen Struktur -durch die sie ausgebildet werden- zugeordnet werden, noch konnte bisher ein Nachweis für ihre Rolle bei der visuellen Wahrnehmung erbracht werden. Auch ist unklar, wie Pinwheels mit anderen Strukturen des visuellen Kortex wie den ODK, Blob- und Interblobbereichen oder den thalamo-kortikalen Projektionszonen in Zusammenhang stehen.

Die Untersuchung solcher Zusammenhänge wird vor allem durch eine Reihe von methodischen Schwierigkeiten beeinträchtigt, die sich bei dem Abgleich von anatomischen und funktionellen Daten ergeben.

Die histologische Aufbereitung des Gewebes für die Färbung der zu untersuchenden Strukturen bewirkt häufig eine Schrumpfung sowie weitergehende Verzerrung des Gewebes und dadurch der neuroarchitektonischen Verhältnisse. Für den Abgleich mit den funktionellen Daten müssen daher häufig Positionsmarker ins Gewebe eingebracht werden, um die aufgenommenen Signale mit eingeschränkter Genauigkeit den gefärbten neuronalen Strukturen zuzuordnen. Bisher gibt es keine Untersuchungsmethode, die alleine die erforderliche Darstellungsmöglichkeit bietet, um Funktion und zelluläre Architektur in einem einzelnen Ansatz aufzuzeichnen und die es dadurch ermöglicht, auf einen Abgleich von histologischen Präparaten mit den funktionellen Daten zu verzichten. Selbst mit der hochauflösenden 2-Photonen-Mikroskopie (2-PM) konnte das in dem erforderlichen Maße bisher nicht realisiert werden.

Tracerstudien und elektrophysiologische Ableitungen sind zudem mit einem großen zeitlichen Aufwand verbunden, um großflächige Kortexbereiche detailliert zu untersuchen. Zudem unterliegen sie dem Prinzip, das gerne als „die Nadel im Heuhaufen finden“ beschrieben wird. Durch Zellaufnahmen und Einzelzellaufnahmen lassen sich sehr genaue Darstellungen von den Eigenschaften exemplarischer Neuronenpopulationen erzielen. Jedoch bleibt immer offen, ob die nicht-abgeleiteten bzw. ungefärbten Nachbarneuronen nicht eventuell vollkommen andersartige Eigenschaften und Verknüpfungen aufweisen.

Die zeitliche und räumliche Auflösung der verschiedenen funktionellen Untersuchungsmethoden ist in unterschiedlichem Maße und auf unterschiedliche Weise eingeschränkt. Bildgebende Ansätze wie Optical-Imaging und funktionelle Kernspinuntersuchungen bieten eine bessere Darstellung großflächiger neuronaler Aktivierungsmuster, erlauben jedoch kaum ihre Korrelation mit einzelnen Neuronen oder kleineren Neuronenpopulationen. In jedem Fall ist für die Untersuchung eines bestimmten Aspekts des Zusammenhangs von neuronaler Architektur und der funktionellen Organisation des Kortex ein verlässlicher kombinatorischer Ansatz unabdingbar, der die Genauigkeit des jeweiligen Abgleichs in dem

Maße gewährleistet, wie es die zu untersuchenden Strukturen erfordern (Horton und Adams, 2005; Adams und Horton, 2009).

Ziel dieser Arbeit war es, den Aufbau eines tierexperimentellen Forschungsprojektes durchzuführen, die dafür notwendigen theoretischen und methodischen Grundlagen zu schaffen, um anschließend, die komplexen räumlichen und funktional-anatomischen Zusammenhänge der ODK, Blobs sowie Orientierungsselektivität und Farbwahrnehmung am Tiermodell *Callithrix jacchus* langfristig und im Detail zu untersuchen.

1.2 Experimentelles Vorgehen und seine Darstellung

In einem ersten Schritt war geplant, Weißbüschelaffen (lat. *Callithrix jacchus*) als eine weitere Primatenspezies in der Arbeitsgruppe für Kognitive Neurowissenschaft des Max Planck Instituts für biologische Kybernetik einzuführen und als neues Tiermodell für verschiedene funktionelle und histologische Untersuchungsmethoden zu etablieren.

Weißbüschelaffen zeichnen sich dadurch aus, dass ein geschlechtsgekoppelter Polymorphismus die Population in farbenblinde (Rot-Grün blind) und voll farbsichtige Individuen unterteilt. Daher eignen sie sich in besonderer Weise für die Untersuchung der Informationspfade des visuellen Systems von Primaten, die bei der Wahrnehmung von Farbe und Orientierungen beteiligt sind.

Die Etablierung umfasste den Aufbau einer Krallenaffenhaltung mit bis zu 90 Tieren. Zudem sollte dann die Entwicklung spezifischer Protokolle zur medizinischen Behandlung, Langzeitnarkose sowie Methoden zu Refraktion der Augen und Justierung des visuellen Fokus auf einen Stimulusbildschirm für die Krallenaffen erfolgen (siehe Bild 2).

In einem zweiten Schritt sollte der Aufbau eines neuen Labors für funktionelle Untersuchungen an Weißbüschelaffen durchgeführt werden. Insbesondere die bis *dato* nicht an dem Institut angewandte Optical-Imaging-Technik sollte etabliert werden, um Untersuchungen zur Organisation der Orientierungsselektivität wie des Phänomens der Pinwheels zu ermöglichen. Ebenso sollte ein elektrophysiologisches Setup in dem Labor installiert werden, um die Daten, die durch die Optical-Imaging-Technik gewonnen wurden, durch eine zweite funktionelle Methode validieren und vergleichen zu können. Die Elektrophysiologie war vor allem eingeplant um die Lokalisation von farbspezifischen bzw. nicht orientierungsselektiven Neuronenpopulationen durchführen zu können, wie sie in früheren Studien (z.B. Livingstone und Hubel, 1984) in den Blobs von Makaken nachgewiesen worden sind.

Drittens sollte mittels funktioneller Untersuchungstechniken die räumlichen Verteilung von orientierungsselektiven und farbselektiven Bereichen innerhalb des primären visuellen Areals V1 von Weißbüschelaffen dargestellt werden. Im Speziellen zielten diese Untersuchungen auf die Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Ausprägung der Topographie der Orientierungsselektivität und dem Verlauf der thalamo-kortikalen Eingangsbereiche wie der CytOx-Blobs ab. Ebenso war es dafür wichtig, eine Methode zu finden, mit welcher Blobs *in vivo* dargestellt werden können (was bis zu diesem Zeitpunkt in Weißbüschelaffen nicht möglich gewesen war), um in einem mono-methodischen Ansatz

die räumlichen Zusammenhänge von Blobs und ODK sowie Orientierungsselektivität und Farbselektivität untersuchen zu können. Dazu war es erforderlich, verschiedene visuelle Stimulationsprotokolle auszutesten und weiterzuentwickeln, die im Gegensatz zu den bisherigen Stimulusprotokollen, die nur in Makaken eine verlässliche *in vivo* Darstellung ermöglichten, auch in Krallenaffen die Darstellung der Blobs durch eine funktionelle Methode erlaubten.

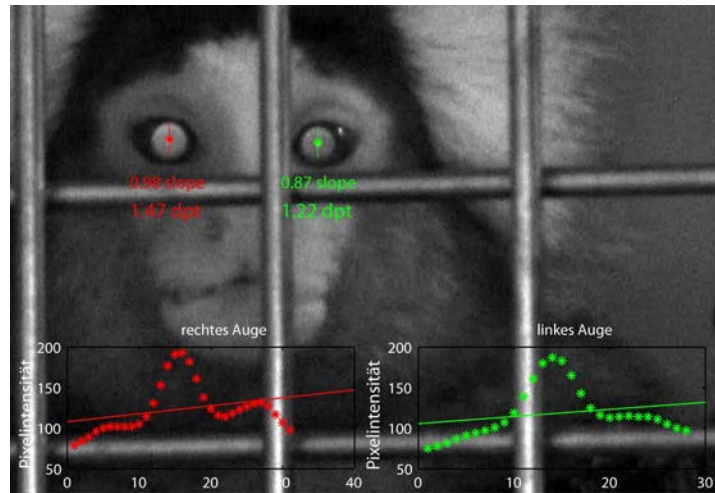


Bild 2. Infrarot-Refraktion am wachen Weißbüschelaffen nach Troilo et al. (2007) und Schaeffel et al. (1994). Bei der Messung fokussierte das Tier eine angebotene Futter-Heuschrecke in ~0.8 Meter Entfernung vom Käfiggitter. Anhand des Verlaufs der Lichtreflexion (*slope*) im Auge kann auf den Brechungsindex des Auges (Dioptrien, dpt) und damit auf seine Brennweite geschlossen werden. Über spezielle Kontaktlinsen kann so der Fokus des Tieres während eines Experiments unter Narkose (Muskelrelaxation) auf den Stimulusbildschirm eingestellt werden.

In den folgenden Kapiteln 2.1 bis 2.8 werde ich durch *Reviews* einen detaillierteren Einblick in die theoretischen Hintergründe und Problematiken geben, die die jeweiligen Gebiete bestimmen. Gleichzeitig bieten diese Kapitel - unter Einbeziehung der hier vorgestellten Arbeiten - eine Zusammenfassung und Sammlung der wichtigsten Erkenntnisse, Techniken und Publikationen, die als Grundlage bei der Fortführung dieses Projektes relevant sind.

Zudem wird in einem weiteren Abschnitt (Kapitel 3) das Funktionsprinzip der hier verwendeten Methodiken näher dargelegt.

In den darauf folgenden Kapiteln 4.1, 4.2 und 4.3 werden die Arbeiten präsentiert, die die Ansatzpunkte darstellen, welche für meine Promotionsarbeit gewählt wurden, um die funktionelle Organisation des visuellen Kortex am Tiermodell *Callithrix jacchus* zu untersuchen.

Dabei handelt es sich zum einen (Kapitel 4.1) um die Entwicklung eines methodischen Protokolls, das eine größere Sicherheit bei der Alignierung von funktionellen und histologischen Daten gewährleistet und zudem eine Einschätzung der methodischen Fehler erlaubt, die in solchen Alignierungen auftreten.

Zum anderen (Kapitel 4.2) werden Ergebnisse von Untersuchungen der Farbwahrnehmung von Krallenaffen vorgestellt, die durch die Entwicklung eines visuellen Stimulusprotokolls ermöglicht wurden, durch das sich die Blobs mittels der Optical-Imaging-Technik *in vivo* darstellen lassen.

Als Drittes (Kapitel 4.3) werden die Ergebnisse einer Untersuchung vorgestellt, die dadurch motiviert war, die räumlichen Zusammenhänge zwischen Pinwheels und ODK zu klären. Dabei ergab sich aus den gewonnenen Daten - beeinflusst durch die Verwendung von Blutgefäßfärbungen zur Alignierung der funktionellen und histologischen Daten - ein Ansatz, um die Ausbildung von Pinwheels aufgrund der Architektur des Blutgefäßsystems zu erklären.

Im Anschluss (Kapitel 5.1, 5.2, 5.3) erfolgt eine Darstellung der wichtigsten Ergebnisse der einzelnen Arbeiten sowie eine Diskussion (Kapitel 6.1, 6.2, 6.3) der selbigen.

In einem abschließenden Fazit (Kapitel 6.4) wird zudem die Einbindung der drei Arbeiten in den Stand der Forschung diskutiert.

Mein Eigenanteil zu den vorliegenden Studien ist im Anschluss an das Kapitel 6 tabellarisch aufgeführt.

2 Reviews

2.1 Orientierungsselektivität

"When a micro-electrode penetrates through the cortex in a direction perpendicular to the surface, recording from many cells in sequence, the optimal orientation of a stationary or moving short-line stimulus tends to be virtually constant...[.]...In a tangential or oblique penetration the optimal orientation ...[.]...changes systematically in a clockwise or counter-clockwise direction..."

(aus: Anatomical Demonstration of Orientation Columns in Macaque Monkey, Hubel et al. (1978))

Seit der Mitte des 19. Jahrhunderts ist eine Vielzahl von funktionalen und anatomischen Studien speziell am primären visuellen Kortex von Primaten und anderen Säugetieren durchgeführt worden, um die Funktionsprinzipien des Kortex zu untersuchen. Schon um die 1950er Jahre war in Pionierarbeiten vor allem von David Hubel und Thorsten Wiesel (Hubel und Wiesel, 1977) mittels elektrophysiologischer Untersuchungen festgestellt worden, dass im primären visuellen Kortex Nervenzellen sehr gezielt durch einfache visuelle Reize aktiviert werden können, und dass das Antwortverhalten der abgeleiteten Zellen spezifische Eigenschaften der visuellen Reize kodierte. In den ersten Experimenten - die zuerst an Katzen (Hubel und Wiesel, 1962) und Makaken (Hubel und Wiesel, 1968) durchgeführt wurden- zeigte sich, dass die meisten Zellen in V1 vor allem durch einfache geometrische Muster wie z.B. bewegte Strichmuster

aktiviert wurden, und dass die Stärke der neuronalen Aktivität mit der Ausrichtung der Striche zusammenhing. Diese Zellen zeigten sich demnach selektiv für die Orientierung der Striche des Reizmusters. Zudem zeigte sich, dass die meisten der abgeleiteten Neuronen in V1 eine individuelle Präferenz für eine spezielle Orientierung eines Reizes hatten, auf die sie mit besonders starker Aktivität in Form von Aktionspotentialen reagierten, und dass anders orientierte Reize zu einer wesentlich geringeren Aktivierung der selben Neuronen führten.

Um die Organisation der orientierungsselektiven Neuronen zu untersuchen, trieben Hubel und Wiesel ihre Elektroden parallel zu den Schichten des Kortex in Schritten von 25-50 μm durch das neuronale Gewebe von V1 und zeichneten dabei über Strecken von bis zu mehreren (4-5) Millimetern Länge die Orientierungspräferenz der abgeleiteten Neuronen auf. Es zeigte sich, dass die Präferenz der Neuronen sich dabei über weite Bereiche der Ableitpfade kontinuierlich änderte (durchschnittlich fand eine Änderung von 13°Grad pro 20 μm statt), wobei sich jede Präferenz durchschnittlich in Abständen von ~450-570 μm in Primaten (Hubel et al., 1978) und ~700-1200 μm in Katzen (Albus, 1975) wiederholte. Zwischendurch jedoch kamen immer wieder unerwartete Sprünge in der Abfolge der Präferenz vor (Hubel und Wiesel, 1977). Hingegen zeigten Ableitungen entlang der vertikalen Achse der Schichten - also in Penetrationen senkrecht zur Kortexoberfläche -, dass die Orientierungs-Präferenz der Neuronen über alle Schichten hinweg gleich blieb. Durch diese gleich bleibende Anordnung der Orientierungspräferenz entlang der vertikalen Achse wurde der Begriff der Orientierungs-"Kolumne" geprägt (Mountcastle, 1957; Hubel und Wiesel, 1962; Mountcastle, 1979; für einen ausführlichen *Review* diesbezüglich siehe Horton und Adams, 2005).

In einer späteren Studie versuchte Nicholas V. Swindale (Swindale et al., 1987), das volle Ausmaß der Regelmäßigkeit der Organisation darzustellen, um die Sprünge in der Abfolge der Orientierungspräferenz zu untersuchen. Dazu verwendeten Swindale et al. eine Vielzahl von senkrechten Elektrodenpenetrationen, die in einem engen Raster gestochen wurden und so erlaubten die Orientierungspräferenz der Zellen innerhalb eines mehrere Quadrat-Millimeter großen Bereiches zu kartieren. Die daraus resultierenden topographischen Karten wurden anschließend farbkodiert, wobei jeder Orientierungspräferenz eine individuelle Farbe zugeordnet wurde. Durch diese Art der farbkodierten Orientierungskarte wurde zum ersten Mal die funktionelle Organisation der Orientierungsselektivität in V1 auf eine Weise dargestellt wie sie auch in späteren methodologischen Untersuchungsansätzen wie Optical-Imaging, 2-PM und funktionellen Magnet-Resonanz-Tomographie-(fMRT) -Studien als Standard-Darstellungsform Verwendung finden sollte.

Trotz mehr als 40 Jahren Forschung ist die Entstehung dieser Topographie der Orientierungspräferenz bis heute ein Rätsel, vor allem da sie nicht eine generelle Eigenschaft des Kortex von Säugetieren darstellt, sondern nur bei einigen Säugern vorhanden ist (siehe Van Hooser (2005) für eine Auflistung der Arten, sowie Weinberg (1997)) und in anderen Arten wie z.B. Mäusen und Ratten trotz des Vorhandenseins von orientierungsselektiven Neuronen in V1 fehlt (Ohki et al., 2005; Van Hooser et al., 2005).

2.2 Pinwheels

"The pinwheel pattern of orientation tuning columns in visual cortex, ...[]... is arguably the single most widely recognized icon of cortical functional architecture. This pattern represents the spatial layout of neurons in visual cortex responsive to oriented visual stimuli..."

(aus: Physical Limits to Spatial Resolution of Optical Recording: Clarifying the Spatial Structure of Cortical Hypercolumns, Polimeni et al. (2008))

In den farbkodierten Orientierungskarten von Swindale et al. (1982), zeigte sich zum ersten Mal der Grund für die Sprünge in der ansonsten kontinuierlichen Abfolge der Orientierungspräferenz. In regelmäßigen Abständen verteilt, finden sich sogenannte Singularitäten in der Karte, punktuelle Bereiche, um die herum sich die Orientierungspräferenz kontinuierlich ändert und die wegen ihrer scheinbaren Ähnlichkeit mit einem bunten Kinderspielzeug-Windrad später als Pinwheels bezeichnet werden (Bonhoeffer und Grinvald, 1991). Die Zentren der Pinwheels wurden eine Zeit lang als Bereiche angesehen, in denen die Neuronen keine oder nur eine schwache Orientierungspräferenz haben und es deshalb zu einer räumlichen engen Ansammlung von verschiedenen Präferenzen kommt. Pinwheels wurden in den darauffolgenden Jahren durch verschiedene Methoden gezeigt und untersucht. Am populärsten ist die Darstellung der pinwheelartigen Organisation der Orientierungsselektivität durch die Optical-Imaging-Technik geworden (siehe Bild 1). Aber auch in 2-PM Studien (Ohki et al., 2006) und fMRT-Studien (Fukuda et al., 2006; Yacoub et al., 2008) konnten pinwheelartige Organisationen der Orientierungsselektivität in verschiedenen Spezies und auch im Menschen gezeigt werden. Doch trotz zahlreicher Studien, in denen z.B. gezielte Elektrodenableitungen in Pinwheelzentren durchgeführt wurden (Maldonado et al., 1997) oder die Darstellung von Pinwheels auf zellulärem Niveau durch die hochauflösende 2-Photon-Mikroskopie erreicht wurde (Ohki et al., 2006), konnte bisher kein anatomisches Korrelat für Pinwheels oder Pinwheelzentren gefunden werden, das Aufschluss darüber geben könnte, welche Rolle Pinwheels in der funktionellen Organisation des Kortex spielen. So wurde schon früh darüber spekuliert, ob Pinwheels sich allein aus einer speziellen Anordnung der orientierungsselektiven Bereiche ergeben (Swindale, 1982; Goetz, 1987) bzw. ob sich in Pinwheels die Notwendigkeit kortikaler Organisation widerspiegelt, eine homogene Verteilung von verschiedenen Eigenschaftstopographien in räumliche Übereinstimmung zu bringen (Swindale, 1991; Swindale, 2000; Swindale et al., 2000). Manche Studien zeigen, dass Pinwheels nicht zwangsläufig auf anatomischen Strukturen basieren müssen, sondern auch aus den verwendeten Darstellungstechniken und der Datenbearbeitungsmethoden resultieren können. So zeigten Polimeni et al. (2005), dass allein durch die herkömmlichen Datenfilterungsprozesse, die bei der Datenverarbeitung in der Optical-Imaging-Technik angewandt werden, die Häufigkeit von Pinwheels in Orientierungskarten signifikant beeinflusst werden kann. Durch die gleichen Datenfilterungsprozesse, angewandt auf künstliche Bilddaten, die lediglich aus weißem Rauschen bestanden, ließen sich Pinwheelstrukturen konstruieren, deren Erscheinungsbild denen gleicht die in tierexperimentellen Orientierungskarten gefunden werden. Demgegenüber stehen jedoch die Untersuchungen von Ohki et al. (2006), die mittels 2-PM zeigen konnten, dass Populationen von Zellen, die für verschiedene Orientierungen selektiv sind, in Pinwheelzentren einer sehr strikten

räumlichen Trennung unterliegen und damit die selbe Anordnung widerspiegeln, wie sie durch die Optical-Imaging-Technik dargestellt wird.

Interessant in diesem Zusammenhang sind Ergebnisse einer Studie zur neuronalen Plastizität in adulten Katzen von Godde et al. (2002), die zeigen konnten, dass sich die Topographie der Orientierungspräferenzen und damit die Position und Anzahl von Pinwheels durch äußere Einflüsse (wie z.B. durch Mikrostimulation mit Elektroden) verändern lässt.

Doch auch in anderen Arealen des Kortex findet sich eine pinwheelartige Organisation von funktionellen Kolumnen. So können Pinwheels auch im auditorischen Kortex von Ratten (Kalatsky et al., 2005) und Frettchen (Nelken et al., 2008) gefunden werden sowie in visuellen Arealen V2 und V4 von Primaten (Xu et al., 2004; Tanigawa et al., 2010). Ebenso erwähnenswert in diesem Zusammenhang sind Orientierungspräferenz-Pinwheels im auditorischen Kortex von Frettchen (Sharma et al., 2000), bei denen die retinalen Afferenzen zu visuellen Bereichen des Thalamus in den auditorischen Thalamus umgeleitet wurden (Roe et al., 1990). Sogar im visuellen Wulst der Schleiereule sind Orientierungspräferenz-Pinwheels gefunden worden (Liu und Pettigrew, 2003). Zusammengenommen lässt dies vermuten, dass es sich bei Pinwheels - so es sich denn überhaupt um funktionslose Artefakte handeln sollte - zumindest nicht um extrinsisch induzierte Artefakte handelt, sondern ihre Ausbildung durch die intrinsische Organisation von funktionellen Kolumnen bedingt wird und sie damit ein generelles Organisationsprinzip neuronaler Strukturen des Gehirns von Wirbeltieren widerspiegeln.

2.3 Okuläre Dominanzkolumnen

"Probably the overarching challenge is to explain the function, if any, of ocular dominance columns and why they are present in some species and not others. A satisfactory solution must account for the enormous natural variation, even within the same species, among individuals in column expression, pattern, periodicity, and alignment with other components of the functional architecture..."

(aus: *Ocular Dominance Columns: Enigmas and Challenges*, Adams und Horton (2005))

1965 veröffentlichten Hubel und Wiesel Ergebnisse ihrer elektrophysiologischen Experimente in Katzen, bei denen sie separat beiden Augen der Versuchstiere visuelle Stimuli präsentiert hatten (Hubel und Wiesel, 1965). Sie konnten zeigen, dass die abgeleiteten Zellen eine individuelle Präferenz für eines der beiden Augen aufwiesen, also stärker auf die Reizung des einen Auges reagierten als auf die Reizung des anderen Auges. Diese Eigenschaft, später auch in Makaken nachgewiesen, wurde von ihnen als okuläre Dominanz bezeichnet. Zudem zeigte sich, dass Zellen mit einer gemeinsamen okulären Präferenz in streifenförmigen Bereichen angeordnet waren, und dass die Streifen mit einer Präferenz für das eine Auge alternierend neben den Streifen des anderen Auges angeordnet sind. Da die okuläre Dominanz der V1 Zellen sich wie die Orientierungsselektivität konsistent entlang der vertikalen Achse der Kortexschichten verhält, sich aber in der horizontalen Ebene kontinuierlich ändert, wurde auf diese eher streifenförmigen Bereiche ebenfalls der Kolumnenbegriff angewandt und das durch sie gebildete Muster

als Okuläre Dominanzkolumnen bezeichnet. Die durchschnittliche Breite einer einzelnen Kolumne in Makaken wird in frühen Studien mit $\sim 0.3-0.5$ mm angegeben (Wiesel et al., 1974, Hubel et al., 1978, LeVay et al., 1985). Durch invasive Techniken wie der Injektion von radioaktiven Tracern wie z.B. [^3H] Prolin in eines der Augen (Wiesel et al., 1974), oder der chirurgischen Entfernung eines Auges mit anschließender Färbung des Kortex gegen das Enzym Cytochrom-c-Oxidase (Wong-Riley, 1979) (ein metabolischer Marker für neuronale Aktivität) ließen sich ODK in der Schicht 4C von V1 auf anatomische Weise darstellen. Mittels dieser Techniken zeigte sich in Katzen und Makaken, dass die Kolumnen in einer fingerabdruckartigen Weise die gesamte Fläche von V1 aufteilen (siehe Bild 24. Seite 35 in Hubel und Wiesel, 1977; oder LeVay et al., 1985). Vor allem durch die Ergebnisse der Tracerinjektionen (Wiesel et al., 1974), aber auch durch Läsionen in dem V1 vorgeschalteten LGN (die ebenfalls zur Ausbildung von ODK führten), verfestigte sich die Vermutung, dass die okuläre Präferenz von Zellen und ihre modulare Anordnung in ODK mit der Verteilung der Eingangsfasern aus dem LGN in V1 zusammenhängt die visuelle Informationen aus der Retina des Auges in den visuellen Kortex leiten.

Das Vorhandensein von ODK konnte in Folge bei einer Reihe von weiteren Säugetierarten nachgewiesen und für andere ausgeschlossen werden. Der Großteil der über ODK verfügenden Arten gehörte zur der Gruppe der Primaten. Vor allem solche Tiere, die über nach vorne gerichtete Augen verfügen und dadurch stark überlappende Gesichtsfelder haben, scheinen über ODK zu verfügen. Daher wird vermutet, dass die räumliche Trennung der okulären Präferenz im Kortex die Basis für stereoskopisches Sehen bildet (siehe Review von Adams und Horton (2009)).

Durch mehrere Studien, die vor allem von Jonathan C. Horton und seiner Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, zeigte sich jedoch, dass ein strikter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ODK und okulärer Präferenz von Zellen nicht gegeben ist und dass die Ausbildung der ODK innerhalb einer Art einer starken Variabilität unterliegt. So fanden sie in Untersuchungen an Makaken, dass die räumliche Frequenz der ODK in manchen Tieren um den Faktor 2 höher ist als in anderen Tieren (Horton und Hocking, 1996).

In Totenkopffaffen konnten sie zeigen, dass neben Individuen die ein regelmäßiges ODK Muster aufweisen auch Individuen vorkommen, bei denen keine ODK vorkommen, oder ODK nur in Teilbereichen von V1 ausgebildet werden. Auch in den Tieren in denen keine ODK Muster nachweisbar sind, finden sie Zellen in V1 die eine okuläre Präferenz aufweisen. Sie sind dort aber scheinbar zufällig verteilt (Adams und Horton, 2006). Es ist deshalb weitgehend ungewiss, welche Funktion ODK im visuellen Kortex einnehmen (Adams und Horton, 2009).

Zusätzlich zu den anatomischen und elektrophysiologischen Methoden gelang es um 1990 herum erstmals, ODK durch nichtinvasive bildgebende Verfahren darzustellen. Zuerst durch die Optical-Imaging-Technik (Blasdel, 1992), später durch fMRT (Goodyear und Menon, 2001), ließen sich ODK nun auch *in vivo* darstellen. Bei diesen Verfahren werden in der Regel jedem Auge separat visuellen Reize (meistens mehrere verschieden orientierte Strichmuster) vorgespielt und die dadurch in V1 erzeugte neuronale Aktivität aufgezeichnet. Anschließend berechnet man die Differenz der räumlichen Aktivitätsverteilungen beider Augen und erhält dadurch eine topographische Karte des Verlaufs der ODK (Obermayer und Blasdel, 1993).

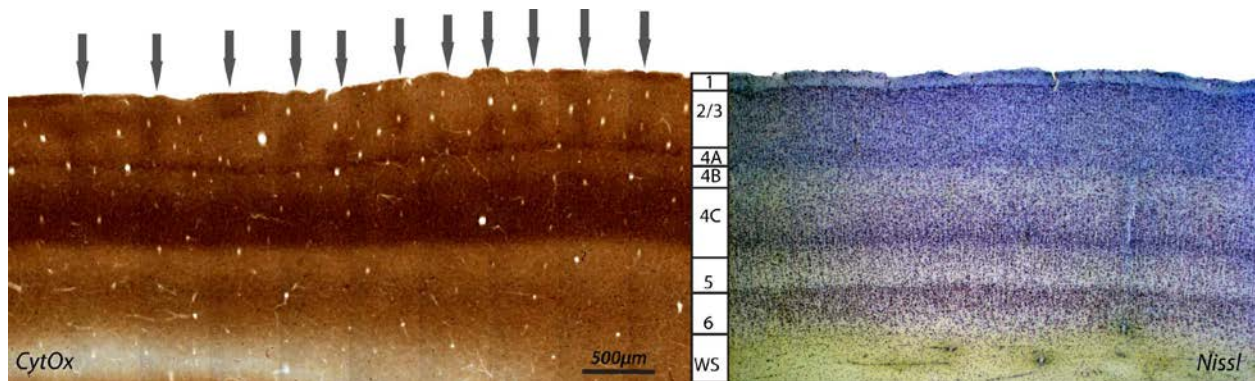


Bild 3. Kortexschichtung im vertikalen Schnitt durch V1 vom Weißbüschelaffen im Vergleich. Links: CytOx-Färbung (Blob-Positionen durch Pfeile markiert). Mitte: Schichteinteilung. WS= weiße Substanz. Rechts: klassische Nisslfärbung.

2.4 Cytochrom Oxidase Blobs

"Whether described as patches, puffs, or blobs, their structure is columnar, spanning the entire cortex from pia to white matter,..."

(aus: *Ocular Dominance Columns: Enigmas and Challenges*, Adams und Horton (2005))

Um 1979 wurde von Margaret T. Wong-Riley eine histochemische Methode aufgezeigt, mit der sie chronische Inaktivität von neuronalem Gewebe im visuellen Kortex von Katzen *post mortem* zeigen konnte, denen zu Lebzeiten ein einzelnes Auge entfernt oder verschlossen worden war (Wong-Riley, 1979). Sie nutzte dazu eine Färbereaktion, mit der sowohl die Aktivität als auch die Verteilungsdichte eines mitochondrialen Membranproteins - das Enzym Cytochrom-c-Oxidase - noch innerhalb der ersten Tage nach Probenentnahme dargestellt werden kann. Cytochrom-c-Oxidase ist ein wesentlicher Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette in Neuronen, so dass aus der Dichte des Färbeproduktes auf die Enzymaktivität geschlossen werden kann und sich damit indirekt auch das *praemortale*, chronische Aktivitätsniveau in neuronalem Gewebe darstellen lässt (Hevner und Wong-Riley, 1989).

Als Horton und Hubel (1981) diese Methode auf Gewebepreparate des visuellen Kortex von unbehandelten Makaken anwandten, zeigte sich eine unerwartet unregelmäßige Färbung in V1 (siehe Bild 3). In den oberen Schichten 2 und 3 war ein Muster aus regelmäßig über die Fläche von V1 verteilten fleckartigen Bereichen erhöhter Enzymdichte ausgebildet. Von solchen fleckartigen Bereichen war schon 1977 in mehreren [³H]Prolin Injektions-Studien berichtet worden, sie wurden damals jedoch mit okulärer Dominanz in Verbindung gebracht (Hubel, 1986). Nachdem klar war, dass das Fleckmuster ein eigenständiges Phänomen darstellt, wurden die Flecken später als Cytochrom Oxidase -"Blobs" oder auch als "Patches" bezeichnet. CytOx-Blobs zeigen in Makaken in der Regel einen Durchmesser ca. 150-200µm, in Katzen ca. 250-300µm Durchmesser (Murphy et al., 1995) und liegen in regelmäßigen Abständen von ca. 250-550µm (Makake) bzw. 475-760µm (Katze) zueinander verteilt (Wong-Riley, 1979;

Horton und Hubel, 1981; Hubel, 1986). Die schwächer CytOx-reaktiven Bereiche zwischen den Blobs werden gemeinhin als Interblobbereiche bezeichnet. In darauffolgenden histochemischen Studien konnte gezeigt werden, dass Blobs (Livingstone und Hubel, 1982) wie Orientierungsselektivität und okuläre Dominanz einen kolumnenartigen Verlauf haben und sich von der *Pia mater* bis zur unteren Schicht 6 hin erstrecken. Damit bildeten sie, neben den Orientierungskolumnen und ODK das dritte Kolumnensystem im primären visuellen Kortex.

CytOx-Blobs wurden bislang nur in Primaten und Katzen (Murphy *et al.*, 1995) gefunden (siehe auch Bild 4). Kurz nach ihrer Entdeckung machten Livingstone und Hubel (1982) elektrophysiologische Ableitungen in den Blobs und konnten zeigen, dass Blob-Neuronen weniger orientierungsselektiv sind, als es ihre Nachbarn in den Interblobbereichen sind, okuläre Präferenz aufweisen, und dass in Blobs ein Großteil der Zellen spezifisch auf Farbreize reagiert - also farbbelektiv ist.

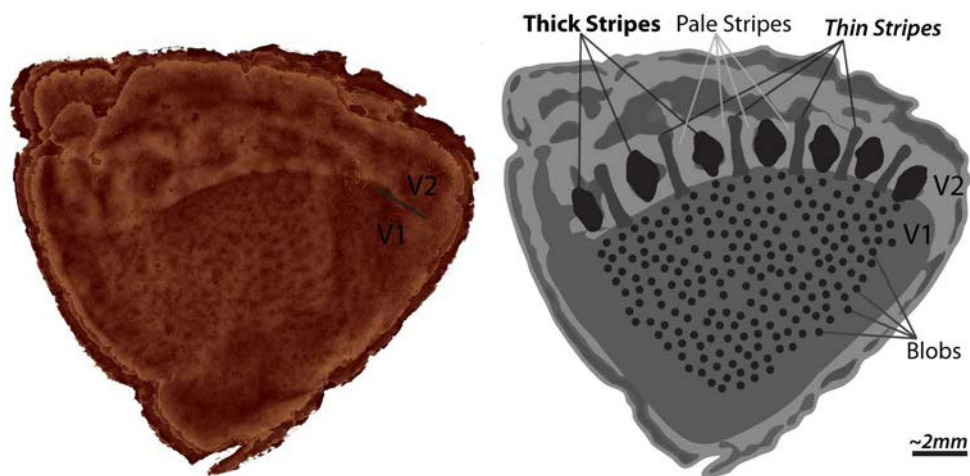


Bild 4. CytOx-Färbemuster in Schicht 2/3 von V1 und V2 beim Weißbüschelaffen. Links: histologisches Flatmount-Präparat. Rechts: Schematische Darstellung des Färbemusters.

Durch ein autoradiographisches Verfahren gelang es Tootell und Hamilton (1989), die von Livingstone und Hubel gefundenen Ergebnisse zu bestätigen. Bei diesem Verfahren wird einem Versuchstier radioaktiv markierte 2-Deoxy-D-Glukose (DG) als Substitut für die, im Stoffwechsel natürlich vorkommende, Glukose verabreicht. Da Nervenzellen bei Aktivität Glukose zur erhöhten Energiebereitstellung verstoffwechseln (Glykolyse), lassen sich durch diese Technik -im Gegensatz zur CytOx-Färbung - auch Bereiche im Gewebe markieren, die nur für eine kurze Zeit *ante mortem* aktiviert wurden. Als Farbstimuli verwendete er Gegenfarbenpaare (Rot/Grün, Blau/Gelb, Schwarz/Weiß) oder Einzelfarbreize (Rot/Grau, Grün/Grau, Gelb/Grau, Blau/Grau), die er den Tieren als Flickerstimulus (mit unterschiedlichen Flickerfrequenzen von 0.5 - 10Hz) auf einem Bildschirm zeigte. Indem er verschiedene Gegenfarbenpaare über den Stimulusbildschirm verteilt anordnete, konnte er die unterschiedlichen Aktivierungsstärken und Aktivierungsmuster, die in V1 durch die verschiedenen Farbstimuli erzeugt

wurden, gemeinsam in einem einzelnen Gewebepreparaten darstellen. Diese Versuche zeigten nicht nur, dass Blobsneurone durch Farben aktiviert werden. Sie zeigten auch, dass durch Orientierungsreize vor allem die Interblobbereiche aktiviert wurden.

Ähnliche Ergebnisse konnten durch die Optical-Imaging-Technik erzielt werden (siehe auch Bild 5). Allerdings zeigte sich diese Technik bisher weit weniger sensitiv als die 2-DG-Technik. Um die Blobs durch Optical-Imaging darzustellen, verwenden Lu und Roe (2008) und Landisman und Ts'O (2002) bewegte Gitterreize (ähnlich den Orientierungsreizen), die aus abwechselnd roten und grünen Linien bestanden. Da jedoch durch die Linien der Gitterreize zusätzlich zu der farbspezifischen Reizantwort auch eine orientierungselektive Reizantwort im Kortex ausgelöst wird, musste von dem, durch die Farb-gitterreize erhaltenen Aktivitätsmuster durch ein Differenzverfahren noch das, durch farblose (also schwarz-weiße = achromatische) Gitterreize der gleichen Orientierung erhaltene, Aktivitätsmuster abgezogen werden, um die schwache farbspezifische Reizantwort der Blobs zu isolieren. Durch andere Farb-reize als die Rot/Grün Strichmuster konnten die Blobs mit dieser Technik jedoch nicht zuverlässig dargestellt werden.

Zusätzlich zu dem Vorkommen von farbselektiven Zellen weisen Blobs eine Reihe weiterer Besonderheiten auf, die sie von den Interblobbereichen unterscheiden. So zeigen beide Bereiche zum Beispiel Unterschiede in immunhistologischen Färbungen gegen die Kalziumbindenden-Proteine Calbindin oder Parvalbumin (Johnson und Casagrande, 1995).

Aber auch eine erhöhte Blutgefäßdichte (Kapillarlängen in der horizontalen Ebene) (Keller et al., 2011), die auch in den anderen Schichten mit der Dichte des CytOx-Färbemusters korreliert, konnte in den Blobs nachgewiesen werden. Jedoch ist es bisher nicht gelungen, Blobs mittels fMRT darzustellen.

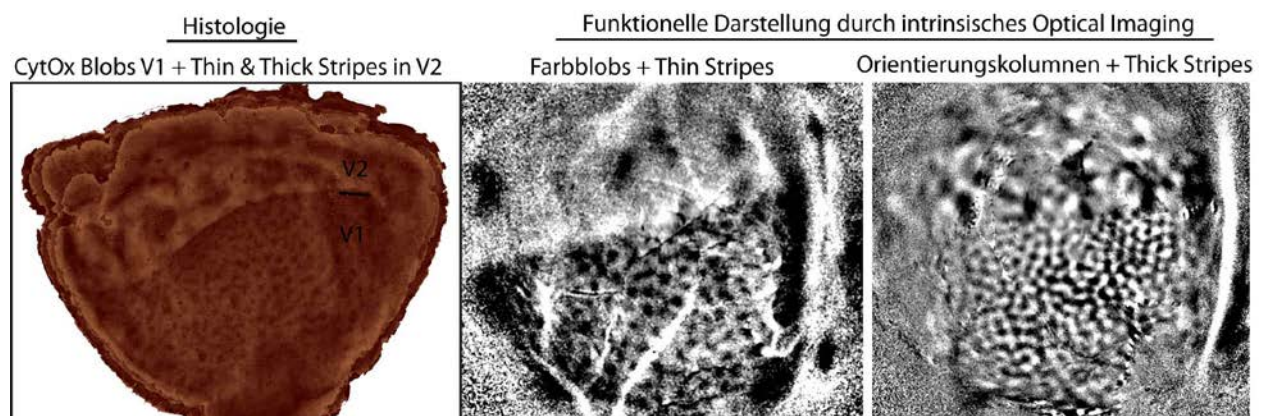


Bild 5. Anatomische Strukturen im Färbepreparat und ihre funktionelle Darstellung mittels Optical-Imaging. Fleckartige Färbemuster in V1 und V2 decken Bereiche auf, die eine hohe Dichte des Enzyms CytOx-aufweisen. Die gleichen Bereiche lassen sich *in vivo* durch Farb-reize und Orientierungsreize mittels Optical-Imaging darstellen. (Bilder aus 3 verschiedenen Tieren).

2.5 ODK, Blobs und Orientierungspinwheels

"In addition to a topographic map of the retina, mammalian visual cortex contains superimposed, orderly periodic maps of features such as orientation, eye dominance, direction of motion and spatial frequency.

There is evidence that these maps are overlaid so as to ensure that all combinations of the different parameters are represented as uniformly as possible across visual space."

(aus: How Many Maps are there in Visual Cortex?, Swindale (2000))

Mit der Entdeckung der Blobs in Makaken begann man die Zusammenhänge zwischen den drei Kolumnensystemen zu untersuchen.

Durch die Kombination von [³H]Prolin Injektionen und CytOx-Färbungen konnte der Verlauf der ODK, der sich durch die Färbungen hauptsächlich innerhalb der Schicht 4A zeigt, mit der Position der Blobs der Schichten 2/3 verglichen werden. Es zeigte sich in Makaken, dass Blobs in Reihen entlang der Mittellinien der ODK angeordnet waren, und dass die Abstände zwischen den Blobs innerhalb einer Kolumne kleiner waren als die Abstände von Blobs in benachbarten Kolumnen. Das gleiche Verteilungsbild zeigte sich auch bei Menschen (Horton und Hedley-Whyte, 1984). In Katzen scheint der Zusammenhang jedoch weniger klar zu sein (Murphy et al., 1995; Boyd und Matsubara, 1996; Horton und Adams, 2005). In Totenkopffaffen und Galagos wiederum wurde in detaillierten Studien gezeigt, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem Verlauf der ODK und der Lage der Blobs gibt (Horton und Adams, 2005; Xu et al., 2005). In Galagos wie in Katzen ist zudem das Muster der ODK fleckartiger ausgeprägt als in Makaken (Xu et al., 2005).

Aus der Abfolge der Orientierungspräferenzen entlang der Ableitpfade von Hubel und Wiesel zeigte sich, dass sich jede Orientierungspräferenz mit einer Periodizität von etwa 0.5mm wiederholt. Braitenberg und Braitenberg (1979) schlussfolgerten aus diesem Verlauf, dass die Orientierungspräferenzen um Zentren herum angeordnet sein müssen, die in solchen Abständen vorkommen. In späteren Arbeiten brachte Valentin Braitenberg diese Zentren (aufgrund der ähnlichen Abstände) mit den CytOx-Blobs in Zusammenhang und zeigte, dass sich aus der von ihm postulierten Anordnung auch die von Swindale gefundenen Pinwheels ergeben (Braitenberg, 1985; Braitenberg, 1992).

Erst mit dem Aufkommen der Optical-Imaging-Technik (Blasdel und Salama, 1986; Grinvald et al., 1986) und ihrer hochauflösenden Darstellung der Topographie der Orientierungspräferenzen wurde ein genauer Abgleich von dem Verlauf der Orientierungspräferenzen, der Position von Pinwheels, CytOx-Blobs und ODK möglich.

Eine Reihe von Untersuchungen, hauptsächlich an Makaken, zeigte, dass Pinwheels tendenziell im Bereich der Mittellinie der ODK vorkommen (80%), seltener im Bereich der Grenzlinien benachbarter ODK (20%) (Bartfeld und Grinvald, 1992; Blasdel, 1992; Crair et al., 1997). Außerdem zeigte sich, dass die Orientierungskolumnen, die sich in den topographischen Orientierungspräferenz-Karten als

spindelförmige Bereiche (auch als Iso-Orientierungs-Domänen bezeichnet) darstellen, senkrecht zu den Grenzlinien der ODK verlaufen (Hubel et al., 1978; Blasdel, 1992). Allerdings sind diese Anordnungen bisher nur in Makaken nachgewiesen worden. In Katzen (Horton und Adams, 2005), Galagos (Xu et al., 2005), Weißbüschelaffen (Roe et al., 2005) und Frettchen (Yu et al., 2005) zeigen sich diese Anordnungen nicht.

Ein räumlicher Zusammenhang zwischen den CytOx-gefärbten Blobs und der Periodizität der Orientierungspräferenz oder auch den Pinwheels konnte jedoch nie nachgewiesen werden (Livingstone und Hubel, 1984; Bartfeld und Grinvald, 1992; Blasdel, 1992; Obermayer und Blasdel, 1993; Xu et al., 2004; Horton und Adams, 2005; Roe et al., 2005; Yu et al., 2005; Kaskan et al., 2007), selbst dann nicht, als die Schwierigkeiten, die sich bei der Alignierung von funktionellen Daten und CytOx-Färbungen ergeben hatten, durch die *in vivo*-Darstellung der Blobs mittels Farbreizen überwunden wurden (Landisman und Ts'o, 2002; Lu und Roe, 2008).

Swindale postulierte, dass die Anordnung der verschiedenen funktionellen Kolumnen, vor allem die Notwendigkeit des Kortex widerspiegelt, mehrere topographische Karten für verschiedene Modalitäten des Sehannes (Farbe, Orientierung, Richtung, Tiefenwahrnehmung (Stereopsis)) innerhalb des gleichen kortikalen Raumes abzubilden, bei gleichzeitigem Erhalt ihrer retinotopen Beziehungen. Er bezeichnet dieses Prinzip als: "*uniform coverage*" (Swindale, 1991; Swindale et al., 2000; siehe auch Obermayer et al., 1990).

Durch weitere Untersuchungen in verschiedenen Spezies wurde immer deutlicher, dass die scheinbar modulare Anordnung der verschiedenen Kolumnensysteme im Makaken nicht die Regel darstellt (Horton und Adams, 2005; Yu et al., 2005; Johnson et al., 2010). Damit wurden Hypothesen fraglich, die das Vorhandensein von fundamentalen Modulen -bestehend aus einem Blob, einem Set von ODK, sowie einem Paar Pinwheels- postulierten, aus denen sich der visuelle Kortex zusammensetzt (siehe etwa Vanzetta und Grinvald, 2008, Dow, 2002, Ts'O et al., 2009; sowie Horton und Adams, 2005).

Zum Beispiel konnten Horton und Hocking (Horton und Hocking, 1996; Horton und Adams, 2005) zeigen, dass in solchen Totenkopffaffen, die ODK aufwiesen, die Blobs unabhängig von dem Verlauf der ODK verteilt liegen. Des Weiteren weist das Spitzhörnchen (*Tupaia*), in dem weder ODK noch Blobs nachgewiesen werden konnten, trotzdem die typischen Orientierungspräferenztopographien und auch Pinwheels auf (Humphrey et al., 1977; Wong-Riley und Norton, 1988; Johnson et al., 2010). Auf ähnliche Weise gilt das auch für nachtaktive Primaten wie die Nachtaffen, die farbenblind sind, aber trotzdem Blobs und ODK ausbilden (Xu et al., 2004). Zudem konnten Obermayer und Blasdel (1993) in detaillierten Untersuchungen an Makaken zeigen, dass die vermeintlich gleichen Periodizitäten der Orientierungspräferenz und der okuläre Dominanz nicht identisch sind, sondern das beide Systeme unterschiedliche Wiederholungsabstände aufweisen. In Grauhörnchen, Ratten, Mäusen und Kaninchen findet sich zudem nicht einmal eine regelmäßige Abfolge der Orientierungspräferenzen. In ihrem visuellen Kortex sind orientierungsselektive Neurone ohne erkennbare Abfolge, scheinbar zufällig, verteilt (Van Hooser et al., 2005).

Horton und Adams (2005) bemerken dazu: *"This remarkable inconsistency between species is mystifying and sabotages any effort to find an underlying principle uniting CO patches with other elements of the functional architecture within primate striate cortex."*

2.6 Farbsehen und die retino-thalamo-kortikalen Informationspfade in Primaten

"We now know that in addition to parvocellular and magnocellular pathways, more than a dozen smaller pathways leave the eye. Neurons in some of these pathways show properties as complex as those of cortical neurones, and their signals can reach visual cortical areas along a variety of routes, including the koniocellular (KC) layers of the LGN, the superior colliculus and the lateral pulvinar complex..."

(aus: Information Processing in the Primate Visual System, Martin und Solomon (2011))

In der Retina von Primaten finden sich zwei Photorezeptortypen, über die Licht wahrgenommen wird: Stäbchen und Zapfen. Stäbchen sind sehr lichtempfindlich und saturieren schnell unter hellen Verhältnissen wie etwa bei Tageslicht. Sie dienen daher vor allem dem skotopischen Sehen bei lichtschwachen Verhältnissen (in der Dämmerung oder nachts) und sind monochromatisch, erlauben daher nur das Sehen in Graustufen, also farbloses Sehen.

In der Retina von Menschen und Altweltaffen, wie z.B. Makaken finden sich in der Regel drei verschiedene Zapfentypen, von denen jeder ein Photopigment (oder Chromatophor) aufweist, das in einem anderen Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichtes sein Absorptionsmaximum hat und für höhere Helligkeiten, wie sie unter Tageslichtverhältnissen vorkommen, empfindlich ist (auch als photopisches Sehen bezeichnet). Nach ihrer Sensitivität in den unterschiedlichen Wellenlängenbereichen unterscheidet man sie in S-Zapfen (*short* = 420nm), M-Zapfen (*middle* = 530nm) und L-Zapfen (*long* = 560nm). S-, M- und L-Zapfen werden auch als Blau-, Grün- und Rot-Zapfen bezeichnet, obwohl die Farbnamen nicht den Wellenlängen ihrer Sensitivitätsmaxima entsprechen. Durch die verschiedenen Sensitivitätsbereiche der Zapfen wird es möglich, Licht verschiedener Wellenlängen innerhalb eines breiten Lichtspektrums (~350-750nm) zu unterscheiden und dadurch Farben von gesehenen Objekten wahrzunehmen. Primaten mit 3 Zapfentypen werden auch als Trichromaten bezeichnet. Die Signale der drei Zapfentypen werden von Bipolarzellen aufgenommen und auf verschiedenen Ganglienzelltypen weitergeleitet, die die Aktivität der verschiedenen Zapfentypen miteinander verrechnen (Conway, 2009). So gibt es Zellen, die Aktivitäten von S-, M- und L-Zapfen (SBS (*small-field bistratified subgroup*)-Ganglion) integrieren (S- (M+L) Zellen) und dadurch spezifisch für die Modulation der S-Zapfen Aktivität werden (Blau-An). Das heißt, sie werden durch die Aktivierung der S-Zapfen mit blauem Licht aktiviert, durch Aktivierung von M und L Zapfen (gelbem Licht) gehemmt. Sie werden daher auch als Blau-Gelb Gegenfarben-Zellen bezeichnet. Die Parasol- und Midget-Ganglienzellen integrieren auf unterschiedliche Weise M- und L-Zapfenaktivität. Parasol-Ganglienzellen reagieren, wenn sowohl M- als auch L-Zapfen gemeinsam (M+L Zellen) durch Lichteinfall aktiviert (Parasol-An) werden oder die gemeinsame Aktivierung gleichzeitig endet (Parasol-Aus). Aus dieser Eigenschaft ergibt sich, dass sie hauptsächlich Informationen über Helligkeiten weitergeben.

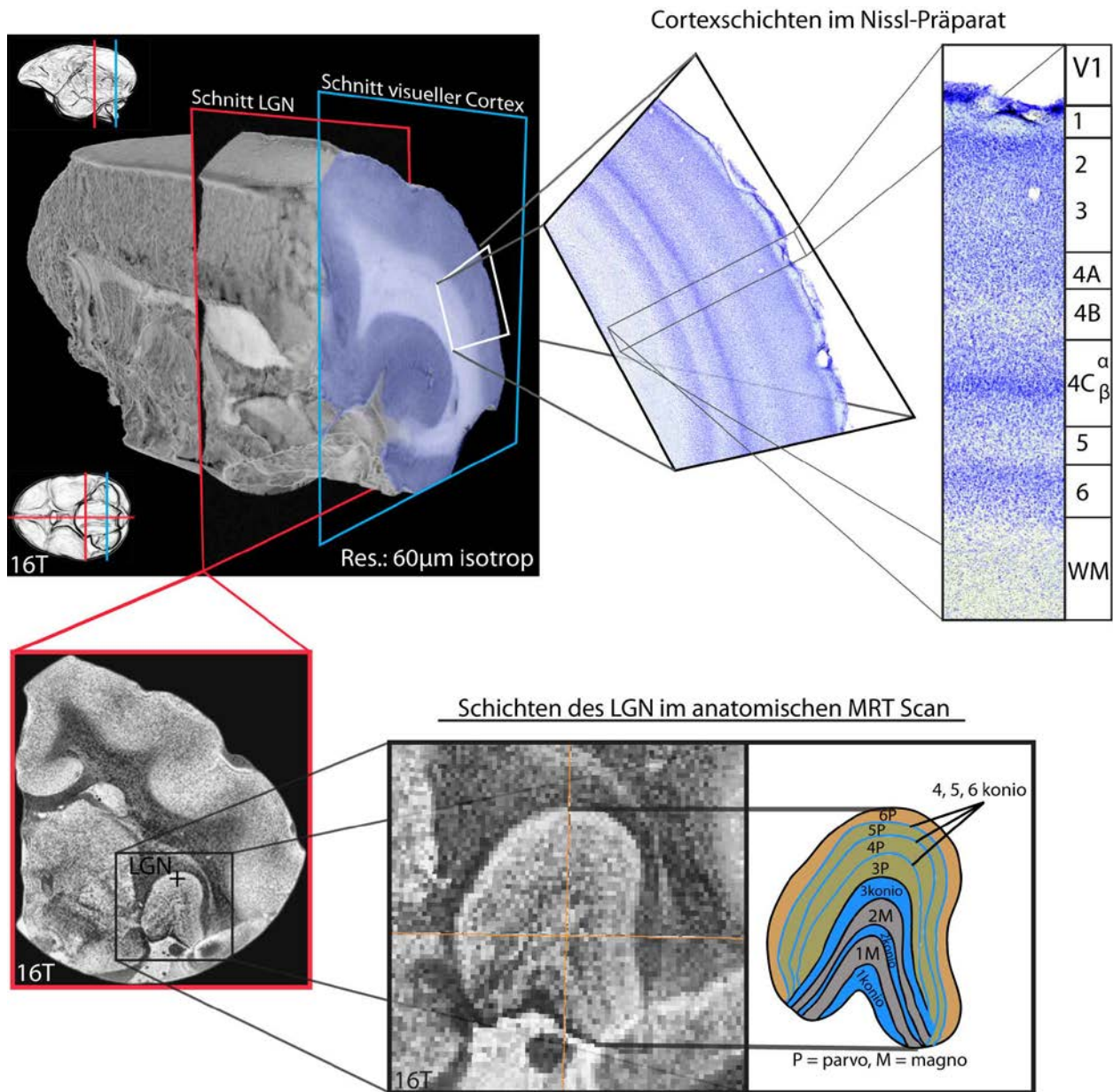


Bild 6. Architektur des visuellen Systems im Weißbüschelaffen. Oben links: Hochaufgelöster anatomischer (16 Tesla) MRT-Scan einer einzelnen Hemisphäre. Oben rechts: Verdeutlichung der Kortexschichtung mittels Nissl-Färbung. Unten: Virtueller Schnitt durch das LGN und schematische Darstellung seiner Schichten.

Midget-Ganglienzellen bilden 2 Subtypen aus: einen Grün-An Typ, der auf die Aktivierung von M-Zapfen reagiert, aber durch die Aktivierung von L-Zapfen gehemmt wird, und einen Rot-An Typ, der auf die Aktivierung von L-Zapfen reagiert, aber durch die Aktivierung von M-Zapfen gehemmt wird (L-M Zellen) (Martin, 1998). Midget-Ganglienzellen werden daher als Rot-Grün Gegenfarben-Zellen bezeichnet und sind daher hauptsächlich für die Rot-Grün-Farbwarnnehmung verantwortlich.

Jede dieser Ganglienzellen sendet ein Axon aus, das als Teil des Sehnervs in den Lateralen Nukleus Genikulatus (engl. kurz LGN) im Thalamus zieht. Dort bildet es Verknüpfungen mit LGN Neuronen aus, von denen wiederum Axone ausgehen (Afferenzen), die mit Neuronen im primären visuellen Kortex verknüpft sind.

Die Rolle des LGN in der visuellen Informationsverarbeitung des Kortex ist unklar (Conway, 2009). Lange Zeit wurde das LGN hauptsächlich als Umschaltstation der retinalen Afferenzen angesehen. Neuere Studien über kortiko-thalamische Feedback-Verbindungen deuten an, dass seine Aufgabe weitaus komplexer ist (Martin und Solomon, 2011).

Das LGN ist für funktionale Untersuchung nur schwer zu erreichen, da es tief in der Mitte des Hirns gelegen ist und dadurch gezielte Ableitungen mit Elektroden problematisch sind. Nichtinvasive funktionelle Kernspinuntersuchungen haben in der Regel nicht genug räumliches Auflösungsvermögen (bei 3Tesla Feldstärke $\sim 0.5\text{mm}^3$), um der Architektur des LGN in Primaten gerecht zu werden, so dass es nur bedingt möglich ist, funktionelle Kompartimente mit dieser Technik zu unterscheiden (Sincich und Horton, 2005).

In anatomischen Präparaten zeigt das LGN -wie der visuelle Kortex- einen 6-schichtigen Aufbau (siehe Bild 6). Die Afferenzen der retinalen Rot-Grün-Gegenfarben-Zellen projizieren vornehmlich in die dorsalen Schichten 1 - 4. Die Parasol-Ganglienzellen bilden über Afferenzen Verknüpfungen mit den ventral gelegenen Schichten 5 und 6 aus (Perry et al., 1984). In Nissl-Färbungen zeigen die ventralen Schichten wesentlich größere Zellkörper als die dorsalen Schichten. Daher werden die Schichten 5 und 6 auch als magnozelluläre Schichten (Magno von *magnus*, Latein: groß) und die Schichten 1-4 als parvozelluläre Schichten (Parvo von *parvus*, Latein = klein) bezeichnet.

Erst relativ spät (um 1994) entdeckte man, dass die SBS-Ganglienzellen Afferenzen zu Zellen ausbilden, die in eigenen Schichten zwischen den magno- und parvozellulären Schichten verlaufen (Sincich und Horton, 2005). Aufgrund ihrer sehr geringen Größe bezeichnete man sie als Konio-Zellen (vom griechischen *kónis* bzw. *konía* = Staub) (Kaas et al., 1978; Martin, 2004). Die Koniozellen waren lange Zeit nicht als eigenständige Neuronenpopulation angesehen worden, da sie vor allem in Makaken eine sehr dünne Ausprägung haben, teilweise in die benachbarten parvo- und magnozellulären Schichten hineinreichen und deshalb in den klassischen Nissl-Färbepreparaten schwer erkennbar sind (Hendry und Reid, 2000).

Parvo-, Magno- und Koniozellen senden Afferenzen in unterschiedliche Bereiche von V1 aus. Parvozelluläre Axone ziehen hauptsächlich in die Schicht 4C β und Schicht 6. Magnozellen bilden Verknüpfungen innerhalb der Schicht 4C α und der Schicht 6. Für die Koniozellen ist als einziges nachgewiesen, dass sie direkte Verknüpfungen mit Zellen in den CytOx-Blobs der Schicht 2/3 haben (Casagrande et al., 2007). Zusätzlich finden sich Konio-Eingänge in der Schicht 4A (für *Reviews* siehe Hendry und Reid (2000) und Sincich und Horton (2005)).

Sowohl für die magnozellulären Schichten als auch für die parvozellulären Schichten werden Verbindungen über Zwischenverschaltungen zu den Blob- und den Interblobbereichen diskutiert. Die vorhandenen Daten aus wenigen Studien sind jedoch widersprüchlich, so dass bisher kein klares Bild

erkennbar ist. Es wird vermutet, dass die verschiedenen Modalitäten der drei retino-thalamo-kortikalen Pfade im komplexen Geflecht der Nerven-Netzwerke von V1 konvergieren, um dann transformiert und mit neuen Informationsqualitäten ausgestattet nach V2 weitergeleitet zu werden (Sincich und Horton, 2005).

Sicher scheint, dass es Verbindungen von den Blobs der Schichten 2/3 in Bereiche von V2 gibt, die als "dünne Streifen" (engl. *Thin Stripes*) bezeichnet werden und für die im Makaken gezeigt wurde, dass es dort topographische Karten für Farben gibt (Roe und Ts'o, 1999; Xiao et al., 2003). Des Weiteren sind Verbindungen zwischen den Interblobbereichen der Schichten 2/3 mit V2 Bereich bekannt, die als "blasse Streifen" (engl. *Pale Stripes*) bezeichnet werden und durch Orientierungsreize aktiviert werden (Roe und Ts'o, 1995; Ts'o et al., 2001; Xu et al., 2004; McLoughlin und Schiessl, 2006; Lu und Roe, 2007). Zudem gibt es Verbindungen zwischen den Eingangsschichten der Magno-Pfade und den "breiten Streifen" (engl. *Thick Stripes*) von V2, für die gezeigt wurde, dass dort räumliche Unterschiede kartographisch repräsentiert sind (Malach et al., 1994; Ts'o et al., 2001). Siehe auch Bild 7.

Aufgrund der Antworteigenschaften der verschiedenen retinalen Ganglienzelltypen, der Verschaltungsarchitektur ihrer Afferenzen im LGN und der Erkenntnisse über die Verteilung von farb- und orientierungsselektiven Neuronen in V1 und auch V2 hat sich ein Modell etabliert, das von drei visuellen Pfadsystemen (Magno, Parvo, Konio) ausgeht, die unterschiedliche Modalitäten der visuellen Wahrnehmung prozessieren. Der Magno-Pfad, der durch die Parasol-Ganglienzellen und die mit ihnen verschalteten Schichten und Kompartimente in LGN, V1 und V2 (breite Streifen) gebildet wird, wurde mit der Wahrnehmung von Bewegung und Stereopsis verknüpft. Der Parvo-Pfad, bestehend aus den Midget-Ganglienzellen und den mit ihnen verschalteten Schichten und Kompartimente im LGN, V1 (Blob, Interblob) und V2 (blasse Streifen), wurde mit der Wahrnehmung von Farbe und Form verknüpft. Der Konio-Pfad, bestehend aus den SBS-Ganglienzellen und den mit ihnen verschalteten Schichten und Kompartimenten im LGN, V1 (Blob) und V2 (dünne Streifen), wurde mit der Wahrnehmung von Farbe verknüpft (Casagrande, 1994; Hendry und Yoshioka, 1994; Sincich und Horton, 2005; Federer et al., 2009).

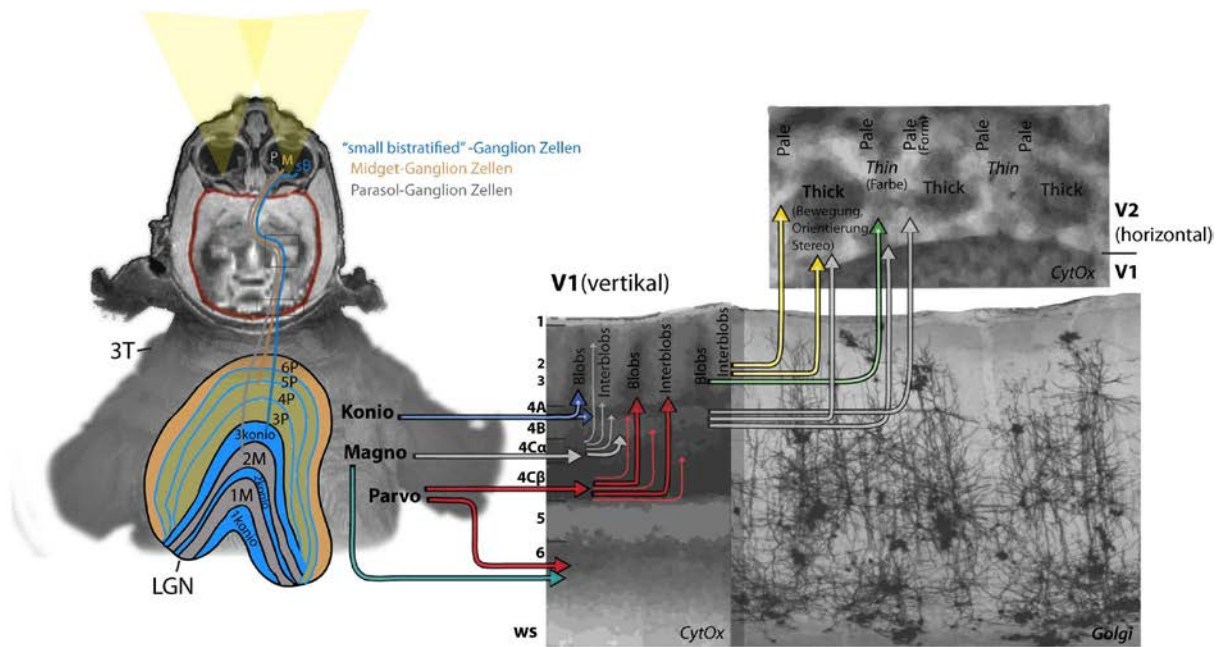


Bild 7. Anatomie des visuellen Systems von Primaten im Schema. Die Ganglienzellen in der Retina integrieren die Aktivität von unterschiedlichen Photorezeptoren und leiten Informationen z.B. über Farbe und Helligkeiten des gesehenen Bildes auf getrennten Bahnen zur "Umschaltstation" im Nukleus Geniculatus Lateralis (LGN) weiter. Von da werden die Informationen weiterhin getrennt in separate Bereiche der Schichten des primären visuellen Kortex (V1) geleitet. Der genaue Verlauf der Weiterleitung ist aufgrund der komplexen Verschaltung (Beispiel rechts (Golgi-Färbung)) der Schichten und ihrer Kompartimente (Blobs, Interblobs) unklar. Letztendlich gelangen Informationen über Form, Farbe und Stereosehen in separate Bereich von V2 (für weitere Details siehe Adams und Horton, 2009).

2.7 Das intrinsische Signal

"Some of the most popular functional brain imaging techniques, like functional magnetic resonance imaging (fMRI) and intrinsic optical imaging (OI), rely on an interpretation of the recorded haemodynamic response to make inferences about the underlying neuronal activation ..."

(aus: Independent Components of the Haemodynamic Response in Intrinsic Optical Imaging, Schiessl et al. (2008))

Durch lokale Änderungen vor allem der Durchblutung des Hirngewebes - die durch Nervenzellaktivität bedingt sind - ändern sich Lichtabsorptions- und Lichtbrechungseigenschaften des Gewebes. Diese können mit hochempfindlichen CCD-Kameras als Helligkeitsunterschiede aufgenommen werden. Theoretisch lassen sich damit noch Gewebereiche mit einer Größe von $\sim 50\mu\text{m}$ in den oberen Schichten des Kortex aufzeigen, in denen es durch neuronale Aktivität zu Durchblutungsänderungen kommt.

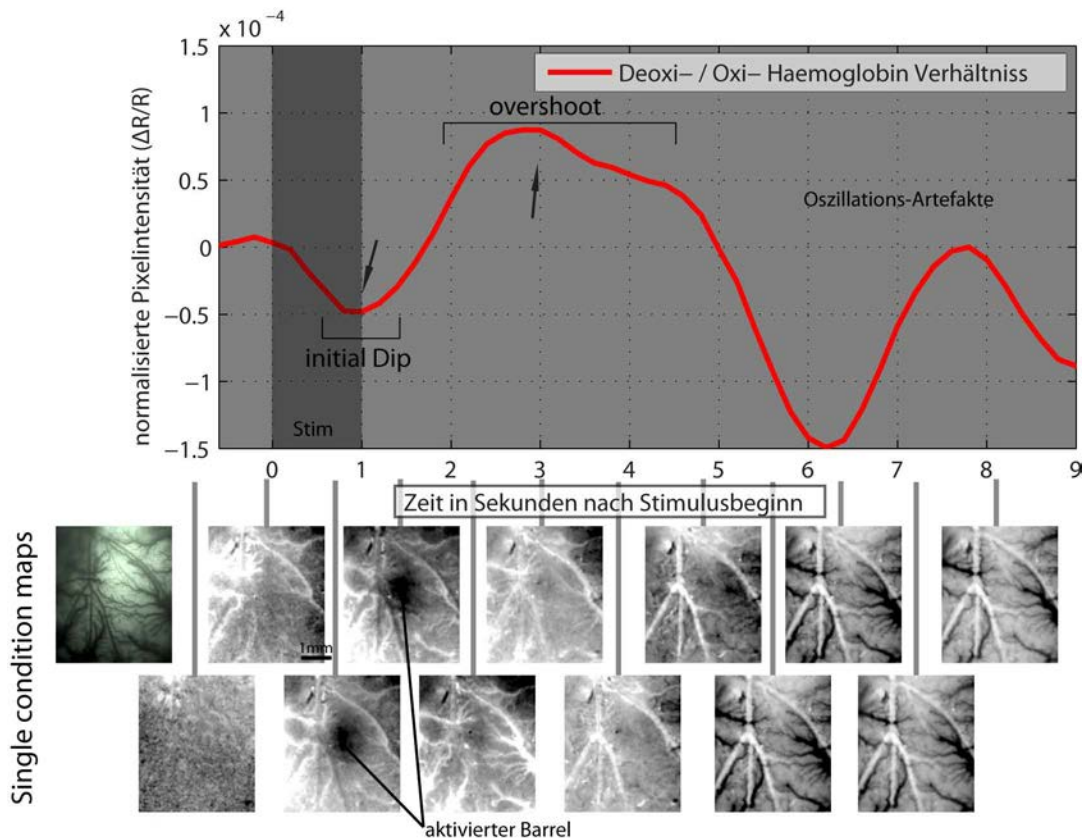


Bild 8. Zeitlicher und räumlicher Verlauf des intrinsischen Signals (bei Rotlicht), aufgenommen im somatosensorischen Kortex (*barrel cortex*) der Ratte während Schnurrhaarstimulation. Der Graph zeigt den zeitlichen Verlauf der Lichtabsorption im untersuchten Gewebebereich. Mitte-links: Blutgefäß-Referenzbild, aufgenommen bei Grünlicht. Daneben: Räumliches Erscheinungsbild des Signals vor, während und nach der Stimulation, berechnet durch eine Frame-0-Subtraktion.

Dem aktuellen Erklärungsmodell nach -für dieses sogenannte intrinsische Signal- steigt durch die Aktivierung von Nervenzellen kurzzeitig der Sauerstoffbedarf im Gewebe an, woraufhin der im lokalen Gefäßnetz vom Blut transportierte Sauerstoff zur Deckung dieses Bedarfes herangezogen wird. Dadurch kommt es in dem aktivierten Gewebebereich kurzfristig zu einer lokal begrenzten Hypoxie (Sauerstoffmangel). Um den erhöhten Sauerstoffbedarf auszugleichen, wird vermehrt sauerstoffreiches/arterielles Blut in diese Bereiche geleitet. Dies geschieht zum einen durch das Aufweiten von Blutgefäßen der Blut zuführenden und auch der ableitenden Gefäße, die dadurch mehr Blutvolumen leiten können, als auch durch die Erhöhung der Durchflussrate insgesamt (Bonhoeffer und Grinvald, 1996; Vanzetta und Grinvald, 2008; Tian et al., 2010).

Zum Nachweis dieser Änderungen hat sich als gängige Methode die Darstellung der relativen Blutsauerstoffkonzentration im Gewebe durch die Beleuchtung des Kortex mit rotem Licht der Wellenlänge 605nm oder 630nm etabliert. In diesem Wellenlängenbereich ($\lambda = 595 - 630\text{nm}$) ist die Absorption des roten Lichts durch sauerstoffarmes Blut bzw. durch den deoxigenierten Blutfarbstoff

Hämoglobin besonders hoch. Sauerstoffreiches Blut (oxigeniertes Hämoglobin) hingegen reflektiert diese Wellenlängen stärker, so dass sich in den Aufnahmen der Hirnoberfläche bei z.B. visueller Reizung dunkle Bereiche nachweisen lassen, die aufgrund einer erhöhten Aktivität einer lokal begrenzten Hypoxie (= erhöhte Lichtabsorption) unterliegen, und andere Bereiche, die auf diesen speziellen Reiz nicht reagieren - nicht hypoxisch sind und deshalb weniger Licht absorbieren (helle Bereiche, siehe Bild 8). Der Sauerstoffverbrauch zeigt sich im intrinsischen Signal bei rotem Licht als ein starkes Absinken (im Vergleich zum Durchschnittswert in nichtstimuliertem Hirngewebe) der reflektierten Lichtintensität, das im Englischen auch als *Initial Dip* bezeichnet wird. Durch das darauf folgende Einströmen von sauerstoffreichem Blut ins Gewebe kommt es zu einer Steigerung (über den Durchschnittswert) der Lichtreflexion des Gewebes, im Englischen als *Overshoot* bezeichnet (Bonhoeffer und Grinvald, 1996; Vanzetta und Grinvald, 2008). Die für das intrinsische Signal bei rotem Licht hauptsächlich verantwortlichen "signalgebenden" Strukturen scheinen die Kapillarnetze zu sein, in denen der Sauerstoff an das umliegende neuronale Gewebe getauscht wird (Frostig et al., 1990). Der Blutfluss selbst wird über ein engmaschiges Netz aus zuführenden Arterien und abführenden Venen geleitet, deren Durchmesser über ringförmige -aus glatter Muskulatur bestehende- Ventile gesteuert wird (Duvernoy et al., 1981; Reichold et al., 2009; Tian et al., 2010).

Nutzt man zur Beleuchtung des Kortex grünes Licht mit einer Wellenlänge, bei der die Absorption von deoxigeniertem und oxigeniertem Hämoglobin gleich ist (engl., *isobestic point*, in Primaten z.B. bei $\lambda = 495\text{nm}$, 575nm , 587nm), lässt sich der Verlauf der Blutvolumenzunahme darstellen (Bonhoeffer und Grinvald, 1996) (siehe Bild 9).

Unter Verwendung von Wellenlängen im Bereich des kurzwelligen Infrarotlichtes (NIR, z.B. $\lambda > 800\text{nm}$) lassen sich vor allem Diffusionsprozesse im Gewebe untersuchen, die sich auf Lichtstreuungseigenschaften des Gewebes auswirken (Bonhoeffer und Grinvald, 1996). Mittels Wellenlängen im UV Bereich ($\lambda = 420\text{-}490\text{nm}$) kann die durch Flavoproteine emittierte Autofluoreszenz von Zellen gemessen werden (Husson et al., 2007).

Durch den quasi-gleichzeitigen Einsatz von mehreren dieser Wellenlängen für spektroskopisches Optical-Imaging können die zeitlichen und räumlichen Verläufe der Hauptkomponenten der "haemodynamischen Antwort" zeitgleich hoch aufgelöst gemessen werden. Da diese vaskulären und zellulären Prozesse auch die signalgebenden Elemente in funktionellen MRI-Studien sind (Logothetis und Wandell, 2004; Vanzetta und Grinvald, 2008), bildet die Optical-Imaging-Technik eine wichtige Komplementärtechnik zu den modernen fMRT-Studien für funktionelle Untersuchungen des Kortex.

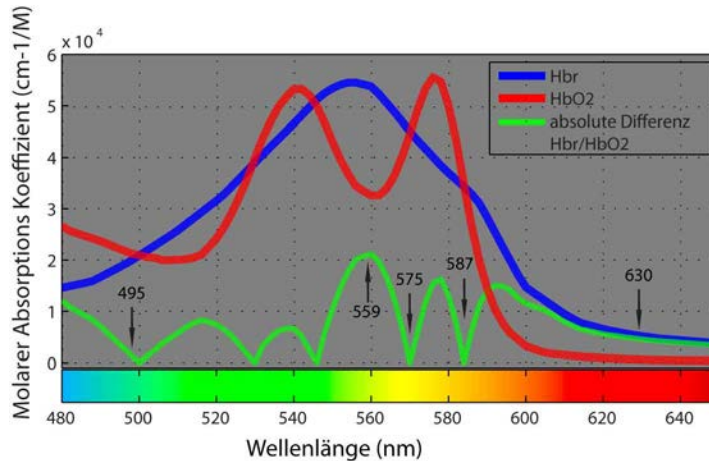


Bild 9. Absorptionsspektren von Oxi- und Deoxi-Haemoglobin. Der Verlauf der Absorptionsspektren zeigt die Relevanz der Wahl der Wellenlängen beim intrinsischen Optical-Imaging. Licht mit einer Wellenlänge nahe einem Schnittpunkt (isobestische Punkte) eignet sich zur Messungen der Blutvolumenänderung. Wellenlängen in Bereichen großer Absorptionsdifferenz erlauben die Darstellung der relativen Gewebeoxigenierung. Für spektroskopische Messungen häufig verwendete Wellenlängen sind mit Pfeilen markiert.

2.8 Literatur Fazit

Aus der Literaturrecherche wird deutlich, dass die räumlichen Zusammenhänge der verschiedenen funktionellen Systeme (ODK, Blobs, Orientierungsselektivität sowie Pinwheels) hauptsächlich im Makaken ausreichend gut beschrieben sind um Zusammenhänge der verschiedenen Systeme aufzeigen zu können.

Durch eine Vielzahl anatomischer und physiologischer Untersuchungen zeichnet sich trotzdem deutlich ab, dass es eine große Diversität bei der Ausbildung der Topographien der verschiedenen Systeme in den untersuchten Arten gibt. Und diese Diversität spiegelt sich nicht nur in Unterschieden zwischen den untersuchten Arten wieder, sondern findet sich ebenfalls innerhalb der einzelnen Arten als intraindividuelle Varianz.

Obwohl in keiner anderen Tierart als den Makaken die räumlichen Zusammenhänge annähernd gut untersucht sind, zeigen sich jedoch durch die Angaben zur Ausprägung und dem Vorhandensein von ODK, orientierungsselektiven Neuronen sowie den Angaben zu den Abständen, Größe und Verlauf der Blobs in den einschlägig untersuchten Arten (Makake, Katze, Totenkopffaffe, Marmoset, Aotus, Galago, Frettchen) sehr individuelle Werte, die fragwürdig erscheinen lassen, ob zwischen den verschiedenen Topographien der Systeme eine grundsätzliche Abhängigkeit gegeben ist, oder ob deren Anordnung bzw. Ausprägung nicht durch weitere -bisher unbekannte Faktoren- bestimmt wird.

Da jedoch außer an Makaken bisher für keine weitere Tierart eine vergleichbar detaillierte Beschreibung der räumlichen Beziehungen von ODK, Blobs, Orientierungsselektivität sowie Pinwheels durchgeführt wurde ist eine vergleichende Untersuchung dieses Sachverhalts bislang nicht möglich.

Es scheint daher erforderlich das gleichermaßen detaillierte Beschreibungen der verschiedenen Systemtopographien an weiteren Tierarten vorgenommen werden, um dann aus deren Vergleich heraus weiteren Aufschluss über die grundlegenden Musterbildungsprozesse und die räumlichen Zusammenhänge der verschiedenen Kolumnensysteme ziehen zu können.

3 Methodik

3.1 Intrinsisches Optical-Imaging

Beim intrinsischen Optical-Imaging handelt es sich um ein optisches nichtinvasives Untersuchungsverfahren, um Hirnaktivität darzustellen. Dabei wird die Hirnoberfläche mit Licht einer bestimmten Wellenlänge (zumeist Licht aus dem Bereich des sichtbaren Spektrums) beleuchtet, und mittels einer hochempfindlichen CCD-Kamera (*high dynamic range*= ~20-60dB) werden Aufnahmen von der Hirnoberfläche gemacht. Dazu muss in der Regel der Teil der Schädeldecke entfernt werden, der den zu untersuchenden Hirnbereich bedeckt (Kraniotomie). In Mäusen und Ratten reicht es schon, die Schädeldecke auszudünnen. In Tieren, die über größere Hirnvolumina (Katze, Makaken) verfügen ist die äußerste Hirnhaut (*Dura Mater*) meist so dick und daher intransparent, dass eine Aufnahme durch sie hindurch nicht möglich ist, so dass auch sie entfernt werden muss. Um das Hirngewebe vor Austrocknung zu schützen, wird eine sogenannte Optische Kammer über dem Bereich der Kraniotomie angebracht, bestehend aus einer transparenten Deckplatte, die über eine Einfassung fest mit der Schädeldecke verbunden wird. Zwischen Hirnoberfläche und Kammer wird dann ein ebenfalls transparentes Gel (z.B. Silikonöl oder Agarose) eingebracht. Dieser Aufbau stabilisiert die Hirnoberfläche gegen Schwankungen, die durch die Atmung und den Puls des Versuchstieres verursacht werden und zu Artefakten bei der Datenaufnahme führen.

Intrinsisches Optical-Imaging bei Wellenlängen im Bereich des roten Lichts nutzt Änderungen der Absorptionseigenschaften des Gewebes aus, um neuronale Aktivität nachzuweisen, die z.B. durch einen visuellen Reiz hervorgerufen wird.

Diese reizspezifischen Signale sind selbst unter nahezu optimalen Bedingungen (Einsatz von Muskelrelaxanzien, stabile Anästhesie, gute Präparation der optischen Kammer, konstante Intensität der Lichtquelle (Albeanu et al., 2008; Everdell et al., 2010) sehr schwach ausgeprägt. Das eigentliche "reizspezifische" Signal macht nur etwa 0.1 - 0.2% der sich im Kortex zeigenden Änderungen aus (Bonhoeffer und Grinvald, 1996; Lu und Roe, 2008). Vor allem Atmung und Puls führen zu starken Schwankungen der Intensität des vom Kortex reflektierten Lichtes. Aber auch sogenannte *slow oscillation waves*, auch als *vasomotion* bezeichnete Schwankungen der Gewebereflexion, die in langsamen Intervallen (0.1Hz) den Bereich der Kraniotomie wellenartig durchziehen, machen es schwierig, das reizspezifische Signal darzustellen (Mayhew et al., 1996).

3.2 Methodik der Datenverarbeitung

"The ultimate goal of high-resolution functional brain mapping is single-condition (stimulus versus no-stimulus maps) rather than differential imaging (comparing two "stimulus maps"), because the appropriate ("orthogonal") stimuli are rarely available."

(aus: Columnar Resolution of Blood Volume and Oximetry Functional Maps in the Behaving Monkey: Implications for fMRI, Vanzetta et al. (2004))

Um den im vorherigen Kapitel 3.1. aufgeführten Einflüssen entgegen zu arbeiten, werden verschiedene Methoden benutzt. Während einer einzelnen Aufnahme, deren Dauer gewöhnlich zwischen 8-12 Sekunden beträgt, werden in der Regel 60 Bilder pro Sekunde aufgezeichnet. Auf diesen Bildern wird die Helligkeit eines Punktes im Gewebe als Grauwert (10 - 14 bit) dargestellt. In einem ersten Schritt werden die Daten über die Zeit integriert, indem mehrere aufeinander folgende Bilder aufsummiert werden (*temporal binning*). Dadurch lassen sich z.B. Kamerarauschen und Intensitätsschwankungen der Beleuchtung reduzieren. Zum anderen werden mehrere Aufnahmen gemittelt (10 - 40 Wiederholungen), um die auf den Reiz folgenden Änderungen (Stimulus-Kondition) gegenüber den nicht-reizspezifischen Änderungen zu verstärken. Dann werden in gleicher Weise Aufnahmen der Hirnaktivität ohne Stimulation gemacht, die den nichtstimulierten Status - quasi das Hintergrundrauschen des Hirns - wiedergeben (Hintergrund-Kondition). Die Hintergrund-Kondition wird dann von der Stimulus-Kondition abgezogen. Auf diese Weise können die schwachen reizspezifischen Signale isoliert werden. Als sehr wirksam hat es sich erwiesen, in jeder Stimulus-Kondition die Kortexaktivität kurz vor Reizbeginn (~0.5 - 2 Sekunden) mit aufzuzeichnen (Shoham und Grinvald, 2001; Lu und Roe, 2008) und diesen Aufnahmebereich als Hintergrund von der restlichen Aufnahme abzuziehen. Diese Methode wird als *frame-zero-* oder auch *first-frame-*Subtraktion bezeichnete.

Stimuliert man ein einzelnes Barthaar einer Ratte (Einzel-Kondition, engl. *single condition*) und zeichnet die dadurch hervorgerufene Aktivität im somatosensorischen Kortex auf, reicht diese Datenbearbeitungsmethode aus, um den Bereich der Barthaarrepräsentation innerhalb des Aufnahmebereiches zu lokalisieren.

Aktivität, die im visuellen Kortex von Primaten durch z.B. einen einzelnen Strichreiz hervorgerufen wird, ist allerdings weitaus schwieriger lokalisierbar. In eigenen Aufnahmen (siehe Bild 10), wie auch in einer Studie von Lu und Roe (Lu und Roe, 2007) lässt sich gut erkennen, dass in Einzelreiz-Konditionen scheinbar der gesamte Bereich von V1 (so der visuelle Stimulus einen Großteil des Sehfeldes abdeckt) aktiviert wird. In optimalen Aufnahmen sind schwach fleckige Bereiche mit stärkerer Lichtabsorption erkennbar, jedoch lassen sich in diesen Aktivitätskarten die Verläufe der einzelnen Orientierungskolumnen nicht ohne weiteres mit Sicherheit bestimmen.

Um die Verteilung der Kolumnen deutlicher aus der Einzel-Konditions-Karte herauszuarbeiten, wird eine Differenzberechnung vorgenommen (siehe Bild 10). Hierzu wird die Einzel-Konditions-Karte eines Orientierungsreizes von der Einzel-Konditions-Karte des orthogonalen bzw. komplementären Orientierungsreizes abgezogen. So erhält man eine Differenz-Karte (engl. *differential map*).

Durch die Berechnung der Differenzkarten von mehreren Orientierungsreizpaaren, lässt sich über ein Vektorsummations-Verfahren¹ (Bonhoeffer und Grinvald, 1993) eine farbkodierte, topographische Karte der Verteilung aller Orientierungspräferenzkolumnen erstellen, die einen Gesamteindruck der funktionellen Organisation bietet.

Zur Darstellung der farbselektiven Bereiche, bzw. der Blobs in Optical-Imaging-Karten hat man bisher chromatische isoluminante Gegenfarben-Strichmuster benutzt (Landisman und Ts'o, 2002; Lu und Roe, 2008). Ähnlich wie die Orientierungsmuster führen diese Reize zu einer nahezu gleichförmigen Aktivierung von V1. Der komplementäre Reiz, um die farbspezifische Aktivität aus den Karten zu isolieren, ist jedoch nicht das orthogonale chromatische Strichmuster ([Orient.+Farbe]). Als wirksame Methode stellte sich die Differenzbildung mit achromatischen (Schwarz/Weiß) Strichmustern ([Orient.]) der gleichen Orientierung heraus (Lu und Roe, 2008). Die Idee dabei ist, dass durch die Differenzbildung die orientierungsspezifische Aktivität, die in beiden Reiz-Konditionen enthalten ist, "herausgerechnet" wird (etwa: {[Orient.+Farbe]-[Orient]} = [Farbe]) und so nur die schwächere farbspezifische Aktivierung der Blobs erhalten bleibt.

Solche Datenbearbeitungs-/Datenanalyse-Methoden die auf die Rohbilddaten der Kamera angewandt werden lassen sich schnell und einfach in Matlab (www.mathworks.com) realisieren.

¹ Für die Vektorsummation werden alle aufgenommenen Einzel-Konditions-Karten zuerst vektorisiert. Dazu wird für jeden Bildpixel einer Karte der Grauwert als Länge eines Vektors festgelegt und die Orientierung des Reizes aus dem die Karte resultiert bestimmt den Winkel des Vektors. Anschließend werden die so berechneten Vektorkarten aufsummiert. Zur Darstellung der Topographie der Orientierungspräferenz wird der Winkel der Vektorsummenkarte farblich kodiert dargestellt. Die resultierende Karte gibt auf diese Weise für jeden Bildpixel die dominierende Reizantwort wieder (Bonhoeffer and Grinvald, 1993).

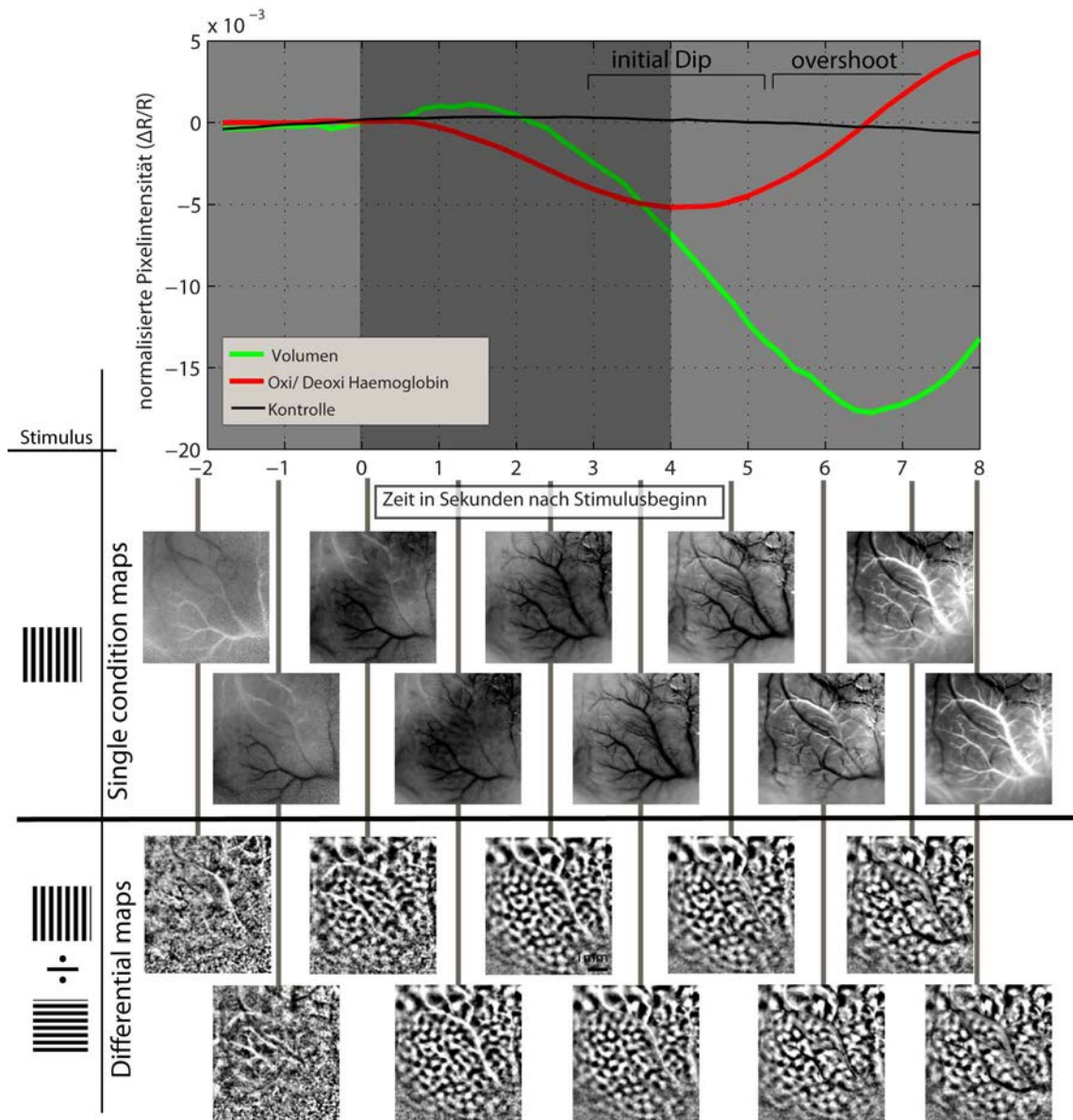


Bild 10. Intrinsic Signal, aufgenommen bei Beleuchtung mit Rot- und Grünlicht in V1 vom Weißbüschelaffen. Oben: zeitlicher Verlauf des Signals während einer einzelnen Orientierungsstimulus-Kondition. Darunter: Prinzip der Berechnung von Einzel-Konditions-Karten und Differenzkarten. Mitte: räumliche Verteilung der reizspezifischen Aktivität in Einzel-Konditions-Karten (bei Rotlicht). Unten: Kolumnenbildung in Differenzkarten orthogonaler (vertikal-horizontal) Stimuluskonditionen.

3.3 Problematik der Alignierung von funktionellen und anatomischen Daten

"The spatial uncertainty in optical imaging and the vexing problem of alignment with postmortem CO histology make it difficult to come to a definitive conclusion one way or the other..."

(aus: *Ocular Dominance Columns: Enigmas and Challenges*, Adams und Horton (2005))

Um die räumliche Verteilung der durch Optical-Imaging dargestellten funktionellen Bereiche mit dem Verlauf von Strukturen in histologischen Präparaten vergleichen zu können (z.B. Farbblobs vs. CytOx-Blobs), nutzt man Kamerabilder der Kortexoberfläche, die vor oder nach den Stimulus-Konditionen bei grünem Licht aufgenommen werden. Sie zeigen den Verlauf der Blutgefäße entlang der Kortexoberfläche sowie die Positionen von vertikal zu den Schichten verlaufenden Gefäßen, die ebenso in tangentialen Schnittpräparaten gefunden werden können. Anhand dieser Gefäßpositionen können die funktionellen Karten mit den histologischen Präparaten aligniert werden, so dass die aktivierten Bereiche anatomischen Strukturen zugeordnet werden können. Zusätzlich werden in machen Studien Läsionen oder Markierungen mit Farbstoffen im Gewebe eingebracht, um die Genauigkeit der Alignierung zu erhöhen und so den Einfluss von Verzerrungen des Gewebes, die während der histologischen Aufbereitung durch z.B. Schrumpfungsprozesse auftreten, auszugleichen. Der Ausrichtungsfehler, der bei diesen Alignierungsverfahren trotz allem auftritt, kann sehr groß sein und lässt sich schwer einschätzen.

Besonders deutlich wird die grundlegende Problematik an einer Arbeit von Landisman und Ts'O (2002), die Karten von funktionell dargestellten Blobs mit CytOx-Färbungen der Blobs überlagern und eine Abweichung der korrespondierenden Blobzentren von durchschnittlich $\sim 200\mu\text{m}$ finden. Der Abweichungsfehler entspricht damit etwa dem Durchmesser der Blobs und würde eine sichere Zuordnung von kleineren Strukturen zueinander nicht erlauben.

Die Krümmung des Kortex ist ein wesentlicher Faktor, der die Größe des Alignierungsfehlers beeinflussen kann. Die intrinsische Optical-Imaging-Technik ist auf eine zweidimensionale Darstellung der Kortexaktivität beschränkt. Die signalgebenden Strukturen sind allerdings in den drei Raumdimensionen der Kortexschichten verankert, die zudem noch in sich gekrümmt sind; in Makaken etwa durch die Faltung des Hirns, in kleineren Tieren durch kleine Kortextradien. Um Signalartefakten entgegenzuwirken, die durch die oberflächigen Blutgefäße eingebracht werden, wird standardmäßig die Fokusebene des Kamerasystems vor Beginn der Aufnahmen auf eine Kortextiefe von ca. $200 - 400\mu\text{m}$ eingestellt (Ratzlaff und Grinvald, 1991) und damit in die supragranulären Schichten 2/3 verlagert, die sich in Primaten bis zu einer Tiefe von ca. $600\mu\text{m}$ in Nagern ca. $500\mu\text{m}$ erstrecken (Murphy et al., 1995; Mrcic-Flogel et al., 2003; Weber et al., 2008). Es ist jedoch unklar, zu welchen Anteilen die einzelnen Schichten zu der Signalentstehung beitragen. Und so lässt sich schwer abschätzen, aus welcher Kortextiefe die aufgezeichneten Signale tatsächlich stammen. Dies ist jedoch zumindest theoretisch wichtig, um über eine Berechnung der Punktspreizfunktion der signalgebenden Struktur (die bedingt ist durch die optischen Eigenschaften des umliegenden Hirngewebes) deren Aufweitung (*blurring*) im Fokusbereich bestimmen zu können (Orbach und Cohen, 1983; Polimeni et al., 2005). Zudem kommt ein

Parallaxe-Fehler hinzu, der durch die 2-dimensionale Abbildung der (im gekrümmten Kortex) vertikal verlaufenden Gefäße eine weitere Ungenauigkeit bewirkt (Xiao et al., 2007). Da die Achse der vertikalen Gefäße praktisch nie parallel zu der Achse des optischen Systems verläuft, weichen Gefäßanschnitte in histologischen Präparaten mit zunehmender Kortextiefe zwangsläufig in zunehmendem Maße von den, an der Oberfläche kartierten, Gefäßpositionen ab. Dieser Fehler war in bisherigen Studien mit $\sim 50 \mu\text{m}$ angegeben worden (Roe et al., 2005). Nur in wenigen Studien, in denen Optical-Imaging-Daten mit histologischen Daten aligniert wurden, ist dieser Fehler tatsächlich gemessen worden.

Polimeni et al. (2005) berichten zusammenfassend über die Ergebnisse mehrerer Untersuchungen der räumlichen Auflösung der Optical-Imaging-Technik. Sie berechneten die Punktspreizfunktion für standard-experimentelle Bedingungen (entsprechen dem hier verwendeten Aufbau) und geben die erreichbare Auflösung mit rund $250\mu\text{m}^2$ an. Daraus resultiert ein statistischer Fehler bei der Lokalisation der Position eines Pinwheelzentrums von $116\mu\text{m}$, der nach Polimeni et al. (2005) groß genug ist, um eine sichere Zuordnung von Pinwheelzentren und Blobs zu verhindern. Nimmt man die methodischen Abweichungsfehler, die bei der Alignierung auftreten, den statistischen Fehler des Optical-Imaging und weitere Einflüsse, die durch physiologische Artefakte wie Atmung und Puls eingebracht werden, ergibt sich für die Genauigkeit solcher funktionell-histologischen Zuordnungen ein eher ernüchterndes Bild. Adams und Horton (2009) bezeichnen das als: "... *the vexing problem of alignment*".

3.4 Elektrophysiologie

"...accurate alignment of electrode penetrations with individual recording sites in the tissue can be exasperatingly difficult."

(aus: *Ocular Dominance Columns: Enigmas and Challenges*, Adams und Horton (2005))

Ursprünglich war geplant, die Daten, die in diesem Projekt durch die Optical-Imaging-Technik gewonnen wurden, durch elektrophysiologische Ableitung im Stil der klassischen Experimente von Hubel und Wiesel (Hubel und Wiesel, 1977) zu unterstützen, um die Methoden gegeneinander validieren zu können. Daraus sollten Aussagen erzielt werden können, in wieweit das intrinsische/haemodynamische Signal in seiner räumlichen Ausbreitung dem der elektrophysiologisch aufgezeichneten Zellantworten entspricht. Der Interessenfokus lag hier vor allem darin, den Verlauf der Abfolge von Orientierungspräferenzen bimodal abzubilden, um die räumliche Genauigkeit der so erlangten topographischen Orientierungskarten miteinander vergleichen zu können. Zudem sollte diese Methodenkombination Aufschluss darüber bringen, in wieweit Bereiche mit nicht-orientierungsselektiven Zellpopulationen (etwa Blobs) sich auf die Topografie der Orientierungskarten auswirken.

² $250\mu\text{m}$ ist in diesem Fall die Breite der Helligkeitsverteilung auf halber Höhe zwischen Intensitätsmaximum und Intensitätsminium (FWHM *Full Width Half Maximum*) bestimmt durch die Punktspreizfunktion.

Es wurden jedoch in Vorversuchen an Ratten und Weißbüschelaffen eine Reihe von Problemen deutlich, die die Methodenkombination erschwerten. Zum einen zeigte sich durch die ins Gewebe eingestochenen Elektroden ein starker Einfluss auf die CytOx-Färbung (siehe Kapitel 4.1. supplementary figures). Zum anderen kam es in mehreren Fällen zu einer Schädigung der Oberflächenblutgefäße und als Folge davon zu Einblutungen ins Gewebe entlang der Elektrodeneinstiche, wodurch sich wiederum Probleme bei der Alignierung ergaben. In Versuchen mit einer Wolframelektrode (200µm Durchmesser) konnte in V1 von Weißbüschelaffen erfolgreich orientierungsspezifische Aktivität abgeleitet werden. Es zeigte sich jedoch auch, dass auf diese Weise ein zusätzlicher Zeitaufwand von etwa 15 Stunden entstanden wäre, um an genügend vielen Positionen abzuleiten, damit ein Vergleich mit den Optical-Imaging-Daten möglich geworden wäre. Dadurch wäre ein Gesamtversuchsdauer von über 40 Stunden entstanden, die unter den gegebenen Bedingungen nicht realisierbar waren. Als Alternative zu den Einzelableitungen wurde versucht, dieses Problem durch laminaire Multikanalelektroden (beispielsweise mit einer Elektrode des Typs NeuroNexus A2x16-10mm100-500-413 mit 32 Ableitstellen, www.neuronexus.com) zu umgehen. Jedoch konnte mit diesem Elektrodentyp -wenn er **parallel** zu den oberen Schichten eingestochen wurde- keine neuronale Aktivität aufgezeichnet werden. Vermutlich kommt es beim Einstechen der bis zu 200µm breiten Flachelektroden zu einer Durchtrennung von vertikal verlaufenden Fasern, die dazu führt, dass die nach unten gerichteten Ableitstellen keine Signale von den anliegenden und geschädigten Neuronen empfangen.

Dieser Ansatz wurde aufgrund der unerwartet hohen Anzahl an Artefaktquellen sowie des begrenzten zeitlichen Rahmens dieser Arbeit nicht weiter verfolgt, zumal mit der Entwicklung einer Stimulations-Methode zur Darstellung der Blobs mittels Optical-Imaging ein Großteil der Notwendigkeit der Methodenkombination nicht mehr gegeben war.

3.5 Das Tiermodell *Weißbüschelaffe* (*Callithrix jacchus*)

"...marmosets are the dwarfs of New World anthropoids...[.]...making marmoset visual cortex fertile ground for pursuing issues of cortical functional organization and plasticity."

(aus: Optical Imaging of Functional Organization of V1 and V2 in Marmoset Visual Cortex. Roe et al., 2005.)

Weißbüschelaffen (lat. *Callithrix jacchus*; engl. *Common marmoset*) gehören zur Familie der Krallenaffen (*Callithrichidae*, Teilordnung: Neuweltaffen (*Platyrrhini*), Gattung: Marmosetten (*Callithrix*)) und damit zu den echten Primaten. Sie sind die am häufigsten verwendeten Primaten im Bereich der pharmakologischen und medizinischen Forschung (Mansfield (2003); Information des DPZ). Weißbüschelaffen sind mit ca. 18 Monaten adult und weisen dann ein Körpergewicht von ~350-600 Gramm auf. Diese Affenart bietet für die neurowissenschaftliche Forschung mehrere Vorteile. Das kleine Gehirn von Weißbüschelaffen weist einen glatten, ungefalteten (*lissencephalic*) Kortex auf (McLoughlin und Schiessl, 2006), der histologische und auch funktionelle Untersuchungen vereinfacht. Entsprechende Chirurgie- und Narkoseprotokolle erlauben es, an diesen fragilen Tieren

Langzeitexperimente unter Narkose von bis zu 72 Stunden Dauer z.B. für neurophysiologische Ableitungen durchzuführen (Bourne und Rosa, 2003). Zudem entspricht das visuelle System der Krallenaffen in seinen Grundzügen dem des Menschen und ist vor allem in Studien der visuellen Wahrnehmung ein herausragend wichtiges und gut untersuchtes Tiermodell (Kaas et al., 1978; Spatz, 1989; Tovée et al., 1992; Williams et al., 1992; Hunt et al., 1993; Troilo et al., 1993; Yeh et al., 1995; Fritsches und Rosa, 1996; Kremers und Weiss, 1997; Martin et al., 1997; Rosa et al., 1997; Markstahler et al., 1998; Whelan et al., 1999; Kawamura et al., 2001; Solomon, 2002; Schiessl und McLoughlin, 2003; Blessing et al., 2004; McLoughlin et al., 2005; Roe et al., 2005; Boretius et al., 2006; Lui et al., 2006; McLoughlin und Schiessl, 2006; Bourne et al., 2007; Troilo et al., 2007; Victor et al., 2007; Guyomard et al., 2008; Nowak und Barone, 2009; Tailby et al., 2010; Martin et al., 2011). Zum anderen ähneln Weißbüschelaffen in Körpergröße und Gewicht einer adulten Labormaus, so dass experimentelle Bedingungen für Versuche an Weißbüschelaffen (z.B. Chirurgie und Narkosetechniken) im Vorfeld ersatzweise an Mäusen erprobt und optimiert werden können (siehe auch Bild 11).

Mittlerweile ist es sogar gelungen, transgene Weißbüschelaffen zu züchten, denen das grün-fluoreszierende Protein GFP ins Genom eingeschleust wurde (Sasaki et al., 2009), so dass zu erwarten ist, dass in naher Zukunft transgene Phänotypen für Untersuchungen zur Cytoarchitektur des Kortex zur Verfügung stehen.

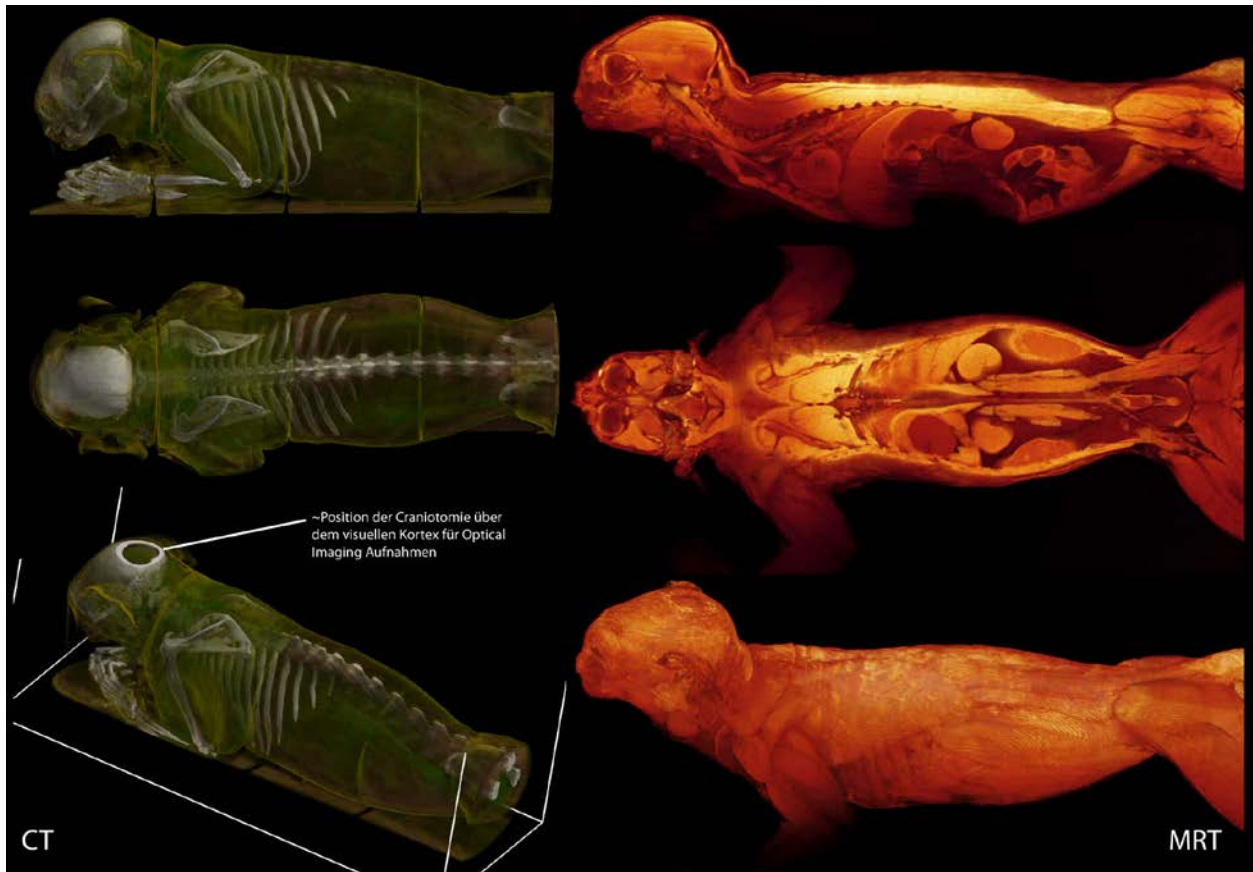


Bild 11. Das Tiermodell *Callithrix jacchus*. 3D-Rekonstruktion (in Amira, Visage Imaging) der Anatomie eines Weißbüschelaffen, dargestellt mittels Computertomographie (CT) links und Kernspintomographie (MRT) rechts. Auflösung: CT=50um; MRT= ~200um. Der CT-Scan wurde durchgeführt mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Bernd Pichler im Kleintier-CT der Universität Tübingen (Labor für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie). Der MRT-Scan wurde in Kooperation mit Dr. Rolf Pohmann in einem 3 Tesla MRT am MPI für biologische Kybernetik Tübingen (Arbeitsgruppe Hochfeld-Magnetresonanz Zentrum) durchgeführt.

3.6 Besonderheiten des visuellen Systems von Weißbüschelaffen

3.6.1 Dichotomie der Farbwahrnehmung: Dichromaten vs. Trichromaten

Das visuelle System von Weißbüschelaffen weist eine Besonderheit auf, die für Neuweltaffen typisch ist (Jacobs et al., 1993; Gerald H, 1998). Eine Dichotomie im Farbsehen dieser Tiere lässt vermuten, dass sie den Übergang von einer frühen 'farbenblinden' Entwicklungsstufe der Primaten hin zum vollfarbsichtigen Affen repräsentieren. In Weißbüschelaffen werden die Gene, die das Sehpigment der retinalen S-Zapfen kodieren, autosomal vererbt und sind damit in jedem Tier vorhanden. Jedoch ist die Vererbung der Gene für die M- und L- Rezeptorpigmente an die Geschlechtschromosomen gebunden. Auf jedem X-Chromosom liegt nur ein Gen für die Kodierung von einem von drei möglichen M- bzw. L-Sehpigmenten (Absorptionsmaxima: 543nm, 556nm, 563nm). Um zwischen roten und grünen Farbtönen unterscheiden zu können, braucht ein Tier zwei dieser Gene, die jeweils ein unterschiedliches Sehpigment kodieren (S, M, L; Trichromaten) müssen (Bild 12). Da aber nur Weibchen über zwei X-Chromosomen verfügen, sind alle Männchen - sowie Weibchen, deren X-Chromosomen die gleichen

Gene tragen - farbenblind (Rot-Grün blind; Dichromaten). Daher verfügt nur ein Teil der Weibchen über volle Farbsichtigkeit.

Durch diese genetische Diversität bieten Weißbüschelaffen ein einzigartiges quasi-natürliches Knockout Modell für die Entwicklung von Farbwahrnehmung in Primaten. Es gibt innerhalb der Hirnforschung an Primaten wohl kaum ein vergleichbares Phänomen, das eine solche Ausgangsbasis für die Untersuchung von anatomisch-funktionalen Zusammenhängen bietet. Der phänotypische Status eines Tieres lässt sich relativ leicht durch genetische Analysen feststellen (Signer et al., 2000; Kawamura et al., 2001) oder durch elektrophysiologische Ableitungen im LGN oder V1 nachweisen (Victor et al., 2007; Buzás et al., 2008). Und so werden in einer Reihe von verschiedenen Studien di- und trichromatische Weißbüschelaffen für vergleichende Untersuchungen genutzt (Yeh et al., 1995; Solomon, 2002; Victor et al., 2007). Yeh et al. (1995) zeigen, dass dichromatischen Weißbüschelaffen nicht nur das Sehpigment fehlt, sondern dass es durch den "genetischen Mangel" auch zu Unterschieden in der zellulären Ausstattung des LGN kommt. Dichromaten fehlen die Parvo-Zellen, die in Trichromaten Informationen über Rot-Grün Kontraste an den visuellen Kortex weiterleiten. Die Parvo-Zellen der Dichromaten reagieren hauptsächlich auf Helligkeitsunterschiede, wie es auch von einige Parvo-Zellen in Trichromaten bekannt ist. Untersuchungen von Solomon und Lennie (2007) deuten an, dass trotz dieser Unterschiede im LGN die thalamo-kortikalen Verbindungen, in beiden Phänotypen gleich sind.

3.6.2 Besonderheiten der Architektur V1 und dem LGN in Weißbüschelaffen

Das LGN von Weißbüschelaffen ist das Ziel zahlreicher Studien gewesen. Es fällt im Nissl-Präparat, anders als im Makaken, durch seine stark ausgeprägten koniozellulären Schichten auf. Durch Antikörperfärbungen gegen die Kalziumbindende-Proteine Calbindin und Calmodulin lassen sie sich im histologischen Präparat gezielt darstellen (Hendry und Yoshioka, 1994; Sincich et al., 2010). Daher eignet sich das LGN von Weißbüschelaffen gut für elektrophysiologische Untersuchungen. Vor allem von der Arbeitsgruppe um Paul Martin ist dies für ausführliche Studien genutzt worden (Solomon, 2002; Solomon et al., 2002; Blessing et al., 2004; Forte et al., 2005; Forte et al., 2006; Victor et al., 2007; Buzás et al., 2008; Hashemi-Nezhad et al., 2008; Tailby et al., 2010; Martin und Solomon, 2011). So waren sie die ersten, die den Nachweis für Blau-An Zellen in den koniozellulären Schichten erbrachten (Martin et al., 1997; Hendry und Reid, 2000). Sie zeigten auch, dass sowohl in di- als auch in trichromatischen Weißbüschelaffen die Konio-Zellen direkte Projektionen in die Blobs ausbilden (Martin et al., 1997; Solomon, 2002). In neueren Studien konnten sie nachweisen, dass bei einer Untergruppe von Konio-Zellen im LGN sowohl Orientierungselektivität als auch Richtungselektivität zu finden sind (Forte et al., 2005; Tailby et al., 2010).

Ebenso wie das LGN ist auch der primäre visuelle Kortex von Weißbüschelaffen durch eine Vielzahl von Studien detailliert beschrieben. Fritsches und Rosa (1996) messen, dass V1 in adulten Weißbüschelaffen eine Fläche von ca. 192-217mm² einnimmt (zum Vergleich: Fläche von V1 im adulten Makaken ~1163 mm²; Fläche von V1 in der adulten Ratte ~11 mm² (Duffy et al., 1998). Solomon (2002) findet in Weißbüschelaffen eine Dichte von 3.9-5.5 Blobs/mm². Der kortikale Vergrößerungsfaktor wird von Fritsches und Rosa (1996) sowie Liu und Pettigrew (2003) mit 0.73°/mm angegeben und ist damit etwa halb so groß wie der von Makaken (Roe et al., 2005).

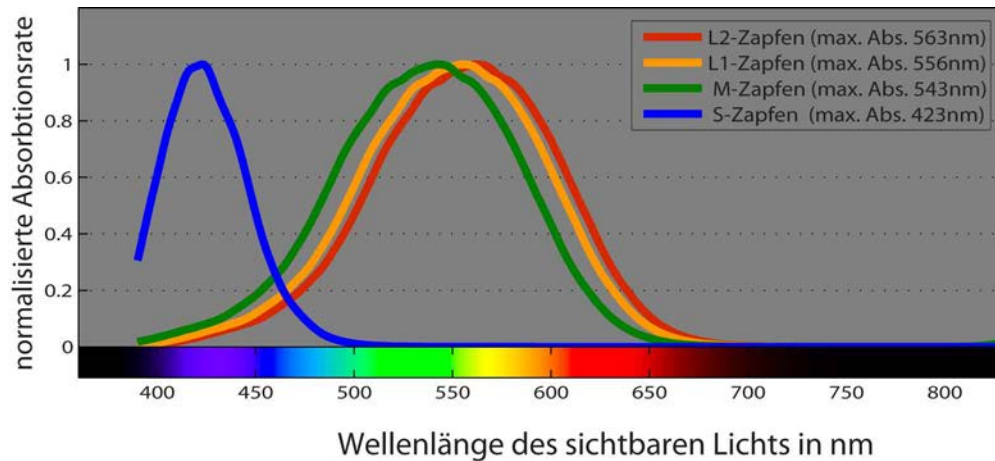


Bild 12. Absorptionsspektren der retinalen Photorezeptoren. S-Rezeptoren (blau) werden in Weißbüschelaffen autosomal angelegt. Die Gene für M- und L-Rezeptoren (grün, rot) werden über das X-Chromosom vererbt. Nur Weibchen mit 2 unterschiedlichen Rezeptortypen können zwischen roten und grünen Farbtönen unterscheiden (Trichromatismus).

McLoughlin und Schiessl (2006) vermessen die Periodizität der Orientierungskolumnen in Optical-Imaging-Orientierungskarten, aufgenommen in Weißbüschelaffen, und finden in V1 einen Wiederholungsabstand von $\sim 577\mu\text{m}$ und in V2 von $1067\mu\text{m}$. Zum Vergleich: in V1 von Makaken finden Obermeyer und Blasdel (1993) mit der gleichen Methode eine Periodizität von $700\mu\text{m}$, $715\mu\text{m}$.

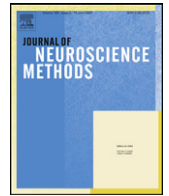
Gleich mehrere Studien haben in Weißbüschelaffen nach ODK gesucht. Spatz und Markstrahler (1998) zeigen durch 2-DG Autoradiographie, dass ODK scheinbar nur in jungen Tieren vorkommen und in adulten Tieren verloren gehen. Chappert-Piquemal et al. (2001) konnten durch [^3H]Prolin Injektionen in einigen juvenilen und adulten Weißbüschelaffen ODK zeigen. Roe et al. (2005) versuchten ODK mittels Optical-Imaging in Weißbüschelaffen nachzuweisen und fanden in 2 von 4 Tieren schwach ausgebildete ODK. McLoughlin und Schiessl (2006) sowie McLoughlin et al. (2005) und Schiessl et al. (2003) finden in ihren ausgiebigen Optical-Imaging-Studien an Weißbüschelaffen keinen Hinweis auf ODK. Durch diese Untersuchungen scheint sich für Weißbüschelaffen eine ähnliche Variabilität bei der Ausprägung von ODK zu bestätigen, wie sie auch für andere Neuweltaffen gezeigt wurde (Roe et al., 2005; Adams und Horton, 2009). So zeigen auch die von Chappert-Piquemal et al. (2001) dargestellten ODK einen ähnlich unregelmäßigen Verlauf wie die von Adams und Horton (2005) in Totenkopffaffen gezeigten ODK. Der Durchmesser der von Chappert-Piquemal et al. (2001) gefundenen Kolumnen beträgt $211\text{-}257\mu\text{m}$.

Im Gegensatz zu den zahlreichen Arbeiten über die Cytoarchitektur des LGN und der Ausbildung von ODK in Weißbüschelaffen gibt es nur wenige Studien über die Farbselektivität in V1 in dieser Affenart. Roe et al. (2005) testen die in ihrer Studie untersuchten Tiere zusätzlich zur Ausbildung von ODK ebenfalls auf Farbwahrnehmung. Dazu verwenden sie chromatische Rot/Grün- und Blau/Gelb-Strichreize und wenden ein übliches Differenzverfahren an, um ein farbenspezifische Aktivierung aufzudecken. Da sie in dieser Studie jedoch ausschließlich männliche Tiere (Dichromaten) untersuchen, finden sie ihrer Erwartung entsprechend keine spezifischen Aktivierungsmuster.

Mit dem Ziel, speziell die koniozellulären Bahnen in dichromatischen Weißbüschelaffen zu stimulieren und so eine Aktivierung der Blobbereiche in V1 zu erreichen, nutzen Buzás et al. (2008) die gleichen Rot/Grün- und Blau/Gelb-Strichreize. Doch auch sie konnten keinen Nachweis für die Aktivierung der Blobs durch Farbreize finden. Sie schließen daraus, dass die Signale der S-Zapfen homogen durch die Konio-Afferenzen in V1 verteilt werden und nicht, wie aufgrund der anatomischen Daten zu erwarten wäre, ausschließlich in die Blobs gelangen.

4 Publikationen

4.1 Multimodal Vessel Mapping for Precise Large Area Alignment of Functional Optical Imaging Data to Neuroanatomical Preparations in Marmosets.



Multimodal vessel mapping for precise large area alignment of functional optical imaging data to neuroanatomical preparations in marmosets

Matthias F. Valverde Salzmänn^{a,*}, Damian J. Wallace^a, Nikos K. Logothetis^{a,b}, Almut Schüz^a

^a Max Planck Institute for Biological Cybernetics, Spemannstrasse 38, 72076 Tübingen, Germany

^b Division of Imaging Science and Biomedical Engineering, University of Manchester, Manchester M13 9PL, United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 March 2011

Received in revised form 28 July 2011

Accepted 30 July 2011

Keywords:

Alignment

Optical imaging

Multimodal vessel mapping

Cytochrome oxidase

Pinwheels

Marmoset

ABSTRACT

Imaging technologies, such as intrinsic optical imaging (IOI), functional magnetic resonance imaging (fMRI) or multiphoton microscopy provide excellent opportunities to study the relationship between functional signals recorded from a cortical area and the underlying anatomical structure. This, in turn, requires accurate alignment of the recorded functional imaging data with histological datasets from the imaged tissue obtained after the functional experiment. This alignment is complicated by distortions of the tissue which naturally occur during histological treatment, and is particularly difficult to achieve over large cortical areas, such as primate visual areas. We present here a method that uses IOI vessel maps revealed in the time course of the intrinsic signal, in combination with vascular casts and vascular lumen labeling techniques together with a pseudo three dimensional (p3D) reconstruction of the tissue architecture in order to facilitate alignment of IOI data with posthoc histological datasets. We demonstrate that by such a multimodal vessel mapping approach, we are able to constitute a hook in anatomical-functional data alignment that enables the accurate assignment of functional signals over large cortical regions. As an example, we present precise alignments of IOI responses showing orientation selectivity of primate V1 with anatomical sections stained for cytochrome-oxidase-reactivity.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Understanding the relation between functional and structural properties of the cortex relies strongly on the accuracy of the alignment of functional data, recorded in *in vivo* experiments, and the cortical architecture. In the case of comparative intrinsic-optical-imaging (IOI) studies, this requires correlation of intrinsic signal maps with histologically processed parts of the cortex. This is an exceedingly difficult task, since two major challenges have to be overcome: first, one needs to make an accurate three dimensional reconstruction of the histological sample from serially cut sections, and second, one needs to align the obtained reconstruction to the intrinsic signal maps.

Hence, it might not be surprising that a number of reports on the visual cortex show discrepancies in their findings on the spatial relationships between singularities found in functional orientation preference maps called pinwheels (Blasdel and Salama, 1986; Bonhoeffer and Grinvald, 1991; Swindale et al., 1987) and

patches of higher enzymatic reactivity in histochemical stains for cytochrome oxidase (CytOx). In some of these studies, such patches - commonly referred to as blobs (Carroll and Wong-Riley, 1984; Horton and Hubel, 1981; Livingstone and Hubel, 1982) - and the center of pinwheels were found not to coincide, whereas, others draw the conclusion founded on a statistical error analysis of the IOI signal, that due to the discussed spatial resolution of optical imaging a co-localization of these singularities remains an admissible hypothesis (Polimeni et al., 2005), see also review by Adams and Horton (2009).

There are a number of technical and methodological obstacles that hinder efforts at resolving this example discrepancy (Adams and Horton, 2009). One key issue is the accuracy with which responsive regions in intrinsic imaging maps can be identified. The spatial accuracy of IOI signals and the subsequent informative value of orientation maps are determined primarily by the sensitivity and resolution of the camera system. The computational requirements for processing large data volumes such as those generated by intrinsic imaging has previously been a complicating factor, however, the rapid development of fast processors, large convenient to use data storage devices and increased availability of user-friendly computer scripting languages has substantially increased the scope for analysis of imaging data. Improvements in camera and computer technology have also resulted in a progressive reduction in the use of spatial and temporal binning of IOI data. Simultaneous with

* Corresponding author at: Department of Physiology of Cognitive Processes, Max Planck Institute for Biological Cybernetics, Spemannstrasse 38, 72076 Tübingen, Germany. Tel.: +49 7071 6011703; fax: +49 7071 601652.

E-mail address: matthias.valverde@tuebingen.mpg.de (M.F. Valverde Salzmänn).

technological improvements, development of alternative stimulus paradigms (Kalatsky and Stryker, 2003; Mrsic-Flogel et al., 2003), improvements of chamber design (Arieli and Grinvald, 2002; Chen et al., 2002), and altered anesthetic or drug protocols (Bourne and Rosa, 2003; Pattinson et al., 2006), have all improved the quality of IOI data in a variety of animal preparations (see also Zepeda et al., 2004).

In contrast to the advances in intrinsic imaging technology and methodology, the improvements in histological processing methodologies have been somewhat slower. In fact, techniques for processing previously recorded cortical regions with the aim of investigating relationships between functional signals and cytoarchitectural properties of the brain (e.g. CytOx-densities) have not changed much in the last decades. The quality of alignments is critically influenced by distortions of the tissue which occur during histological processing, as well as by the curvature of the cortex, which is particularly problematic in preparations where the tissue needs to be cut parallel to the cortical layering. This restricts highly precise assignments to small cortical regions. However, the accuracy of histological alignment is as crucial to consider when dealing with spatial accuracies, as the correct data filtering might be in case of pinwheel positions and densities (Macke et al., 2011; Polimeni et al., 2005).

In most optical imaging experiments high resolution green images of cortical surface illuminated with light at 540 nm wavelength (Bonhoeffer and Grinvald, 1991) of the surface vasculature are used with the goal of aligning functional datasets to histological preparations by finding similarities between the vascular image and the pattern of cross sections of vertical vessels in tangential sections (Kaskan et al., 2007; Lu and Roe, 2008; Roe et al., 2005; Xu et al., 2004). In some cases lesions and/or dye marks are used for further alignment support (Bartfeld and Grinvald, 1992; Landisman and Ts'o, 2002; Yoshioka et al., 1996). For ease of histological preparation the flat mount technique (Horton and Hocking, 1996) was adopted in numerous optical imaging studies, even though the use of flat mounts in such studies compromises the accuracy of the alignment. By flat mounting part of a cortex, its physiological shape - as it is present in the *in vivo* conditions of functional recordings - is transformed in a rather erratic way. Flat mounts are suitable for cutting sections in parallel to the layers but more spatial inaccuracies are introduced to the alignment - in addition to the statistical error of the IOI signal, in all cases where no attention is paid to the cortical curvature and the resulting radial orientation of vasculature and columnar structures such as orientation columns or CytOx-blobs within the imaged tissue.

Recent developments on the basis of vascular lumen casts with fluorescence labeled hydro gels (Tsai et al., 2009) allow methodological approaches that facilitate 3 dimensional (3D) reconstructions of the cortical tissue. This becomes technically feasible due to the increased visibility of the cortical vasculature. We tested such an approach for its practicability and its advantages for precise alignments of large cortical areas. We describe a technique for pseudo 3D (p3D) reconstruction made from a series of tangential sections of the imaged part of the cortex, which avoids the need for flat mount histology thus bypassing one of the methodological sources of tissue distortions.

Our recent findings (Valverde Salzmänn et al., 2011) demonstrate this method to be of particular use for facilitating the alignment of volumetric datasets of ultra high field MRI to histological preparations. There, contrast agents based on gadolinium, or iron oxide particles were added to the casting medium to improve the visibility of the vasculature in the data.

The dense vascular net of the cortical surface, and its richness of topological detail revealed by the vascular cast was found to be of excellent value to counteract the problem of tissue distortions during histological procedures. It emerged that an image of

this vascular cast is particularly suitable to serve as an exact template of the physiological shape. By this a well-founded correction of distortions can be achieved and thus the accurate alignment of histological section to each other and the alignment of functional maps to the cortical architecture are considerably facilitated.

Therefore, we introduce here a new methodological approach for an accurate alignment of functional data, such as IOI maps, to histological preparations over large cortical areas. This approach combines: (a) a processing technique for visualization of vascular surface patterns in IOI data, (b) a preparation technique for microscopic visualization and histological stabilization of the lumen of the superficial cortical vasculature; (c) a computational approach for precise p3D reconstruction of the imaged tissue architecture, and (d) the registration of the histological datasets to optical imaging data by the use of a high resolution image of the vascular net of the cortical surface.

We demonstrate that the proposed method enables highly accurate alignments in combined functional histological investigations. The statistical error of the common alignment procedure where the green image and vessel cross sections in histological preparations are correlated was measured. A mean displacement error for the position of cortical landmarks in the anterior-posterior and medial-lateral plane of $360.03 \pm 286.77 \mu\text{m}$ and $161.10 \pm 118.84 \mu\text{m}$ was found. The presented approach minimizes this error.

Hence, we suggest that this method fills a gap in the conventional data processing methodology and offers a new tool to ensure a high degree of accuracy in neurophysiological alignments.

2. Material and methods

2.1. Animals

Five adult Marmosets (*Callithrix jacchus jacchus*) were used for this study (as part of a more extended optical imaging study on the visual system). In 3 of the five marmosets a p3D reconstruction of the imaged visual regions was done and the two of these reconstructions were used to calculate the alignment error. Red and green light IOI vessel maps were obtained from all animals. Due to their small, lissencephalic brains, Marmosets are a useful model for combined investigations on neuroanatomic-functional relations of the visual system of primates. The small brain size allows investigation of cortical areas over their entire extent and even make it possible to image several neighboring areas at the same time without being hindered by gyrifications, as it is the case, for example, in visual area V2 of macaque monkeys. The small brains also allow serial sectioning of whole lobes, hemispheres or the entire brain without ending up with an innumerable number of sections. All surgical and experimental procedures were approved by the local authorities (Regierungspraesidium) and are in full compliance with the directive of the European community for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC). The animals (400–550 g) were kept in pairs in enriched climatized cages of up to 6 m³ in size and received water ad libitum and daily fresh and changing fruits, vegetables, Arabic gum (Marmoset gum, Mazuri Europe, England), marmoset pellets (Mini Marex, Mazuri Europe) and animal proteins in form of eggs, locusts, mealworms.

2.2. Surgery, anesthesia

As a general guide line to the preparation of marmosets we oriented on the work of Bourne and Rosa (2003). The food of the animals was withdrawn on the evening before the day of the experiment. One hour prior to surgery the animals were transferred into a climatized handling box, received an intramuscular injection of atropine (Atropine sulfate 0.1 mg/kg, B. Braun Mel-

sungen, Melsungen, Germany) and diazepam (Diazepam 2 mg/kg, ratiopharm, Ulm, Germany). Anesthesia was induced using 4–5% Sevofluran (Sevorane, ABBOTT, IL, USA) in 100% medical O₂ introduced directly into the handling box until the animals became unconscious and could be transferred to the preparation desk. A custom made facemask was used for the ongoing administration of 4–5% Sevofluran in 100% O₂. The animals were then placed on a water flushed silicone gel pad and covered with a heated blanket both of which were connected to a software controlled thermostat (MC-4, Julabo Labortechnik, Seelbach, Germany) in order to ensure control of the animal body temperature. Temperature loss in marmosets is critical, therefore the body temperature was constantly kept at 37–38 °C. From that point on the ECG (150–250 bpm), S_pO₂ (98–100%) and rectal body temperature, as well as depth of anesthesia were monitored continuously. 0.1 ml Finadyne 1% (Flunixin, Essex Tierarznei, Munich, Germany) was injected intramuscularly for general analgesia. Dexamethason (Voren-Depot 0.3 mg/kg, Boehringer Ingelheim, Germany) was administered 30 min before craniotomy to counteract cerebral edema. VitaminK1 (Konaktion MM 2 mg/kg, Roche Basel, Switzerland) was given to counteract bleeding during surgery, and penicillin (Veracin compositum, Procain penicillin 25 mg/kg, Albrecht, Aulendorf, Germany) was administered to provide antibiosis. A 26G intravenous catheter was placed into the femoral vein by which a constant infusion of electrolytes Amynin (Merial, Hallbergmoos, Germany): Jonosteril (Fresenius Kabi, Homburg, Germany) (ratio 1: 2) was given systemically at 1.5 ml per hour. All incision sites of the later Tracheotomy and Craniotomy were pretreated with Lidocain-HCL (2%, B. Braun Melsungen) injections. Noxious stimuli were used to ensure appropriate anesthetic depth. When animals reacted by an increase in heart rate or nociceptive reflex the concentrations of Sevofluran were adapted.

2.2.1. Tracheotomy and craniotomy

A tracheotomy was performed and the animal was artificially respirated at 38–45 strokes/min through a modified siliconised endotracheal tube with a diameter of 2.5 mm (Rüschelit, Rüscheleflex medical, Kernen, Germany). The mixture of the anesthetic gas was changed to 4–5% Sevofluran in 70:30 Air:O₂. Monitoring of end tidal pCO₂ (kept at 34 ± 2%) started after implantation of the endotracheal tube. The pCO₂ level was adjusted by either changing respiration rate or stroke volume. Remifentanil (Ultiva, GlaxoSmithKline, Munich, Germany) at 0.06–0.1 µg/kg/min as a secondary anesthetic agent and Mivacuriumchlorid (Mivacron, GlaxoSmithKline) at 1 mg/kg/h for muscle relaxation were added to the intravenous infusion after the intubation. The rate of Sevofluran was reduced to 2–4% after the infusion of Remifentanil started to take effect. EEG electrodes were applied prior to craniotomy. For this purpose, holes of a diameter of 1 mm were drilled into the skull over the left frontal lobe and the right occipital lobe in order to connect custom made drop-shaped tips of silver wire electrodes directly to the dural tissue. A craniotomy of approximately 10 × 10 mm was performed over visual areas V1 and V2. The Dura mater remained intact and was constantly flushed with warmed (37 °C) saline during craniotomy and chamber installation. The chamber was filled with 6% agarose gel (Type VII Sigma–Aldrich Chemie, Munich, Germany).

2.2.2. Preparation for experimental conditions

For the experimental conditions, the rate of Sevofluran was carefully reduced to 0.5–1.5%. Atropine eye drops (Atropin, EDO, Bausch & Lomb, Berlin, Germany) were used to dilate the pupils. Vidisic eye gel (Bausch & Lomb) was used to protect the eyes. Animals were refracted to screen distance using an infrared video refractor (Livingstone and Hubel, 1984; Schaeffel et al., 1994; Troilo et al., 2007) and clear PMMA lenses (Soflex Israel Contact Lenses Ltd.,

Misgav, Israel). The eyes were moistened after each stimulus block. The hind- and forelimbs of the animals were massaged in regular intervals of 2 h and lungs were hyperinflated every hour. The combination of a volatile anesthetic agent and opioids allowed us to keep the concentration of Sevofluran at a low level (Yoshioka and Dow, 1996) during the experimental conditions while the animal stayed in an anesthetic depth that assured adequate analgesia, sedation and hypnosis, as indicated by constant low heart rate levels (150–250 bpm) and an EEG level typical for anesthetic level three. According to our experience long term anesthesia with Sevofluran results in fewer complications than the usage of Isoflurane does.

2.3. Optical imaging

We used a Dalsa 1M60 Pantera camera with a tandem lens system (Ratzlaff and Grinvald, 1991) in combination with the Imager 3001 (Optical Imaging Inc.) system for recording the intrinsic signal induced by visual stimulation. Images of the cortical reflectance changes were taken at 60 Hz. Clear access to the skull for surgical and functional imaging procedures was achieved using a custom made stereotactic device (see Fig. 1(B–F)). This device preserved a free field of view onto the stimulus screen and provided adequate stabilization against physiological motion artifacts. For illumination of the cortex, two 40 mm custom made plastic ring lights were used, each equipped with 6 red LEDs (Spektra measured with a Konica/Minolta CS1000 Spectrometer; peak wavelength (pw): 634 nm, Nichia 5 mm LED NSPR510CS, Lumitronix LED-Technik, Hechingen, Germany) or 6 green LEDs (pw: 525 nm Nichia 5 mm LED NSPG510AS, Lumitronix LED-Technik) radially arranged to illuminate the central area of the ring (Fig. 1(D)). The ring lights were plugged on to the custom built optical chamber providing an immediate homogeneous illumination of the cortical surface. The chamber consisted of a 20 mm titanium cylinder that was held in place for angular fine adjustments to the cortical surface by two mechanical arms attached to the stereotactic device. The chamber was additionally glued to the skull with dental acrylic (Revolution Formula 2, Kerr, Sybron Dental Specialties Inc, CA, USA). After the craniotomy the chamber was filled with agarose gel and sealed with a 5 mm thick clear plastic inlay that stabilized the cortical surface against motions induced by respiration and cardiovascular pulses. The chamber provided a simultaneous view of both primary and secondary visual areas. The focus of the camera was adjusted to a depth of approximately 300 µm below the apex of the cortical surface under red light illumination.

2.3.1. Visual stimulation and data recording

We used binocular stimuli consisting of full screen square wave gratings of 1.2 cycles per degree moving back and forth at 2 Hz per degree, orthogonally to stimulus orientation, on a 24" LCD screen (Belinea o.display 4.1; checked for flicker frequencies (Logothetis et al., 2009) and gamma corrected, Belinea, Wittmund, Germany) placed 50 cm in front of eyes of the animal. The screen spanned 55° horizontal × 37.5° vertical of the animal's central field of view. Reflectance changes were recorded at 60 Hz. Temporal binning was applied, resulting in a reduction of the raw frame rate to 5 Hz. Six orientations and a blank condition were presented randomly in 40 trials in a first block under red light illumination. A second block of the same set of stimuli were presented in 20 trials under green light illumination. The blank condition, as well as the interstimulus phases consisted of a gray screen adjusted in luminance to the mean luminance of the grating stimuli, calibrated by using a Konica Minolta LS100 luminance meter. All trials of each single condition were averaged. Thus, each stimulus condition showed the time course of the mean reflectance changes of 40 stimulations over 50 frames under red light conditions, or 20 stimulations over

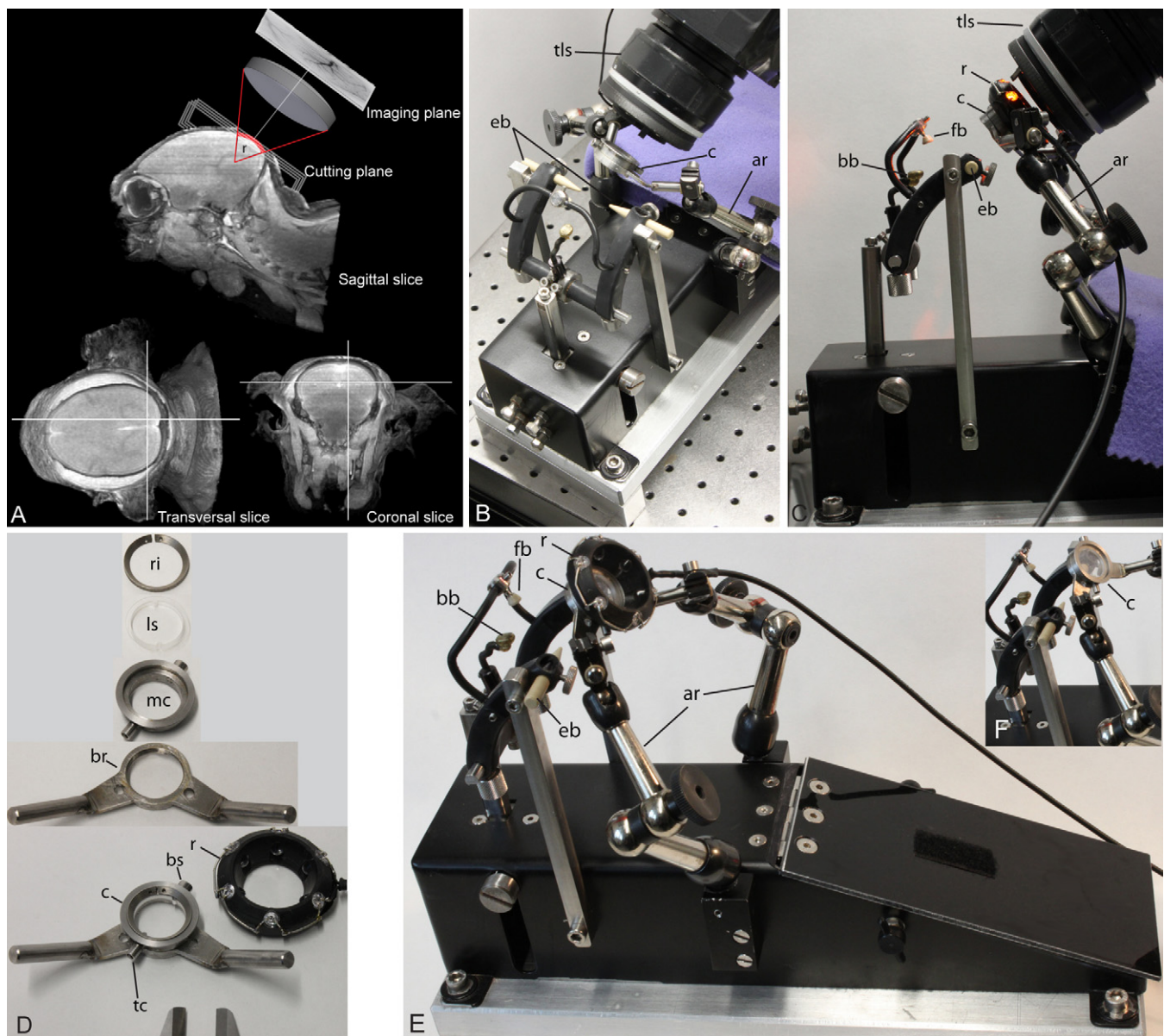


Fig. 1. Setup for optical imaging in marmosets. (A) Illustration of the cortical curvature of visual areas in marmosets and its influence on 2-dimensional mapping of cortical activity. MRI slices through the primary visual cortex are presented along the sagittal, coronal and transversal plane. White lines through the MRI images indicate the different slicing planes. On top of the sagittal slice a schematic drawing of the beam path of an IOI camera is shown that is centered on the primary visual area, as it is the case in typical IOI experiments. The cortical curvature within the visual area is traced in red and the angle of the curvature is indicated by the label (r). The red angle gives an impression of the spreading of the angular orientation of radial structures within a ROI. We added a sketch of the cutting plane to illustrate the necessity of a precise adjustment of the cutting plane to the imaging plane if an accurate alignment is intended. The same applies for the adjustment of the scanning plane of the microscope to the focal plane of the IOI camera. (B) Top view and (C), lateral view of the custom made stereotactic apparatus. The lower macroscope lens (tls) of the optical imaging camera is shown in the upper right part of the image to illustrate the arrangement of the imaging system and stereotactic apparatus during experimental conditions. The animals head is fixated using ear bars (eb) a forehead button (fb) and a palatal bite bar (bb). Two mechanical arms (ar) fixate the optical chamber (c) over the visual cortex region and allow to adjust the angle of the chamber plane prior to the final attachment with dental acrylic. D, the assembled chamber made of titanium and stainless steel is shown below. It is made up of a base ring (br) with two wings by which it can be connected to the mechanical arms. The base ring is glued to the skull before craniotomy. The main cylinder (mc) is screwed on the base ring. A tube connector (tc) allows to inject either agarose or silicone oil into the assembled chamber. A screw (bs) on the upper part of the mc enables a controlled removal of air. A transparent polyacryl inlay/lens (ls) is placed inside the mc. The clamp ring (ri) locks the lens. The lens can be removed easily for the replacement of agarose or medical treatment of the underlying tissue. The ring light (r) shown in D contains 6 × 5 mm LEDs (see Section 2 for details). The axes of the LEDs target the center region of the ring in an angle of 45 degree. During experimental conditions the back part of the LEDs is covered with black tape. An adapter on the lower side of the ring light allows a tight connection to the collar of the main cylinder. Scale bar 1 cm. Complete view of the stereotactic apparatus in E, with mounted ring light (see also C) and without ring light in F.

50 frames under green light conditions. Stimuli were presented for 4 s, 2 s after frame recording started. Interstimulus intervals ranged between 13 and 15 s.

2.3.2. IOI data processing

IOI data processing was carried out using custom written scripts executed in Matlab (The MathWorks, Inc., MA, USA). Image process-

ing was done pixel wise in all cases. Map calculations and filtering were based on protocols of single frame map calculation as published by Lu and Roe (2007). In order to preserve the development of the intrinsic signal over time, we calculated single conditions maps and differential maps for all relevant frames (46 of 50) of the raw data. Single condition maps were calculated by applying a frame zero subtraction (Bonhoeffer and Grinvald, 1996). The frame zero

for each condition was calculated by averaging the six frames prior to stimulus onset. Before subtraction, a sliding 7-frame temporal binning procedure was applied to further enhance the images: the relevant frames ($fr_{n>3} \dots n < 46$) in the raw data time series and their corresponding 6 nearest neighbor frames [$fr_{n-3} \dots fr_n \dots fr_{n+3}$] were averaged. The frame zero was then subtracted from each of the resulting 46 mean frames. To normalize the optical reflectance changes the fractional changes ($\Delta R/R$) were calculated by dividing each mean frame by the frame zero, as described by Lu and Roe (2007). Each map of the resulting series was then filtered by a Gaussian filter ($5 \times 5 \times 2$ pixel kernel) and a reduction of low frequency noise was carried out by applying a circular mean filter (100 pixel diameter) to the map and subtracting the filter result from the map, as described elsewhere (Lu and Roe, 2007). Differential maps of every stimulus condition were calculated by subtracting each frame of one “orientation” condition from the corresponding frame of its orthogonal stimulus condition. To increase the contrast of the differential maps we set a threshold level of $\pm 2\%$ for clipping the pixel intensities. Orientation preference maps were created using the weighted vector averaging approach (Macke et al., 2011) which was applied to all corresponding frames of the 6 single condition map series. Usually, the frames that corresponded to the time point of the peak of the initial dip revealed the strongest maps and were used in the present study.

2.3.3. IOI vessel maps

The late frames of the single condition map series in red and green light conditions show highly branched macrovascular structures. In both conditions, frame 43 exhibited the surface pattern most clearly and was extracted. This was done before filtering was applied to single condition maps. The 2 unfiltered frames were then averaged in order to produce a mean vessel map containing both macrovascular components. In the following text, this map will be referred to as the IOI vessel map. Furthermore, the time course of the intrinsic signal was calculated to correlate the appearance of the vascular pattern and the state of the intrinsic response.

2.4. Perfusion

One day in advance 30 ml of a 3% gelatin (porcine skin gelatin, Sigma–Aldrich) in 0.1 M Phosphate Buffer (PB) solution containing 300 mg of FITC-labeled albumin (A9771-1G Albumin, Fluorescein isothiocyanate conjugate bovine, Sigma–Aldrich) was prepared, following largely the procedure by Tsai et al. (2009). The solution was stored at 42 °C to remain in liquid phase until perfusion.

2.4.1. Initializing perfusion in marmosets

At the end of data acquisition the anesthetic depth of the animals was increased by raising the concentration of Sevofluran to 5%. Remifentanil infusion was increased to 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$. 0.5 ml Heparin (Heparin-Natrium-25000, ratiopharm) followed by a lethal dose of pentobarbital (1.5 ml Narcoren 160 mg/ml) injected intracardially.

2.4.2. Vascular cast

During perfusion a silicone gel pad preheated to 40 °C kept the body temperature of the animal at 36–38 °C to avoid an early curing of the gelatin that would prevent the complete filling of the vascular system. All perfusion solutions were preheated to 42 °C and infused into the vascular system of the animal using a peristaltic pump (Reglo digital, ismatec, Wertheim-Mondfeld, Germany) at 23 ml/min flow rate and a 15G stainless steel feeding needle as intracardiac catheter. While flowing through the perfusion tubing system the temperature of the solutions dropped to 37 ± 1 °C (measured at the position of the intracardiac catheter). At first 100 ml to 150 ml of phosphate buffer (PB) (0.1 M) were perfused until the

reflux out of the right atrium was clear. During that time the caudal vena cava and abdominal aorta were clamped 1 cm to 2 cm caudal to the heart. Three hundred milliliters of 4% buffered paraformaldehyde (Roti-Histofix, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) (PFA) followed the primary perfusion. An additional volume of 100 ml PB was used afterwards to flush the remaining PFA out of the vascular system. Following the additional PB perfusion, 30 ml of the labeled gelatin solution were perfused and the vena cava superior and ascending aorta were clamped to maintain the intrinsic pressure inside the perfused vessels. The body was stored in this way in iced water for 4 h, after which the brain was removed and post fixed in 4% PFA for 1 h.

2.5. Histology

2.5.1. Brain block preparation for microscopic scanning of the superficial vessels

We blocked the marmoset visual cortex, fixed the block with a few milliliter of agarose (low melt agarose, Carl Roth) 4% at 20 °C at the bottom of a small transparent petri dish (55×15 mm, N224.2, Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Before curing of the agarose we adjusted the orientation of the block in such a way that the central region of the cortical surface that had been recorded with the optical imaging system was oriented upwards. Then the petri dish was partly covered with a glass slide (microscope cover glass, 60×24 mm) that was laid on the edges of the petri dish. Due to the gelatin filling the large surface vessel trees of the cortical surface are visible by naked eye. The large vessel structures as seen in the central region of the IOI vessel maps were identified in the vascular pattern seen on the surface of the blocked brain. The apex of this small region was allowed to touch the glass slide from below. The orientation of the block was then fine adjusted to ensure a parallel orientation of the imaged region and the glass slide by using a stereo microscope at low magnification ($10\times$) and the vascular surface pattern. The brain block was then finally fixed with a few more drops of low melt agarose such that the lower half of the block was completely embedded. The dish was then filled up to the edge with PB to prevent the tissue from drying. Embedded and fixed in such a way the block was placed under the microscope. Thus the imaged cortex region was oriented parallel to the bottom of the petri dish and hence parallel to the plane of the stage of the microscope. We thus ensured that the angular relation between the imaged central region of V1 and the microscope objective matched the angular relation between central V1 and the optical axis of the IOI camera as closely as possible. The cortical surface was then scanned under the microscope (see Section 2.6.1). The embedding of the block in agarose prevented motion artifacts due to the scanning movements of the motorized stage. For cryoprotection, the block - still embedded in agarose - was then transferred to 30% sucrose in 0.1 M PB until it sank.

2.5.2. Cutting, staining and embedding

The agarose socket of the brain block allowed a quick and precise adjustment of the block on the stage of the freezing microtome. The lower half of the block was then covered with a liquid embedding medium (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Staufen, Germany) and cooled to -25 °C. We avoided covering the imaged region with embedding medium in order that the vascular pattern was still visible when the tissue block had frozen. The cutting plane of the freezing microtome was adjusted to fit the orientation of the freezing stage and thus the focal plane of the optical imaging. Again the vascular structure on the apex of the imaged region was used to check the correct orientation of the brain block before cutting. Depending on the curvature of the cortex within the ROI, the thickness of the first section was chosen to be either 100 μm or 140 μm in thickness in order to create a rather large section containing more vessel tree segments for ease

of alignment. All subsequent sections were cut at 100 μm thickness. We stopped the cutting procedure at a depth at which the white matter started to fill large parts of the center of the sections. The sections were rinsed three times in 0.1 M PB for 5 min and stained for CytOx modified from (Wong-Riley, 1979) at room temperature until the typical CytOx pattern of the visual areas became clearly visible. The sections were then rinsed three times in 0.1 M PB for 5 min to terminate enzymatic CytOx reactions, mounted on glass slides and covered immediately. We minimized drying of the tissue and used an aqueous mounting medium (Fluorsave Reagent, Merck, Darmstadt, Germany) for embedding the sections. Particular care was taken to minimize tissue distortions during mounting and covering of sections. Specimens were then dried for a few hours. When data acquisition was carried out the embedding medium tended to be still in liquid phase, but was cured at the glass slide edges which ensured a proper sealing of the specimen. Thus, compression of the sections was minimized.

2.6. Microscopy

2.6.1. FITC vessel maps of the cortical surface vasculature

A stack of images of the FITC labeled vessels on the entire surface of the block was acquired using a 5 \times objective (Neofluar, Zeiss, Goettingen, Germany) mounted on an AxioImager.Z1 microscope (Zeiss) equipped with a motorized XYZ-stage and the mosaiX module of the AxionVision software (Zeiss). Mosaic image stacks with a z-step of 100 μm were acquired starting at the apex of the specimen. Single mosaic images consisted of around 11 \times 7 tiles, with single tiles being acquired at 16-bit resolution and being 1300 \times 1000 pixels with a tile overlap of 10% for tile stitching. The resulting mosaic image sizes were up to 11,000 \times 8500 pixels. Individual stacks consisted of up to 15 mosaic images. This process ensured that even vessel structures of the strongly curved border regions were scanned. All images of the stack were averaged to produce a mean image containing a sharply mapped projection of the whole surface vasculature of the brain block. By such a projection method we took the curvature and inhomogeneities of the cortex into account. The mean stack image will be referred to from here on as the FITC vessel map. We used the AxioVision software to measure the ratio of micrometers per pixel of the FITC vessel map, thus providing the scale factor needed for the measurements of the size of the displacement error (see Section 3.4). We took the later image size reduction (see Section 2.6.3.1) into account and the scale factor was adjusted according to the rate of the reduction. The adjustment of the scale factor was verified by comparing the pixel dimensions of prominent vessel structures before and after the image size reduction.

2.6.2. Scanning of histological sections

All collected sections were double scanned using the AxioVision mosaiX module for FITC fluorescence signal (BrightLine fluorescence filter HC 536/40 nm Semrock, Rochester, NY, USA) and for CytOx density distributions (transmission light). Due to the multichannel mosaic scanning mode the images of the transmission light scans and the images of the corresponding FITC signal matched without discrepancies and were further on handled in pairs.

2.6.3. Image processing for alignment

For the ease of image sorting, prealignment and a later comparison of aligned images the vessel maps and the histological images as well as the IOI maps were loaded into stack files in Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, DE, USA).

2.6.3.1. General alignment of histological sections, FITC vessel maps and IOI maps. Throughout all prealignments only translational and

rotational adjustments were applied. The image pairs of the histological sections were sorted according to their distance from the cortical surface and then prealigned by hand. This was done by fitting together interrupted vessel segments of neighboring sections. In addition, the vessel cross section patterns were used to find the optimal fit of neighboring sections. The vessel segments show up mostly in the border regions of the sections that mainly consist of superficial tissue portions. Distortions in the shapes of the sections are revealed most clearly during this step. A preliminary vessel map of this data was gained by adjusting the alpha channel of all FITC signal images to increase their transparency to 30%. The composition of the vessel pattern revealed in this way was compared to the FITC vessel map described in Section 2.6.1 to enable a more global adjustment of the single section positions. Histological images were reduced by 50% (*bicubic sharper* algorithm, Photoshop CS4) for ease of subsequent image processing. The size of the IOI vessel maps was then adjusted by eye to match the scale of the histological images. This was done by applying rotational corrections followed by a uniform increase in the size of the maps until an accurate match of the prominent vessel structures in both images was achieved. As many characteristics as could be found in the IOI vessel maps were used to achieve an accurate match over its full size. Usually, we defined more than hundred branching points and vessel end points in this step.

2.6.3.2. Nonlinear registration¹ of FITC vessel maps to IOI vessel maps.

Image registering was done in Matlab (Matlab 2010a) using the following functions of the image processing toolbox: *cpselect* to select the control points for the registration, *cp2tform* and *imtransform*. In a first step the FITC vessel map was registered to an IOI vessel map. We thereby took account of aberrations within the optical systems of the IOI system and the microscope, as well of slight angular differences of the camera planes that lead to discrepancies of the FITC vessel map and the IOI vessel maps. This was done by using the IOI vessel map as “base” image and the FITC vessel map as “input” image for the *cpselect* function. We then defined more than hundred characteristics of the vascular net as control or registration points. These points were used as input arguments for the *cp2tform* function and a *piecewise linear* or *polynomial image* transformation algorithm was chosen to infer the spatial transformation of the FITC vessel map. The *imtransform* function was used to apply this transformation to the FITC vessel map. The result and the base image were then re-loaded into Photoshop and compared by eye for the accuracy of the transformation. Here, a *piecewise linear* transformation algorithm showed the most accurate result.

2.6.3.3. Nonlinear registration of histological section images to the FITC vessel map.

All histological images were then individually registered to the registered FITC vessel map, not to its consecutive neighbor sections as it was done in the prealignment step. This was done following the same protocol as described in Section 2.6.3.2. We defined between 50 and 300 points of spatial coincidence (depending on the size of the section) in each image pair for registration with the FITC vessel map. Such points consisted of branching points, vessel crossing points and vessel end points. Descending vessels were only used when the vessel had a diameter larger than 30 μm . In 3 out of 24 sections a *piecewise linear* algorithm applied

¹ We use the term registration as a special case of the more general term alignment. Registration is used in all cases where a nonlinear image transformation is applied to fit spatially distorted characteristics of a target image to equivalent points of a base image. This usage of the term is common in aerial image registration and it was adopted by MathWorks and incorporated into the syntax of Matlab (see the image processing toolbox).

to the image pairs showed a more accurate transformation result than a *polynomial* transformation algorithm.

2.6.3.4. Image stacks for p3D reconstructions. All registered images were then stacked again in a single file in PhotoShop and the accuracy of the alignment was checked. For the visualization of the vascular reconstruction the alpha channel of all FITC signal images was adjusted to increase their transparency to 30%. The background areas of the transmission light images were deleted so that only the sections remained visible. At this point other IOI maps e.g. orientation preference maps were inserted into the stack and adjusted in size to fit the IOI vessel maps. For anatomical-functional comparisons, we superimposed the intrinsic signal maps and the histological reconstruction by simply adjusting the transparency of the maps.

3. Results

We present below alignments of IOI maps to histological preparations (Fig. 2) in datasets obtained from two marmosets.

3.1. Intrinsic optical imaging in marmosets

Applying differential map calculations to the raw data recorded under red light conditions (as described in Section 2.3.2), we observe patterns of reflectance changes showing the columnar organization of orientation responses in areas V1 and V2 (Fig. 2(A)) described previously by others (Roe et al., 2005; Schiessl and McLoughlin, 2003).

3.1.1. IOI vessel maps

When we applied a frame zero subtraction on every frame of a single stimulus condition in order to visualize the development of the intrinsic signal over time, we observed an emergence of large macrovasculature structures at the late phase of the initial dip, as it is also reported by others (Vanzetta et al., 2004). From comparison with the vessel patterns of the FITC vessel maps it was obvious that the revealed structures are representations of cortical surface vessels in the IOI signal (Fig. 2(B and C)). The structures showed dense ramifications over the entire region of interest which makes them suitable for use as a vessel reference map. In all cases the vascular pattern was most clearly visible at frame 43 of the single condition map series. In 4 of 5 cases this map corresponds to a point in the time course of the intrinsic signal that follows the maximum of the initial dip. In one case shown here (Marmoset 2, see Fig. 3(E)) the intrinsic response showed a less extended initial dip with a peak response at roughly 3 s after stimulus onset and an early overshoot of the signal. At 5 s after stimulus onset the vasculature started to brighten. At frame 43 the corresponding map showed a bright appearance of the vasculature. Whereas, in all other animals the vessel trees revealed in frame 43 appeared dark (Fig. 3(B)). The reason for this difference is due to individual shapes of the intrinsic signal time course (see supplementary Figs. 1 and 2), that might result from the animal's physiological dispositions or an individual sensitivity for anesthetic drug components. A change in reflectance (dark to bright) of the macrovasculature during the time course of the intrinsic signal is typical under red light conditions. In the study by Vanzetta et al. (2004) a single condition map series of the intrinsic signal over time is presented (see their Fig. 3) which also shows a change from dark to bright at roughly 5 s after stimulus onset (note that this data was recorded from an awake macaque monkey and that the stimulus duration was 2 s). The time course of the intrinsic signal shows that its mean reflectance change at this point is above the baseline level as it is the case in Marmoset 2. In spite of such differences in reflectance, the vessel patterns revealed at frame 43 were clearly distinguishable from the parenchyma in all

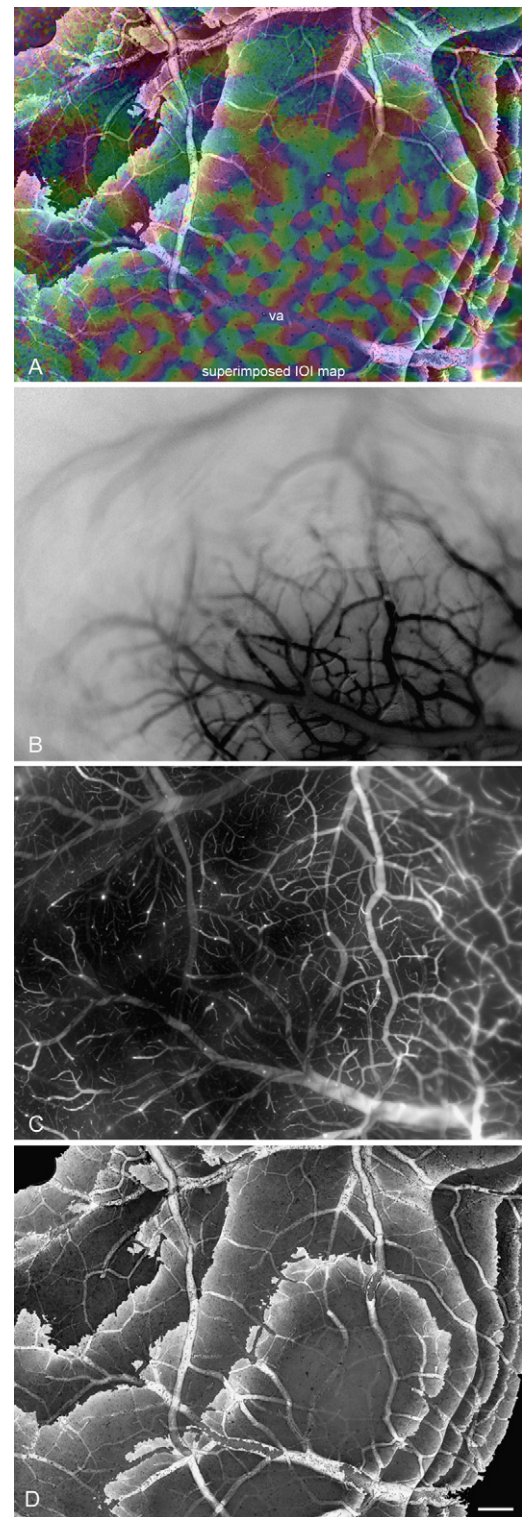


Fig. 2. Functional-anatomical data alignment by multimodal vessel mapping. (A) IOI orientation map recorded in an intrinsic optical imaging experiment, superimposed onto the histological sections shown in (D). The vascular artifacts (va) within the orientation map can be nicely correlated with the vessel segments revealed in the stack of section stained for cytochrome oxidase. (B) Vessel map recorded during optical imaging. It shows the dense vascularization of the cortical surface. (C) The same vascular pattern at even higher detail in the FITC vessel map gained from the cortical surface after perfusion. (D) Uppermost sections - stained for cytochrome oxidase - of the p3D reconstruction. The vessel segments from the single sections show a smooth transition at section borders so that the individual vessel branches can be traced over several sections. Scale bar = 500 μm .

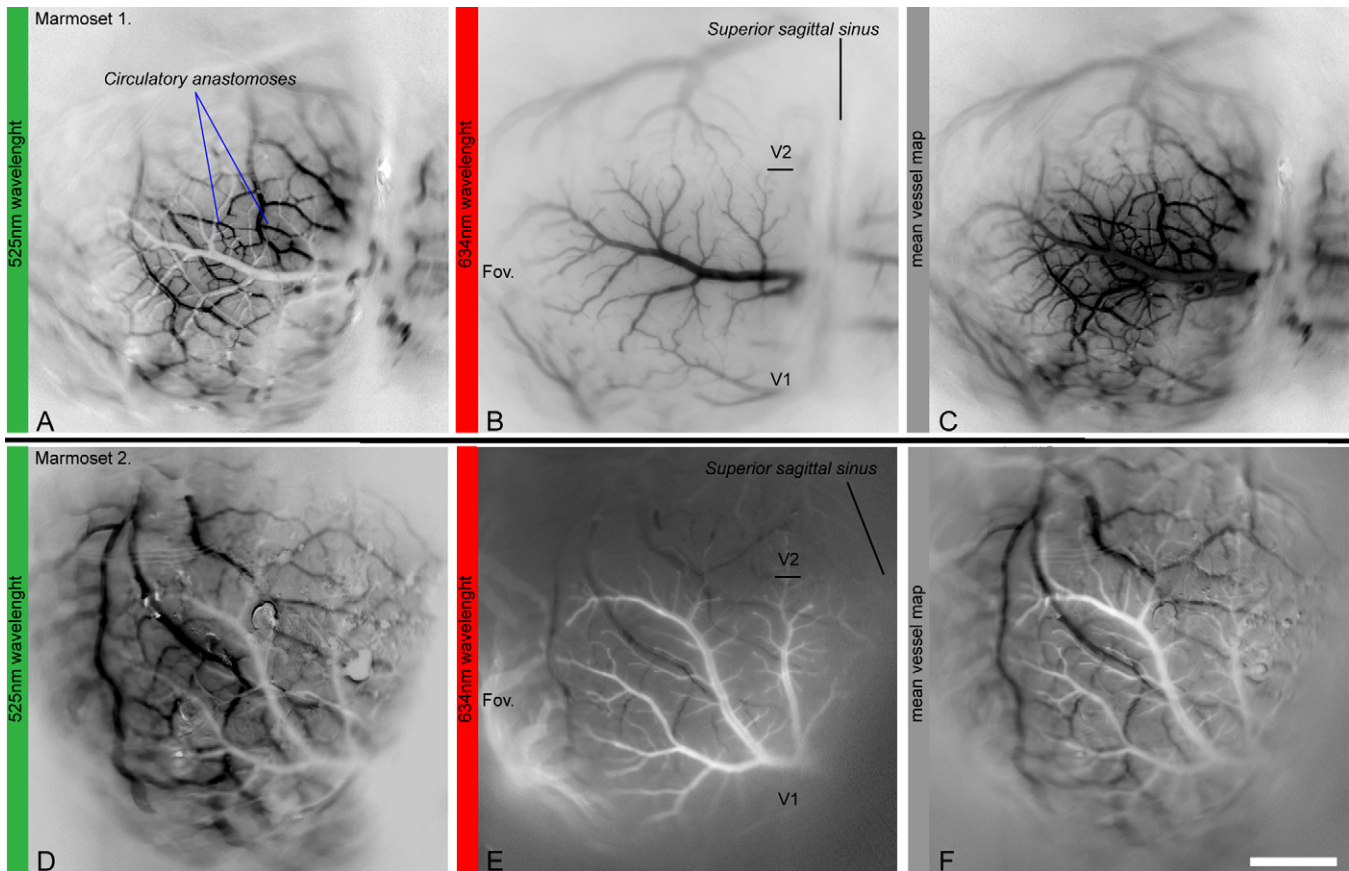


Fig. 3. IOI vessel maps of the primary visual cortex of two marmosets (A–C and D–F, resp.). (A and D) show maps that exhibit macrovasculature structures, recorded under green light (~ 525 nm) illumination of the cortex. Circulatory anastomoses, typical for arterial vessels, are labeled. (B and E) show reflectance patterns of macrovascular trees at the late phase of the initial dip, recorded under red light (~ 635 nm) illumination. The visual areas V1 and V2 and the border region (-) are indicated, as well as the foveal region (Fov.) and the position of the superior sagittal sinus. In (C and F) the mean IOI vessel maps are shown, calculated from the respective green and red light vessel ($A+B=>C$; $D+E=>F$) maps. Scale bar = 2 mm.

cases. Different patterns of the superficial macrovasculature were revealed in the single condition maps of red and green light imaging conditions (Fig. 3).

3.1.2. IOI vessel maps under red and green light conditions

The patterns of ramification in V1 as revealed during the initial dip of the intrinsic response under red light conditions show typical characteristics of venous trees as they have been reported for rodents (Blinder et al., 2010) and humans (Duvernoy et al., 1981) which indicates that this vessel structures most likely represent the superficial venous vasculature (Fig. 3(B and E)). Under green light conditions we imaged a vascular component that was only faintly visible or completely invisible under red light conditions (Fig. 3(A and D)). These vessel trees showed a strong tendency to form circulatory anastomoses (see also Fig. 4(A)) that are typical for cortical arterial nets (Blinder et al., 2010; Duvernoy et al., 1981).

3.1.3. Methodological benefit of the vessel mapping under red and green light

As a standard procedure in IOI recordings intended for a later alignment to histological data a reference-snapshot of the cortical surface vasculature is taken under green light illumination (Bonhoeffer and Grinvald, 1996). In large primates as macaque monkeys the dura forms a thick non-transparent sheet which is usually removed by the experimenter in order to take the reference green image and to image the intrinsic signal under red light (605–630 nm). As stated by Bonhoeffer and Grinvald (1996), the

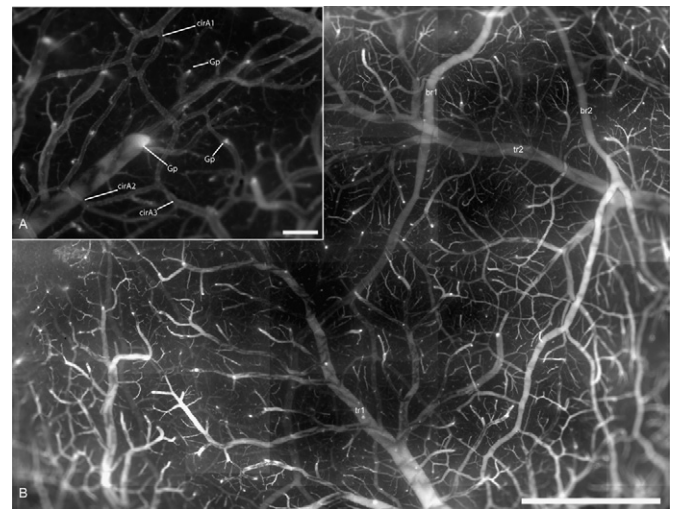


Fig. 4. FITC vessel map of the surface of primary visual cortex of a marmoset. (A) Vascular details of the FITC vessel map in (B). cirA1, cirA2 and cirA3 label examples of circulatory anastomoses. Glow points (GP) are exhibited at points where superficial vessels or a ramification of them descend into the cortical tissue. Scale bar = 200 μ m. (B) shows an area of approximately 9×7 mm. The figure gives an impression of the high density of superficial vascular branches that can be used for data alignment. tr1, tr2 mark large trunks of assumingly venous vessels whereas br1, br2 mark branches that are most likely arterial vessel. Scale bar = 2 mm.

opening of the dura in primates can be problematic. Incisions into the dura to provide a large opening carry the danger of bleedings and an increase of the trauma caused by cortical edema. In small animals such as rodents the dura is thin and transparent, so that ideally no removal is necessary for providing a clear view on the cortical surface. The dura of the marmoset is in between those two conditions. In our marmosets, the dura showed a semi-transparent appearance under green light illumination, and in addition dural vessels compromised the view on the cortical vasculature so that the accuracy of the reference green image was degraded. However, in preceding experiments, where the dura was removed, we found the shape of the cortical surface affected, even though care was taken to prevent cerebral edema. Thus, the accuracy of the histological preparation and alignment was compromised. In addition, we experienced the dura to be of significant importance for stable long-term recording of the intrinsic signal. Thus, the two wavelength vessel mapping demonstrated here, offers an alternative method to provide a detailed reference image of the surface vasculature and to bypass above mentioned influences on the quality of alignments. Nevertheless, in all cases where nothing stands against the standard procedure, the usual green image can equally be used as reference for the proposed alignment approach.

3.2. FITC vessel maps of the cortical surface vasculature

The images obtained from the mosaic scans of the cortical surface showed a complete filling of the superficial vasculature with the FITC-labeled gelatin (Fig. 4(B)). The labeling showed a homogeneous distribution in most vessel lumens and strong contrast between vessel structures and parenchyma at the described FITC-albumin concentrations. In this way, we obtained detailed maps of the superficial vasculature of the previously imaged area (Fig. 5). A fine vascular network can be seen in the FITC vessel map that reveals details up to the capillary level. The prominent vessels of areas V1 and V2 from the IOI vessel maps could be easily recognized within the FITC vessel maps (Fig. 5(A and B)). In large vessels we observed a zigzag-like inhomogeneity of the fluorescence signal which can be seen in the vessel trees of Fig. 5(B) labeled tr1. We assume that this effect results from an early curing of the gelatin during the perfusion.

3.3. Histology

3.3.1. Cutting and embedding

For the histology of the cortical tissue, we chose a rather large section thickness of 100 μm , thus such section suffer considerably less from distortions during mounting and embedding than thinner sections. In particular, sections of vascular lumen casts (Fig. 6(A)) as used in this study show better mechanical handling properties during sectioning and better shape retention while mounting compared to sections of non-casted tissue of previous experiments. Fig. 6(B) gives an impression of the amount of capillary/vascular lumen within the tissue. By filling the lumen with gelatin additional material is added to the tissue and as a consequence of this the tissue density is increased and thus its resistance to deformation is improved.

An equally important modification of the standard staining protocol was to avoid any drying of the sections. Drying is a major source of distortions that results in non-uniform shrinking of the tissue and, in addition, can result in the collapse of the vascular lumen. By the use of a hydrous embedding medium, filling the vascular lumen with gelatin and the immediate data acquisition, 85–95% of the original section thickness is maintained during the histological processing. Sections that were processed according to the usual staining protocols showed shrinkage in thickness to less than

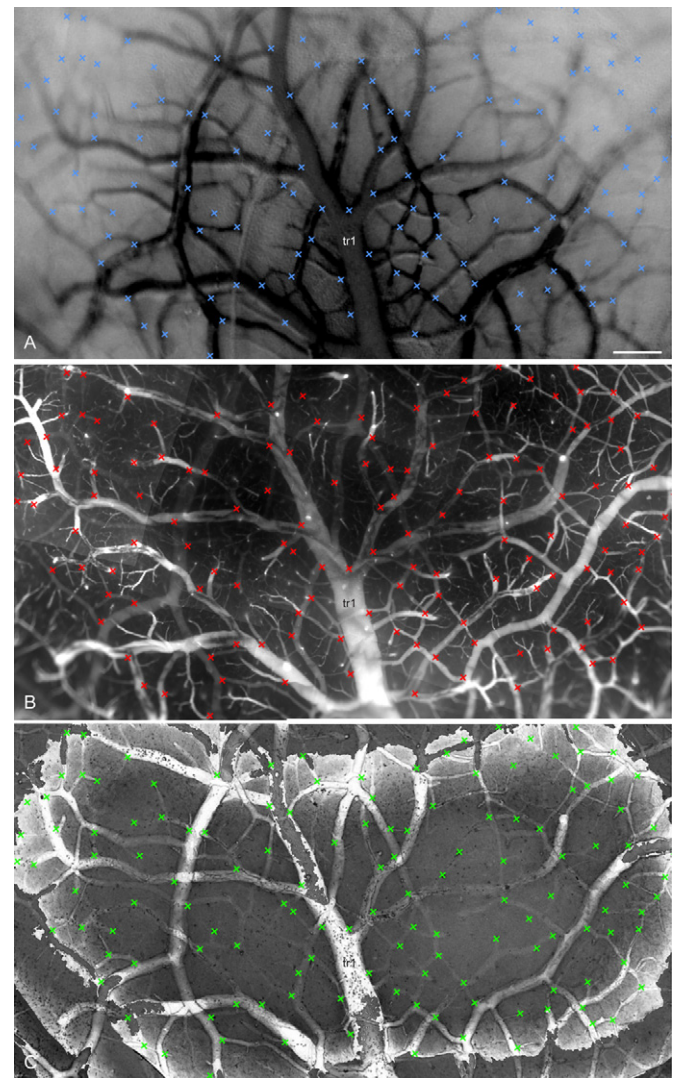


Fig. 5. Vascular landmarks used for the registration of the different modalities. (A) shows a set of registrations points that mark branching points, vessel crossing points and vessel end points of the IOI vessel map, (B) same points of the FITC vessel map and (C) on the p3D reconstruction. Scale bar = 400 μm .

50%, caused by dehydration of the tissue and the volume reduction of the embedding media during curing.

A drop out of the gelatin filling was observed in cases where large superficial vessel segments crossed the cutting planes of the sections. In most cases we noted the loss only because of the lack of FITC signal structures. However, the shape of the empty vessel lumen was nevertheless preserved in the transmission light images of the CytOx reactivity (Fig. 6 (D)), so that dropouts of FITC labeled gelatin had no influence on the quality of the p3D reconstruction (Fig. 6(B)).

3.3.2. CytOx staining

The transmission light scans of the CytOx stained sections show that enzymatic reactivity is expressed in all section compartments, but no reactivity products can be seen inside the lumen of vessels. The quality of the CytOx staining seemed not to be affected by the vascular cast or the avoidance of drying the sections. The previously described patterns of CytOx density in the supragranular, granular and infragranular layers, as well as the patches of increased density in layer 2/3 of V1 and the larger enzymatic compartments in V2 were all observed in our preparations. Due to the differences in CytOx density between V1 and V2 the borderline between these

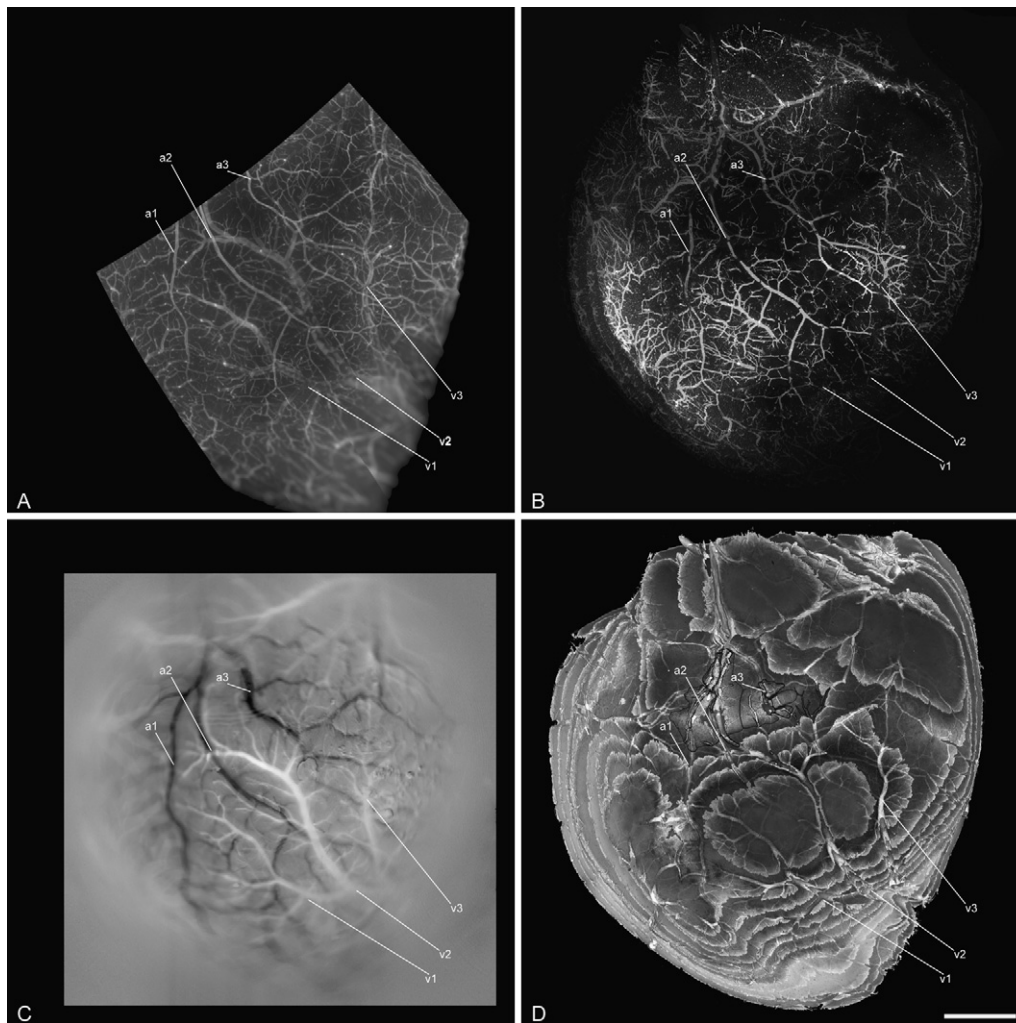


Fig. 6. Highly precise alignment of multimodal vessel maps over large cortical regions. (A) FITC vessel map of the superficial vasculature of a blocked visual cortex. (B) shows the FITC fluorescence signal from a stack of 11 histological sections (each 100 μm in thickness) from this tissue block and (C) the corresponding IOI vessel map. (D) shows the CytOx signal of the same stack of sections as in (B) imaged by transmission light microscopy. For orientation, a set of vessel branches corresponding to each other are labeled with a1, a2, a3 and v1, v2, v3. Scale bar = 2 mm.

areas is clearly visible. The vessel lumina are clearly visible and even small arterioles and venules up to a diameter of 10 μm can be observed (see also Fig. 5(C)). Although capillary structures can only be seen in FITC signal images, the CytOx staining maintains additional vascular details, that compensate for the dropouts of gelatin, or FITC signal loss due to bleaching.

3.3.3. FITC signal in vascular lumen casts

The FITC signal seen in the CytOx stained sections was only slightly affected by the density of the enzymatic product. Capillary structures can be seen widely throughout all histological sections (Fig. 7(B)). In regions of strong CytOx reactivity we observe a reduction in FITC signal strength which affects the visibility of the capillary net but did not obscure larger vessel structures. In cases in which the post fixation time was shorter we observed higher drop-out rates of the gelatin filling than in cases of longer fixation of the blocked cortex. The gelatin drop-outs were restricted to larger vessels that were intersected by the cutting plane.

3.4. Alignment of neuroanatomical-functional data sets

3.4.1. Registration of FITC vessel maps to IOI vessel maps

In prealignments of IOI vessel maps and the corresponding FITC vessel maps we found only minor differences that had to be

corrected by registration (see Section 2.6.3.2). We measured the size (Euclidean distance in pixels) of the displacement of landmarks of the FITC vessel maps before and after registration to the IOI vessel map. Here, we found a mean alignment error before registration of $152.89 \pm 111.64 \mu\text{m}$ ($n = 178$) in marmoset 1 and $103.79 \pm 101.30 \mu\text{m}$ ($n = 78$) in marmoset 2.

3.4.2. Registration of histological sections to the FITC vessel map

Figs. 5 and 6 show that the vascular segments in the CytOx-stained sections in addition to the vessel segments revealed by the FITC signal in the same sections, offer a large number of landmarks that enable a precise registration of small section compartments to the dense vascular details of the FITC vessel map. By using branching points, vessel crossing points and other characteristics of the vascular segments that are distributed along the border regions of the sections, a dense formation of registration points is obtained, that can be used to correct for distortions of the tissue without the need of dye injections, lesions or the registration via descending vessel cross sections. At points in the FITC vessel map where vessels that run parallel over the surface descend into the depth of the tissue or where a descending branch originates from a surface vessel, we observe an increase of the signal with a faint coronal glow around the sharply seen superficial

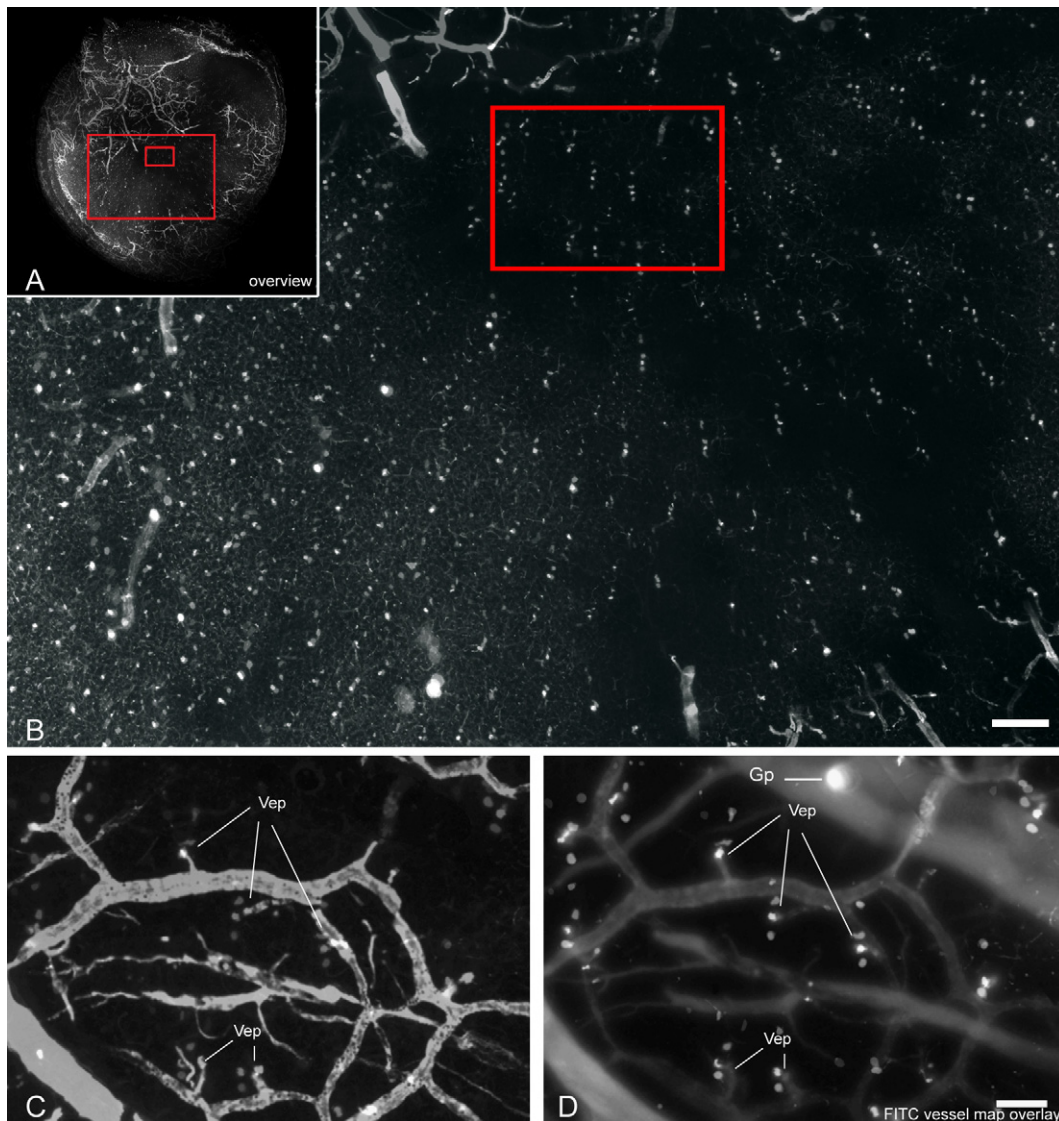


Fig. 7. Vascular details in a p3D reconstruction. (A) shows an overview of the stack of histological sections in Fig. 6B and the positions of a medium (B) and large (C and D) magnification of a region of interest. The two uppermost sections are removed in (A, B and D), but added back in (C). (B) (scale bar = 300 μm) shows the projection of cross sections of blood vessels over four consecutive sections from the supragranular layers. A strong shift of the cross sections of radial vessels can be seen. The shift ranges of an individual vessel can lead to a dislocation of up to 400 μm in areas of stronger cortical curvature (left half of the picture). In (C) the quality of the fluorescence labeling of the vessels in the uppermost section is shown. For comparison, the ROI in (D) is superimposed onto the FITC vessel map achieved before cutting. Several vessel end points are labeled (Vep) to illustrate the dislocation of the cross sections. (Gp) marks the position of a glow point of a vertical vessel branch. An excellent alignment of the fine vascular details in (C, D) can be seen, as well as the shift of cross sections throughout the stack that results from the radial orientation of the vessels within the curved tissue. In this case, the shift in the center of the region of interest shows a displacement of up to 200 μm over a depth of 400 μm of tissue for an individual vessel. Scale bar = 150 μm .

endpoint or branching point. It results from the relatively large volume of labeled gelatin per surface area that extends through the entire focal depth of the objective (Figs. 4(A) and 7(D)). Similar “glow”-points can also be found in the IOI vessel maps under red light conditions but they show a less prominent appearance. Such points can be of some use in alignment but they constitute some danger for misalignments because they are not necessarily centered on the endpoints of vessels but can be displaced slightly.

To calculate the statistical error of the alignment before registration, we measured the Euclidean distance (in pixels) between the coordinates of each registration point of the uppermost sections (5 sections in Marmoset 1; 6 sections in Marmoset 2) and the coordinates of its counterpart of the FITC vessel map. This distance represents the size of the displacement of a vascular landmark from its origin. We find a mean error of $360.03 \pm 286.77 \mu\text{m}$ ($n = 951$) in

marmoset 1 and $161.10 \pm 118.84 \mu\text{m}$ ($n = 556$) in marmoset 2. In both cases the sections used for these measurements covered a region of 60–80 cm^2 of the cortical surface.

3.4.3. P3D reconstruction

By the rearrangement of the registered section images into a single stack (sorted in hierarchical order) an accurate p3D reconstruction of the imaged areas is obtained (Fig. 6(B and D)). The stacking enables a fast visualization of single sections or a collection of sections, and thereby facilitates the comparison to functional maps and the visualization of spatial relations. Such a reconstruction maintains information about the arrangement of cortical layers, vasculature and cortical columns in space. In addition it preserves the original shape of the sectioned part of the cortex. The maintenance of the shape in the p3D reconstruction makes this approach also particularly suitable for the alignment of histologi-

cal sections to volumetric datasets of tomographic imaging systems as MRI or CT.

3.4.4. Radial orientation of cortical structures

The FITC signal within the p3D reconstructions exhibits a linear displacement of the descending vessel cross sections to their origin in the top view (Fig. 7). We find smaller range displacements in areas of low cortical curvature (relative to the orientation of the imaging plane) and bigger shift ranges within regions of strong folding of the cortical plane. The correlation to cortical curvature and the linear arrangement suggests that these shifts are due to angular tilt of the radial vessels relative to the image plane (reflecting the natural radial orientation within the cortex) rather than alignment errors. We observe similar radial displacements also within the prealigned section stacks. Within the central region of the corresponding optical recordings we measure a mean displacement of cross sections of $33.96 \pm 13.17 \mu\text{m}$ ($n = 570$) in marmoset 1 and $48.01 \pm 12.67 \mu\text{m}$ ($n = 530$) in marmoset 2. Calculations were done measuring the pixel distance of neighboring cross sections within the uppermost 4 supragranular sections (Fig. 7(C and D)). Only cross sections that could be clearly identified to belong to a distinct vertical vessel were taken into account. Center distances that exceeded $100 \mu\text{m}$ were regarded as false correlation and were therefore neglected. In some cases we found radial vessels within the p3D reconstruction that ramified within the lower supragranular layers. The branches of these vessels spread from the point of ramification into different directions. When cross sections of descending vessels are used for alignment, such ramifications constitute a danger to its accuracy by contributing to the general dislocation error.

4. Discussion

4.1. Aim of the study and comparison to other alignment approaches

A range of different alignment approaches has been used in the past to assign functional signals to the underlying cortical architecture. In terms of alignment optical imaging studies can be roughly divided into two groups: invasive and noninvasive studies. The first group uses extrinsic markers to support the alignment of intrinsic signals to anatomical structures revealed in histological stains. The noninvasive approach makes use of the cortical vasculature to assign the recorded signals. Each of these techniques bears its own methodological advantages and restrictions, and care has to be taken by the experimenter in planning experiments to choose the proper alignment methodology that fits the needs of the later data analysis.

This report aims at providing a recommendation for a new methodological approach that extends the catalog of noninvasive alignment methods and offers a new protocol for large area alignments as required, for example, in studies where the topology of functional OI signals and CytOx densities are compared over large cortical regions. A quantitative comparison of the accuracies in terms of error sizes achieved by the different approaches is not given here. However, we present an error measurement which indicates the accuracy achieved by the presented approach and which offers a description of the advantage of the new protocol compared to other noninvasive linear alignment techniques. We additionally provide a detailed discussion and supplementary material about the advantages this new approach offers compared to invasive approaches and which make it a valuable tool for combined functional anatomical investigations.

Invasive alignment approaches as penetrations of the tissue with electrodes for physiological recordings (Arieli and Grinvald, 2002; Niessing et al., 2003), dye injections/markers (Bartfeld and

Grinvald, 1992; Lu and Roe, 2008; Malach et al., 1994) or the application of lesion marks (Bartfeld and Grinvald, 1992; Landisman and Ts'o, 2002) allow rather local assignments restricted to the vicinity of the penetrations. Several marks are necessary for alignment of large cortical regions. In most cases known to us the extrinsic markers are applied after perfusion. Thus they help to align deeper layer sections to a superficial layer section or to other sections, but these late landmarks do not provide a direct support for the alignment of the functional data to the sections as it is the case in the presented approach.

In addition, in previous experiments we often experienced complications induced by using these methods. In particular, we observed a strong effect of *in vivo*- as well as *post mortem* electrode penetrations or electrolytic lesions on the CytOx reactivity of the surrounding tissue (see supplementary Figs. 3 and 4). Thus the correlation of physiological signals to the faint CytOx blob pattern was compromised. Blood leaking into electrode tracks caused by disruptions of cortical vessels due to the electrode penetrations led to similar problems (supplementary Fig. 5).

In noninvasive alignments where no extrinsic markers are used distortions of the tissue during histological preparation are commonly counteracted by linear transformations (e.g. Kaskan et al., 2007) of the histological images, based on the positions of vessel cross sections in the histological sections and vessel end points of the superficial vessel pattern. No study known to us presented an error measurement on the accuracy of this kind of alignment. Only one study makes mention of the error that is assumed to occur due to the shift of cross sections of radial vessels with increasing depth (Roe et al., 2005). There the positional displacement between a superficial landmark and its deeper layer counterpart (at a depth of $300 \mu\text{m}$) is stated to be expected smaller than $50 \mu\text{m}$.

The ongoing controversy about the accuracy of such functional anatomical studies (Adams and Horton, 2009; Lu and Roe, 2008; Polimeni et al., 2005; Sincich and Horton, 2005; Xiao et al., 2007) and the “vexing problem of alignment” (Adams and Horton, 2009) motivated us to revise the methodology of noninvasive alignments of functional data to histological stains in particular to stains for CytOx reactivity. By quantifying the dislocation errors induced by tissue distortions in an individual preparation we are able to draw conclusions from the size of the dislocations on the accuracy that would have been achieved by using the standard linear alignment approach. However, it is important to keep in mind that these findings are specific for the presented experimental conditions and that alignments done in flatmounted cortices or cortices with less curvature (e.g. operculum of visual cortex in macaque monkeys) or other cortical regions which show a different amount of gyrification might lead to diverging dislocation values.

Here, we demonstrate that by adding two processing steps to the standard alignment protocol, which are: the filling of the cortical surface vasculature with fluorescence-labeled gelatin and the implementation of non-linear registration algorithms, noninvasive alignments of functional and anatomical datasets taken from large cortical areas can be achieved with a high level of precision and with the possibility to alleviate the influence of cortical curvature on alignment accuracy.

The new protocol not only enables to counteract distortions of the histological tissue but in addition it facilitates investigation of the influence of the cortical curvature on the topology of functional signals. The 3D reconstruction of the cortical architecture enables an accurate estimation of the axial tilt of functional columns and thus it compensates for displacements of superficial vessel structures and functional or histological signals from deeper layers (see Section 4.3).

In a study by Berwick et al. (2008), good alignment is achieved between optical imaging maps and anatomical preparations of the barrel field of the rat, by way of vascular labeling with a pho-

tographic emulsion. The gelatin filling technique used here has the advantage of upholding the lumen of the vasculature in an *in vivo* like state which is important for 3D reconstructions of cortical regions. In addition, the gelatin is transparent and almost invisible in transmission light microscopy and thus does not influence the signal quality of the CytOx stain (supplementary Fig. 6). Using standard fluorescence microscopy or confocal microscopy the homogeneous fluorescence labeling of the gelatin can be imaged independently of the CytOx staining. Thus this method is suitable for 3D reconstructions of the capillary bed and could therefore also be used to facilitate correlations between vascular densities of anatomical structures (e.g. CytOx blobs; see Keller et al., 2011) and functional signals (see also Berwick et al., 2008). Further, we see no reason that the presented protocol could not be used in combination with standard techniques for single cells labeling and 3D cell reconstructions (e.g. biocytin-avidin stains; Horikawa and Armstrong, 1988; see also Oberlaender et al., 2007; or biotinylated dextran amines: Reiner et al., 2000; or lipophilic carbocyanines: Godement et al., 1987) or immunoreactive stains by using multichannel fluorescence data acquisition and therefore offers the potential for investigations of the neurovascular coupling at a fine spatial scale.

4.2. Vasculature as a basis for nonlinear registration

We are aware of the fact that the nonlinear registration of images might be a precarious methodological approach for the correction of systematic errors. However, in view of the large range of the alignment error (~ 160 to $360 \mu\text{m}$) that is shown in this study for the standard linear approach, a methodological refinement appears reasonable. In our approach the registration is fundamentally based on a detailed template of the superficial blood vessel pattern of the imaged part of the cortex in form of the FITC vessel map. This template offers an unmatched topological richness for alignments. “. . .40% of the cortical surface is covered by blood vessels larger than $50 \mu\text{m}$ ” (Mc Loughlin and Blasdel, 1998) and the resolution of the FITC vessel map as well as the resolution of the images of the histological sections extends this richness of detail to the capillary level. This then allows us to correct distortions of the sections on a well-founded basis and thus to do a secured reconstruction of their shape, by which a precise p3D reconstruction is enabled. The additional details in the blood vessel patterns of the FITC vessel map and the dense distribution of radial vessels provide a high number of noninvasive natural registration points at a fine spatial scale (e.g. radial vessel density: 23.6 and 28.2 vessels/ mm^2 in macaque and squirrel monkeys respectively, see Keller et al., 2011) that easily outnumbers the number of extrinsic markers usually used in invasive approaches (see Section 3 of Roe et al., 2005). In top views of the 3D reconstructions one can see a linear arrangement of vessel cross sections that belong to the same superficial origin (see Fig. 7(B–D)). This linear arrangement provides an instant indication for the accurate correction of the distortions since under uncorrected alignments lack this strictly ordered arrangement.

This technique makes it therefore possible to study correlations between the cortical architecture and functional signals, using the full repertoire of histological techniques, from vascular pattern down to interneuron subtypes, in a manner which preserves as faithfully as possible the native orientation and disposition of the cortical columns and tissue in general. To our knowledge this is the first time that the tilt of radial vessels and functional columns as a function of cortical curvature is described in such a context.

Beyond that, we think that our methodological approach carries the outstanding potential for the alignment of fully reconstructed hemispheres or even entire cortices of small animals to volumetric datasets of the same brain recorded by ultra high field MRI or CT.

4.3. Displacement error

A general error size for the reported phenomenon of structural dislocation and its function of depth within alignments to functional maps can hardly be defined, due to the fact that its size depends on several criteria in the individual animal, such as the cortical curvature and its changes within the region of interest, the axial orientation of columnar structures and radial vessels that might not necessarily be oriented strictly orthogonal to the cortical plane as well as the accuracy of the alignment itself. The latter one in particular depends on the precise parallel fit of the functional imaging plane, the FITC vessel map acquisition plane and the cutting plane (see schematic drawing in Fig. 1(A)). However the methodological approach demonstrated here, allows quantifying such errors within each individual case at a high level of accuracy. The p3D reconstruction of the vascular network makes it possible to determine the radial tilt of vessels. Thus the specific dislocation value at a given location within the investigated cortical region can be determined.

First of all this results in a higher control over the shift in the positions of superficial registration points and their deeper layer counterparts. In addition, it allows to make an assumption on the progression of a functional column (e.g. a color blob) within the cortical tissue which should theoretically resemble the progression of a radial vessel at the same location.

For example, the faint CytOx pattern of the supragranular layers 2/3 usually exhibits best contrast within lower layer 3 at a depth of about 400 – $600 \mu\text{m}$ (Weber et al., 2008) and therefore urge experimenters to resort to sections from that depth, at the same time increasing the dislocation error to a size that is nearly the size of the CytOx-blob diameter of $150 \times 200 \mu\text{m}$ (Horton and Hubel, 1981). Landisman and Ts'o (2002) (see their Fig. 7) show disconformities in shape and position (displacement error of $\sim 200 \mu\text{m}$) between functionally imaged color blobs (Lu and Roe, 2008) and their histochemically stained counterpart, that might be partially explained by our findings.

Regarding the alignment of functional columns we think that this method is particularly interesting for studies using optical imaging to investigate the neurovascular coupling at a submillimeter scale down to capillary scale.

Acknowledgements

This work was supported by the Max Planck Society. We are grateful to Anna Wang Roe for useful discussions and valuable advice on the improvement of optical imaging. We address special thanks to Anna Lena Keller for suggestions on the histology of cerebral vasculature, to Jakob Macke for support on writing MatLab code, and to Henry Evrard for general discussions. We are grateful to Frank Schaeffel for help with marmoset refraction and to Jan Kremers for advice on the visual system of marmosets. Special thanks are also due to Rolf Pohmann for the MRI scan of a marmoset.

Appendix A. Supplementary data

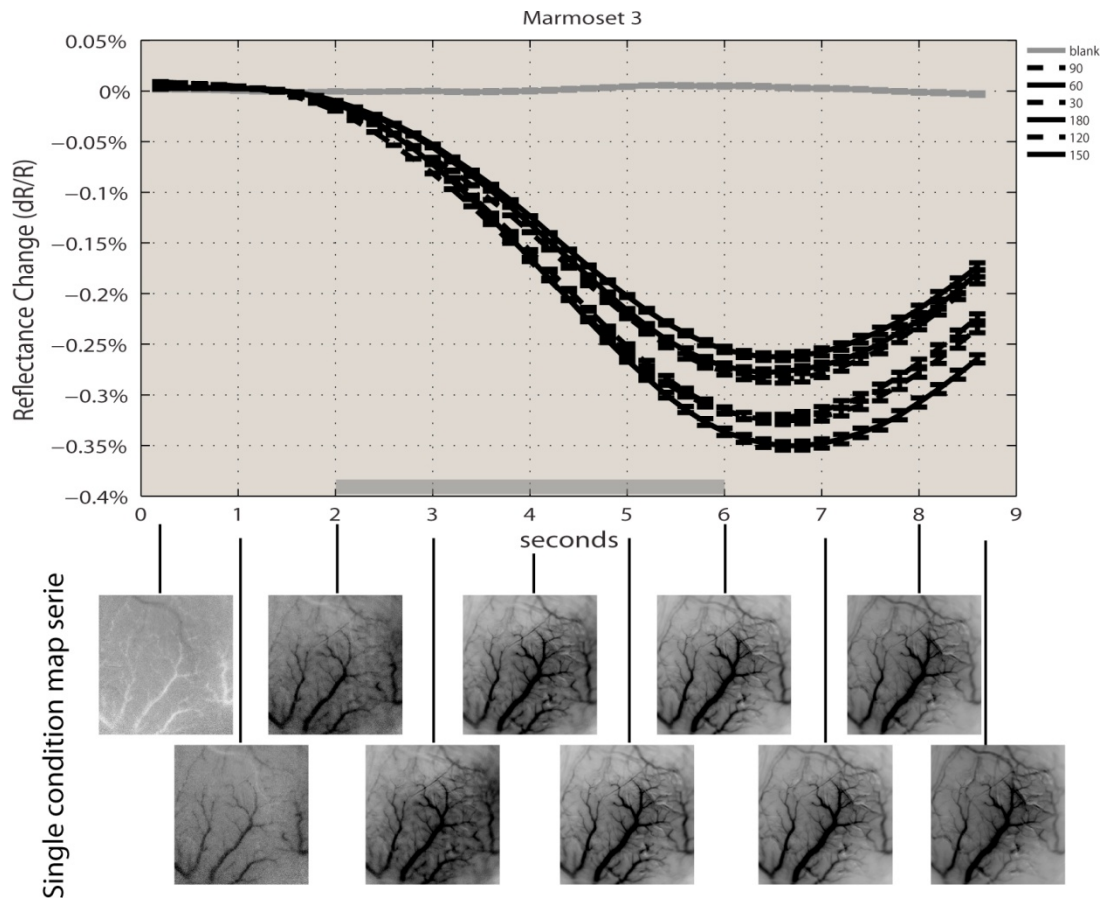
Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jneumeth.2011.07.029.

References

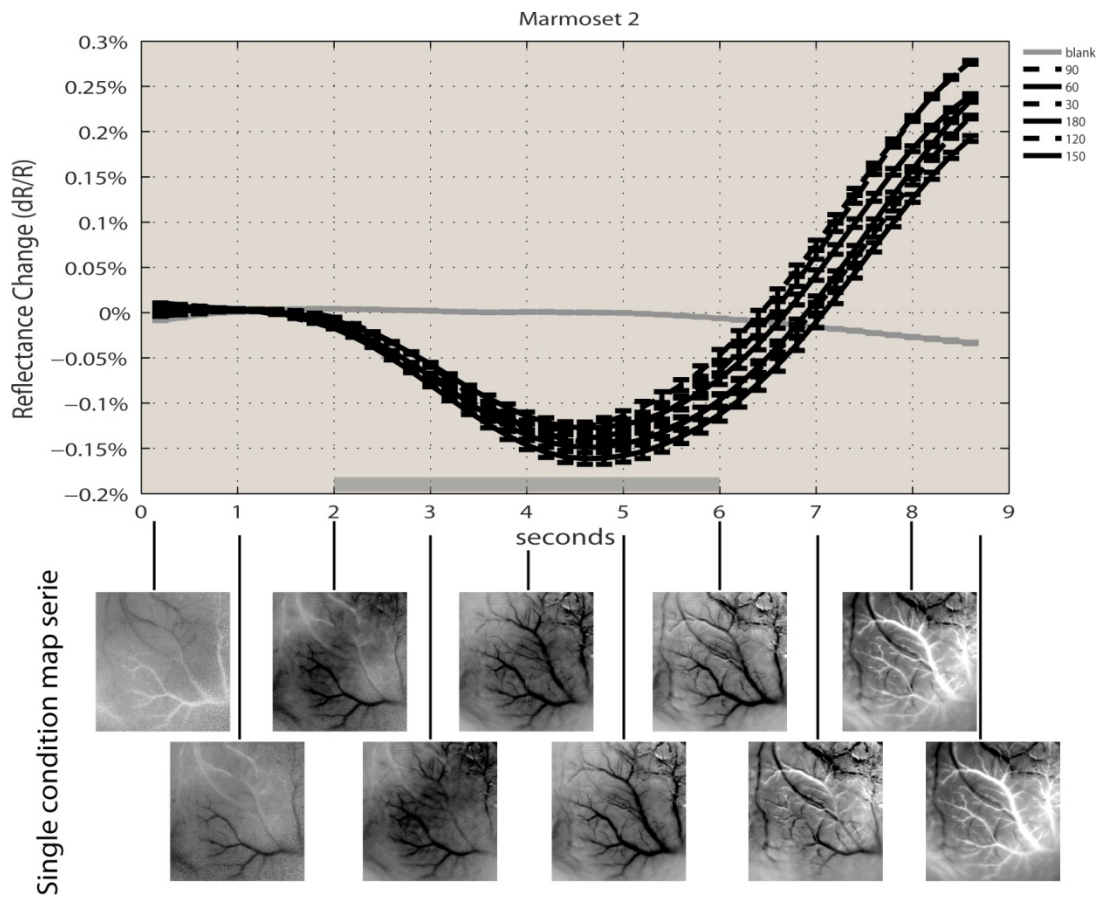
- Adams DL, Horton JC. Ocular dominance columns: enigmas and challenges. *Neuroscience* 2009;15:62–77.
- Arieli A, Grinvald A. Optical imaging combined with targeted electrical recordings, microstimulation, or tracer injections. *J Neurosci Methods* 2002;116:15–28.
- Bartfeld E, Grinvald A. Relationships between orientation-preference pinwheels, cytochrome oxidase blobs, and ocular-dominance columns in primate striate cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11905–9.

- Berwick J, Johnston D, Jones M, Martindale J, Martin C, Kennerley AJ, Redgrave P, Mayhew JEW. Fine detail of neurovascular coupling revealed by spatiotemporal analysis of the hemodynamic response to single whisker stimulation in rat barrel cortex. *J Neurophysiol* 2008;99:787–98.
- Blasdel GG, Salama G. Voltage-sensitive dyes reveal a modular organization in monkey striate cortex. *Nature* 1986;321:579–85.
- Blinder P, Shih AY, Rafie C, Kleinfeld D. Topological basis for the robust distribution of blood to rodent neocortex. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:12670–5.
- Bonhoeffer T, Grinvald A. Iso-orientation domains in cat visual cortex are arranged in pinwheel-like patterns. *Nature* 1991;353:429–31.
- Bonhoeffer T, Grinvald A. Optical Imaging based on intrinsic signals: the methodology. *Brain Mapp Methods* 1996;5:5–97.
- Bourne JA, Rosa MGP. Preparation for the in vivo recording of neuronal responses in the visual cortex of anaesthetised marmosets (*Callithrix jacchus*). *Brain Res Protoc* 2003;11:168–77.
- Carroll EW, Wong-Riley MT. Quantitative light and electron microscopic analysis of cytochrome oxidase-rich zones in the striate cortex of the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 1984;222:1–17.
- Chen LM, Heider B, Williams GV, Healy FL, Ramsden BM, Roe AW. A chamber and artificial dura method for long-term optical imaging in the monkey. *J Neurosci Methods* 2002;113:41–9.
- Duvernoy HM, Delon S, Vannson JL. Cortical blood vessels of the human brain. *Brain Res Bull* 1981;7:519–79.
- Godement P, Vanselow J, Thanos S, Bonhoeffer F. A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development* 1987;101:697–713.
- Horikawa K, Armstrong WE. A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods* 1988;25:1–11.
- Horton JC, Hocking DR. Intrinsic variability of ocular dominance column periodicity in normal macaque monkeys. *J Neurosci* 1996;16:7228–339.
- Horton JC, Hubel DH. Regular patchy distribution of cytochrome oxidase staining in primary visual cortex of macaque monkey. *Nature* 1981;292:762–4.
- Kalatsky VA, Stryker MP. New paradigm for optical imaging: temporally encoded maps of intrinsic signal. *Neuron* 2003;38:529–45.
- Kaskan PM, Lu HD, Dillenburg BC, Roe AW, Kaas JH. Intrinsic-signal optical imaging reveals cryptic ocular dominance columns in primary visual cortex of New World owl monkeys. *Front Neurosci* 2007;1:67–75.
- Keller AL, Schüz A, Logothetis NK, Weber B. Vascularization of cytochrome oxidase-rich blobs in the primary visual cortex of squirrel and macaque monkeys. *J Neurosci* 2011;31:1246–53.
- Landisman CE, Ts'o DY. Color processing in macaque striate cortex: relationships to ocular dominance, cytochrome oxidase, and orientation. *J Neurophysiol* 2002;87:3126–37.
- Livingstone M, Hubel D. Anatomy and physiology of a color system in the primate visual cortex. *J Neurosci* 1984;4:309–56.
- Livingstone MS, Hubel DH. Thalamic inputs to cytochrome oxidase-rich regions in monkey visual cortex. *Proc Natl Acad Sci* 1982;79:6098–101.
- Logothetis NK, Murayama Y, Augath M, Steffen T, Werner J, Oeltermann A. How not to study spontaneous activity. *NeuroImaging* 2009;45:1080–9.
- Lu HD, Roe AW. Functional organization of color domains in V1 and V2 of macaque monkey revealed by optical imaging. *Cereb Cortex* 2008;18:516–33.
- Lu HD, Roe AW. Optical imaging of contrast response in macaque Monkey V1 and V2. *Cereb Cortex* 2007;17:2675–95.
- Macke JH, Gerwinn S, White LE, Kaschube M, Bethge M. Gaussian process methods for estimating cortical maps. *NeuroImag* 2011;56:570–81.
- Malach R, Tootell RBH, Malonek D. Relationship between orientation domains, cytochrome oxidase stripes, and intrinsic horizontal connections in squirrel monkey Area V2. *Cereb Cortex* 1994;4:151–65.
- Mc Loughlin NP, Blasdel GG. Wavelength-dependent differences between optically determined functional maps from macaque striate cortex. *NeuroImaging* 1998;7:326–36.
- Mrsic-Flogel T, Hübener M, Bonhoeffer T. Brain mapping: new wave optical imaging. *Curr Biol* 2003;13:R778–80.
- Niessing M, Schmidt K, Singer W, Galuske R. Precise placement of multiple electrodes into functionally predefined cortical locations. *J Neurosci Method* 2003;126:195–207.
- Oberlaender M, Bruno RM, Sakmann B, Broser PJ. Transmitted light brightfield mosaic microscopy for three-dimensional tracing of single neuron morphology. *J Biomed Opt* 2007;12(December):064029.
- Pattinson KTS, Rogers R, Mayhew SD, Tracey I, Wise RG. Pharmacological fMRI: measuring opioid effects on the BOLD response to hypercapnia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;27:414–23.
- Polimeni JR, Granquist-Fraser D, Wood RJ, Schwartz EL. Physical limits to spatial resolution of optical recording: CLARIFYING the spatial structure of cortical hypercolumns. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:4158–63.
- Ratzlaff EH, Grinvald A. A tandem-lens epifluorescence microscope: hundred-fold brightness advantage for wide-field imaging. *J Neurosci Method* 1991;36:127–37.
- Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Method* 2000;103:23–37.
- Roe AW, Fritsches K, Pettigrew JD. Optical imaging of functional organization of V1 and V2 in marmoset visual cortex. *Anat Rec Part A: Discov Mol Cell Evol Biol* 2005;287A:1213–25.
- Schaeffel F, Hagel G, Eikermann J, Collett T. Lower-field myopia and astigmatism in amphibians and chickens. *J Opt Soc Am A* 1994;11:487–95.
- Schiessl I, McLoughlin N. Optical imaging of the retinotopic organization of V1 in the common marmoset. *NeuroImaging* 2003;20:1857–64.
- Sincich LC, Horton JC. The circuitry of V1 and V2: integration of color, form, and motion. *Annu Rev Neurosci* 2005;28:303–26.
- Swindale NV, Matsubara JA, Cynader MS. Surface organization of orientation and direction selectivity in cat area 18. *J Neurosci* 1987;7:1414–27.
- Troilo D, Quinn N, Baker K. Accommodation and induced myopia in marmosets. *Vis Res* 2007;47:1228–44.
- Tsai PS, Kaufhold JP, Blinder P, Friedman B, Drew PJ, Karten HJ, Lyden PD, Kleinfeld D. Correlations of neuronal and microvascular densities in murine cortex revealed by direct counting and colocalization of nuclei and vessels. *J Neurosci* 2009;29:14553–70.
- Valverde Salzmann MF, Logothetis NK, Pohmann R. High-resolution imaging of vessels in the isolated rat brain. Montreal, Quebec, Canada: ISMRM; 2011.
- Vanzetta I, Slovin H, Omer DB, Grinvald A. Columnar resolution of blood volume and oximetry functional maps in the behaving monkey: implications for fMRI. *Neuron* 2004;42:843–54.
- Weber B, Keller AL, Reichold J, Logothetis NK. The microvascular system of the striate and extrastriate visual cortex of the macaque. *Cereb Cortex* 2008;18:2318–30.
- Wong-Riley M. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res* 1979;171:11–28.
- Xiao Y, Casti A, Xiao J, Kaplan E. Hue maps in primate striate cortex. *NeuroImaging* 2007;35:771–86.
- Xu X, Bosking W, Sary G, Stefansic J, Shima D, Casagrande V. Functional organization of visual cortex in the owl monkey. *J Neurosci* 2004;24:6237–47.
- Yoshioka T, Blasdel GG, Levitt JB, Lund JS. Relation between patterns of intrinsic lateral connectivity, ocular dominance, and cytochrome oxidase-reactive regions in macaque monkey striate cortex. *Cereb Cortex* 1996;6:297–310.
- Yoshioka T, Dow BM. Color, orientation and cytochrome oxidase reactivity in areas V1, V2 and V4 of macaque monkey visual cortex. *Behav Brain Res* 1996;76:71–88.
- Zepeda A, Arias C, Sengpiel F. Optical imaging of intrinsic signals: recent developments in the methodology and its applications. *J Neurosci Method* 2004;136:1–21.

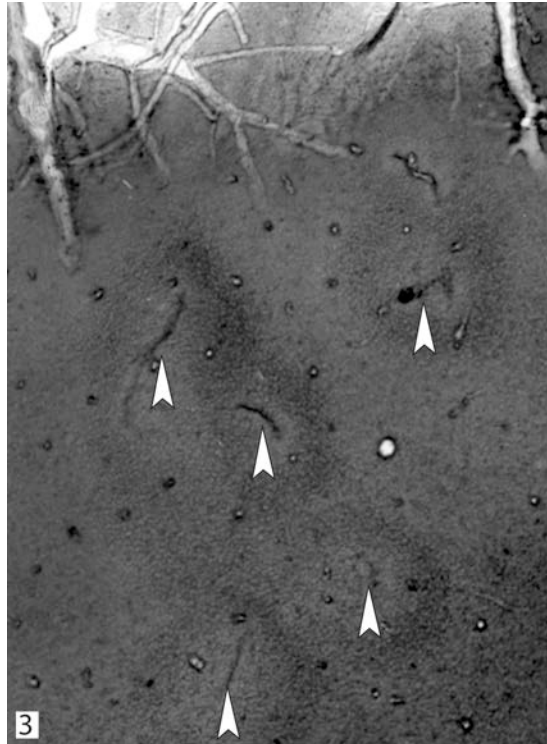
4.1.1 Supplementary figures



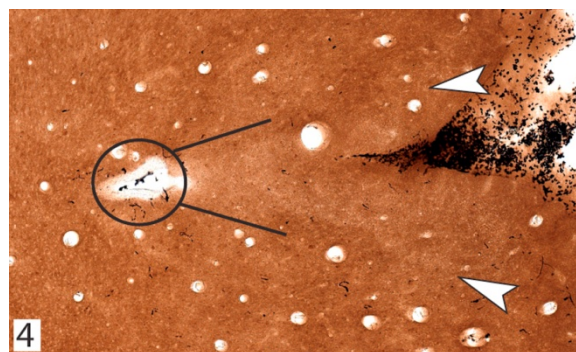
Supplementary figure 1. Timecourse of the intrinsic response to grating stimuli in marmoset 3. Six achromatic square wave gratings and a blank stimulus were presented. Stimulus duration is indicated by the gray bar. Calculations of the timecourse were based on pixel intensity values from the single condition map series. The development of the vessel pattern in the single condition map series following stimulation is shown below.



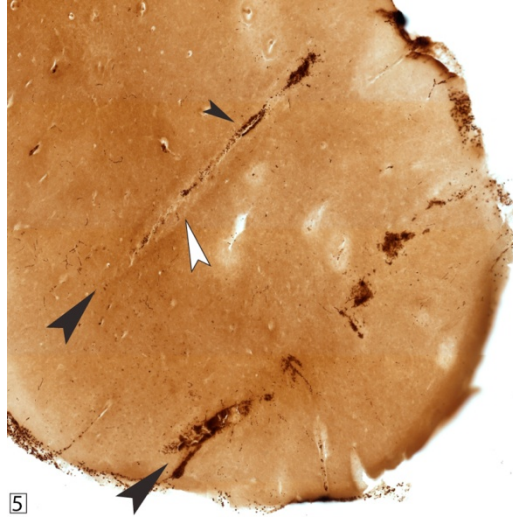
Supplementary figure 2. Timecourse of the intrinsic response to grating stimuli in marmoset 2. Six achromatic square wave gratings and a blank stimulus were presented. Stimulus duration is indicated by the gray bar. Calculations of the timecourse were based on pixel intensity values from the single condition map series. The development of the vessel pattern in the single condition map series following stimulation is shown below.



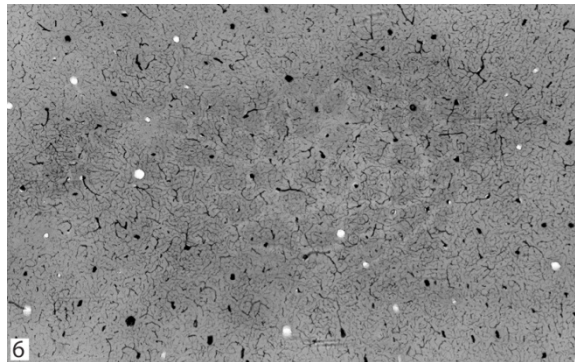
Supplementary figure 3. Needle holes as extrinsic markers in histologically stained tissue. 100 μm tangential section from a marmoset brain stained for CytOx. Penetrations with a thin 25G needle were made 30 min after the intracardial perfusion of the animal with PB and 4% PFA. Arrows mark several penetration sites. The coronal darkening around the penetration sites indicate that the penetrations had a strong effect on the CytOx reactivity of the tissue.



Supplementary figure 4. Effect of lesions on a histological staining result. 100 μm tangential section from a marmoset brain stained for CytOx. The black circle marks the position of an electrolytic lesion (penetrations were made using a standard tungsten electrode (d=200 μm)). Arrows mark (V shaped) artifacts in CytOx staining induced by the electrode track.



Supplementary figure 5. Artifacts due to electrode penetrations. Two parallel electrode tracks (standard tungsten electrodes ($d= 200 \mu\text{m}$)) in a tangential section of a rat brain stained for CytOx. Electrode tracks (large black arrows) are partly filled with blood (small black arrow) and a coronal effect on the CytOx reactivity is visible (white arrow) along the track.



Supplementary figure 6. Vascular lumen labeling with non-fluorescent dyes. $100 \mu\text{m}$ tangential section from the barrel cortex of the rat stained for CytOx. The animal was perfused with gelatin stained with black ink for labeling the vascular lumen. The staining result is comparable to other approaches using photobleaching solutions (e.g. see Berwick et al., 2008). On a closer look one can see the fine network of labeled capillaries that pervade the entire section. In addition, larger vessels obscure the contours of the barrels.

**4.2 Color Blobs in Cortical Areas V1 and V2 of the New World Monkey *Callithrix jacchus*,
Revealed by Non-differential Optical Imaging.**

Color Blobs in Cortical Areas V1 and V2 of the New World Monkey *Callithrix jacchus*, Revealed by Non-Differential Optical Imaging

Matthias F. Valverde Salzmann,¹ Andreas Bartels,^{1,2} Nikos K. Logothetis,^{1,3} and Almut Schüz¹

¹Max Planck Institute for Biological Cybernetics, D-72076 Tübingen, Germany, ²Vision and Cognition Laboratory, Centre for Integrative Neuroscience, University of Tübingen, D-72076 Tübingen, Germany, and ³Division of Imaging Science and Biomedical Engineering, University of Manchester, Manchester M13 9PT, United Kingdom

Color vision is reserved to only few mammals, such as Old World monkeys and humans. Most Old World monkeys are trichromats. Among them, macaques were shown to exhibit functional domains of color-selectivity, in areas V1 and V2 of the visual cortex. Such color domains have not yet been shown in New World monkeys. In marmosets a sex-linked dichotomy results in dichromatic and trichromatic genotypes, rendering most male marmosets color-blind. Here we used trichromatic female marmosets to examine the intrinsic signal response in V1 and V2 to chromatic and achromatic stimuli, using optical imaging. To activate the subsystems individually, we used spatially homogeneous isoluminant color opponent (red/green, blue/yellow) and hue versus achromatic flicker (red/gray, green/gray, blue/gray, yellow/gray), as well as achromatic luminance flicker. In contrast to previous optical imaging studies in marmosets, we find clearly segregated color domains, similar to those seen in macaques. Red/green and red/gray flicker were found to be the appropriate stimulus for revealing color domains in single-condition maps. Blue/gray and blue/yellow flicker stimuli resulted in faint patch-patterns. A recently described multimodal vessel mapping approach allowed for an accurate alignment of the functional and anatomical datasets. Color domains were tightly colocalized with cytochrome oxidase blobs in V1 and with thin stripes in V2. Thus, our findings are in accord with 2-Deoxy-D-glucose studies performed in V1 of macaques and studies on color representation in V2. Our results suggest a similar organization of early cortical color processing in trichromats of both Old World and New World monkeys.

Introduction

Color vision in primates is segregated into the parvocellular (PC) [red/green (L–M)-cone], the koniocellular (KC) [blue/yellow (S-(L+M)-cones)], and the magnocellular (MC) pathway [luminance (L+M)-cones]. These pathways originate in the retina and project in parallel to V1 via the LGN (Casagrande, 1994).

Anatomical investigations in macaques and owl monkeys showed that cytochrome oxidase (CO) blobs (Wong-Riley, 1979; Horton and Hubel, 1981) receive inputs from the KC layers of the LGN (Hendry and Yoshioka, 1994; Ding and Casagrande, 1997, 1998). Reports on PC and MC inputs to V1 are contradictory, but some find preferences for PC projections to blobs and MC projections to interblobs (via layer 4C α) (Sincich and Horton, 2005).

Thus, a blob-related segregation of V1 by geniculate inputs seems to be in accordance with early findings of Livingstone and Hubel (1984), suggesting that blobs are color processing domains. However, this functional-anatomical relation is highly controversial (Martin, 2004).

Tootell et al. (1988) investigated cortical responses to color opponent and color/achromatic flicker stimuli by 2-deoxy-D-glucose (2DG) autoradiography in macaques. They showed a colocalization of CO blobs with regions of increased 2DG labeling. These findings were supported by optical imaging (OI) studies in macaques (Landisman and Ts'o, 2002; Xiao et al., 2007; Lu and Roe, 2008). There, color domains were mapped by differential OI: single-condition maps evoked by color opponent gratings were correlated with those evoked by achromatic gratings. Notably, Landisman and Ts'o (2002) found that red/green but not blue/yellow gratings allowed reliable blob imaging, compromising their initial assumption that S-cone-selective stimuli would allow them to investigate the segregation of PC and KC inputs.

A polymorphism that occurs in marmosets and other New World monkeys could play a key role in investigations of color vision. The marmoset X-chromosome carries only one gene coding for one of three (L–M)-cones (Williams et al., 1992; Jacobs et al., 1993; Yeh et al., 1995; Kawamura et al., 2001). Two of them each coding for a slightly different L- or M-cone are necessary for trichromatic vision. Thus, most males and some females show

Received Sept. 22, 2011; revised Feb. 15, 2012; accepted March 29, 2012.

Author contributions: M.F.V.S. designed research; M.F.V.S. performed research; M.F.V.S., A.B., and N.K.L. contributed unpublished reagents/analytic tools; M.F.V.S. and A.B. analyzed data; M.F.V.S., A.B., and A.S. wrote the paper.

This work was supported by the Max Planck Society. We are grateful to Adrian Streit (Max Planck Institute for Developmental Biology, Tübingen, Germany) for help and support on the genetic profiling of our animals. Special thanks go to Anna Wang Roe and Damian Wallace for helpful discussions on optical imaging in marmosets. We are grateful to Jan Kremers for discussions on the visual system of marmosets and to Frank Schaeffel for support on marmoset refraction.

Correspondence should be addressed to Matthias F. Valverde Salzmann, Department of Physiology of Cognitive Processes, Max Planck Institute for Biological Cybernetics, Spemannstrasse 38, D-72076 Tübingen, Germany. E-mail: matthias.valverde@tuebingen.mpg.de.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.4832-11.2012

Copyright © 2012 the authors 0270-6474/12/327881-14\$15.00/0

dichromatism (Hunt et al., 1993), which impairs their ability to distinguish reds and greens (Blessing et al., 2004; Conway, 2009).

Two studies investigated whether dichromatic marmosets expose color domains, one using differential OI (red/green versus blue/yellow gratings) (Roe et al., 2005b), the other one using single-condition OI (red/green, blue/yellow gratings) (Buzás et al., 2008). Functional domains were not found, suggesting a homogeneous distribution of KC inputs into V1.

Here we studied trichromatic marmosets by using single-condition OI. We found that color opponent flicker revealed functional color domains in these animals. Alignments with anatomical stains revealed a colocalization with CO blobs in V1 and with thin stripes in V2. These results resemble those shown for macaques (Michael, 1981; Livingstone and Hubel, 1984; Yoshioka and Dow, 1996; Roe and Ts'o, 1999; Ts'o et al., 2001; Landisman and Ts'o, 2002; Xiao et al., 2003, 2007; Lu and Roe, 2008; Lim et al., 2009) and suggest a similar organization of early cortical color processing in trichromatic Old World and New World monkeys.

Materials and Methods

Animals. Three female adult marmosets (*Callithrix jacchus*; 400–550 g) were used in this study (see also Valverde Salzmann et al., 2011). The animals were kept in pairs in enriched climatized cages of up to 6 m³ in size, and received water *ad libitum* and daily fresh and changing fruits, vegetables, Arabic gum (Marmoset gum, Mazuri Europe), marmoset pellets (Mini Marex, Mazuri Europe), and animal proteins in the form of eggs, locusts, and mealworms. All surgical and experimental procedures were approved by the local authorities (Regierungspraesidium) and are in full compliance with the directive of the European community for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC). For a detailed description of our surgical, anesthesia protocols and of the alignment of anatomical and functional data, see Valverde Salzmann et al. (2011).

Surgery, anesthesia. Animals were anesthetized using remifentanyl (Ultiva, GlaxoSmithKline; 0.06–0.1 µg/kg/min, i.v.) and additional doses of sevofluran (Sevorane, Abbott Laboratories) (4–6% in medical O₂ applied during the surgery via a facemask and 0–1.5% during experimental conditions via tracheal tube). Muscle relaxation during the experiment was achieved using Mivacron (1 mg/kg body weight/h, i.v.). All incision sites were additionally pre-treated with local injections of Lidocain-HCl (2%, B. Braun). The femoral vein was cannulated for the infusion of the opioids and additional electrolyte solutions (Aminin, Meril; Jonosteril, Fresenius Kabi). A tracheotomy was performed for mechanical ventilation. Animals were respiration at 38–45 strokes/min with a mixture of medical air and O₂ (ratio 80%:20%). End-tidal CO₂ was measured and kept at 3.4 ± 1% by adjusting respiration rate and/or stroke volume. A craniotomy of ~5 mm radius was made over the visual cortex. The dura mater was kept intact. An optical chamber was implanted and filled with agarose gel (6% in NaCl, type VII Sigma-Aldrich Chemie). Physiological parameters and anesthetic depth were constantly monitored by recording ECG, EEG, SpO₂ (kept at >98%), and body temperature. The latter was adjusted to 37 ± 1°C via a heated silicone gel pad.

Preparation for optical recordings. The animals were mounted into a stereotactic apparatus and the eyes were focused on the stimulus screen (24 inch LCD monitor, gamma corrected, Belinea.display 4.1, Belinea; refresh rate, 70 Hz)—placed 50 cm in front of the animals' eyes—by

Table 1. Stimulus specifications: CIE coordinates for all hues of the color-varying and luminance-varying stimuli

Stimulus hues	Luminance (Y: cd/m ²)	CIE coordinates	
		x	y
Gray (blank)	80.57	0.3062	0.3165
Red	39.6	0.6471	0.3382
Gray	37.54	0.3043	0.3139
Red	39.31	0.6465	0.3378
Green	36.7	0.2733	0.59
White	179.23	0.309	0.3333
Black	0.2	0.259	0.2567
Blue	13.29	0.1445	0.0642
Gray	9.74	0.3028	0.3119
Blue	13.21	0.1445	0.0641
Yellow	12.32	0.4075	0.4881
Green	35.49	0.2734	0.5903
Gray	35.74	0.3047	0.3149
Yellow	163.11	0.4152	0.5093
Gray	166.22	0.3114	0.3303

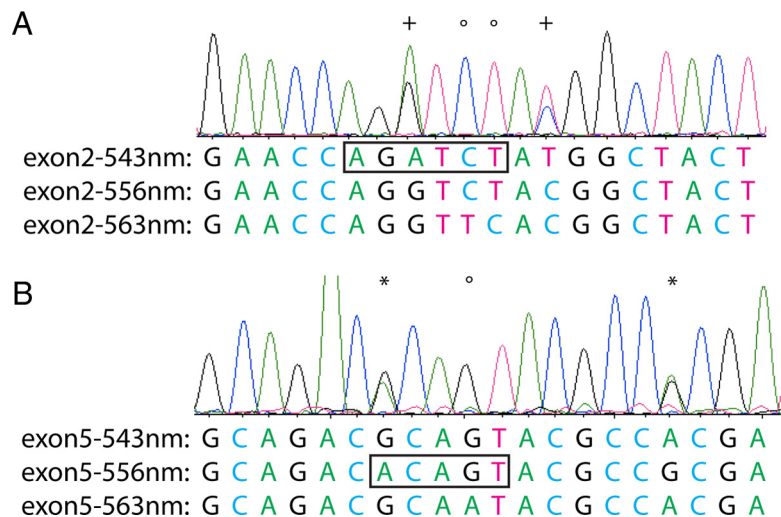


Figure 1. Genotype determination. **A** shows the sequences of the three alleles around the 543 nm-specific BglIII site (boxed) in exon 2 described by Blessing et al. (2004). The sequence shown is derived from M3. The sense strand is shown. The other two animals were identical. **B** shows the sequences of the three alleles around the 556 nm-specific HpyCH4III site (boxed) in exon 5 described by Blessing et al. (2004). The sequence shown is derived from M1. The anti-sense strand is shown. M2 was identical. M3 looked the same but the quality of the sequences was poor. + confirms the presence of an allele for 543 nm; ° confirms the presence of an allele for 556 nm; * excludes the allele for 563 nm. The sequences were taken from GenBank. Accession numbers AF051595 (exon 2–543 nm), AY142349 (exon 5–543 nm), AF051589 (exon 2–556 nm), AF227248 (exon 2–556 nm), XM_002763410 (whole gene 563 nm).

using PMM contact lenses (Soflex Israelens Contact Lenses Ltd.) and an infrared video refractor (Schaeffel et al., 1994; Troilo et al., 2007). The stimulus screen spanned 55° horizontal × 37.5° vertical of the animal's central field of view. The eyes were moistened with saline in regular intervals and a clear view through the artificial lenses was ensured throughout experimental conditions by periodic eye checks.

Optical imaging. We recorded the intrinsic signals at red light illumination (6xLED ring light, peak wavelength 634 nm Nichia 5 mm LED NSPR510CS, Lumitronix LED-Technik) and an Optical Imaging Inc. 3001 system with a Dalsa 1M60P camera. Reflectance changes were recorded at 60 Hz at full camera resolution (1020 × 1020 pixel). Temporal binning was applied, resulting in a reduction of the raw frame rate to 5 Hz. All stimuli were presented randomly 40 times in blocks. Each block consisted of a set of 2, 6 or 7 stimuli and a blank stimulus (see Visual stimuli for details). During the blank condition, as well as the interstimulus phases, a gray screen was presented to the animal. Stimuli were presented for 3–4 s, 2 s after frame recording started. Fifty frames were recorded during each presentation. Interstimulus intervals ranged be-

tween 13 and 15 s. The cortical responses to each stimulus were averaged. Thus, each stimulus condition showed the time course of the mean reflectance changes of 40 stimulations over 50 frames.

Visual stimuli. All stimuli were generated by an OpenGL custom program (Sheinberg and Logothetis, 2001) (see Preparation for optical recordings for monitor description). We used four classes of stimuli. In two of them, one uniform full-screen color was alternated with another uniform full-screen color in time at 1.5 Hz (temporal profile: square wave). Using the terminology of Tootell et al. (1988), we refer to these as color-varying stimuli, where one hue was alternated with another, isoluminant hue, with pairs being red/green, blue/yellow, red/gray, green/gray, blue/gray, and yellow/gray. The second class were luminance-varying stimuli, where black and white were alternated, and the third was a blank condition (gray screen). A final set of stimuli consisted of achromatic moving square wave gratings (spatial frequency 1.2 cycles/degree; temporal frequency 2 Hz) of six different orientations that alternated movement direction every 0.75 s. The luminance (cd/m^2) and spectral coordinates (x, y) of each stimulus color were measured using a Konica Minolta CS1000 spectrometer, and are listed in Table 1. Table 3 lists the estimated marmoset-specific L,M,S-cone activations elicited by each of the stimuli (see Results).

Three stimulus block protocols (a to c) were used in this study. The first stimulus block (a) consisted of one color-varying condition (e.g., red/green) and a luminance flicker condition (i.e., black/white) as well as a blank condition (gray screen). This protocol was applied only in case M1. The second stimulus block (b) consisted of all color-varying conditions, the luminance-varying condition, and the blank condition. This protocol was used to stimulate cases M2 and M3. The third stimulus block (c) used achromatic drifting square wave gratings and was presented to each animal after the color stimulus blocks. All stimuli were presented binocularly.

In addition, two animals were stimulated monocularly. For this purpose the eye ipsilateral to the cortical hemisphere on which imaging was performed was covered with black tape. Animal M1 viewed the stimulus protocols (a,c) and animal M2 viewed protocols (b,c) through their contralateral eyes.

Intrinsic optical imaging data processing. Intrinsic optical imaging (IOI) data processing was performed using custom written scripts executed in Matlab (The MathWorks). Image processing was done pixelwise in all cases. Map calculations and filtering were based on a modified version (Valverde Salzmann et al., 2011) of protocols published by Lu and Roe (2007). We used a frame-zero-subtraction to calculate single-condition map time series of the optical reflectance changes ($\Delta R/R$) for the relevant 46 (of 50) frames of each stimulus condition. The map of the single-condition map series that revealed the response pattern most clearly was used for further signal correlation analysis. This was usually a map corresponding to the point in time 1–2 s after stimulus onset. In single conditions where no pattern was observed, the map corresponding in time to the pattern map was used for further demonstration. To increase the contrast of the single-condition maps we set a threshold level of $\pm 5\%$ for clipping the pixel intensities. Only maps of case M3 were clipped at lower levels ($\pm 2\%$) for enhanced visualization of functional compartmentalization. The maps of case M3 in Figure 6 (see below) were also clipped at $\pm 5\%$. Contours of signal compartments were calculated using the contour method (Matlab). To determine the center coordinates of color patches, we refer to a method by Lu and Roe (2008). Discs with a diameter of $200 \mu\text{m}$ were fitted to the position of signal patches. A distance measurement of the disc center coordinates was then performed based on the location of nearest neighbors (Landisman and Ts'o, 2002).

Histology. At the end of the experiment the anesthetic depth was increased by adjusting the rate of sevofluran to 5% and the remifentanyl infusion was increased to $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Animals were then killed by an injection of a lethal dose of pentobarbital (1.5 ml of Narcoren, 160 mg/ml, intracardially). The animal was perfused through the heart with 100–150 ml of PB (0.1 M) followed by 300 ml of 4% buffered PFA (Roti-Histofix, Carl Roth GmbH). After that, animals were processed for labeling of the brain vasculature by perfusion with fluorescence-labeled gelatin. Before cutting tangential sections with a freezing microtome, we took an image of the labeled surface vasculature

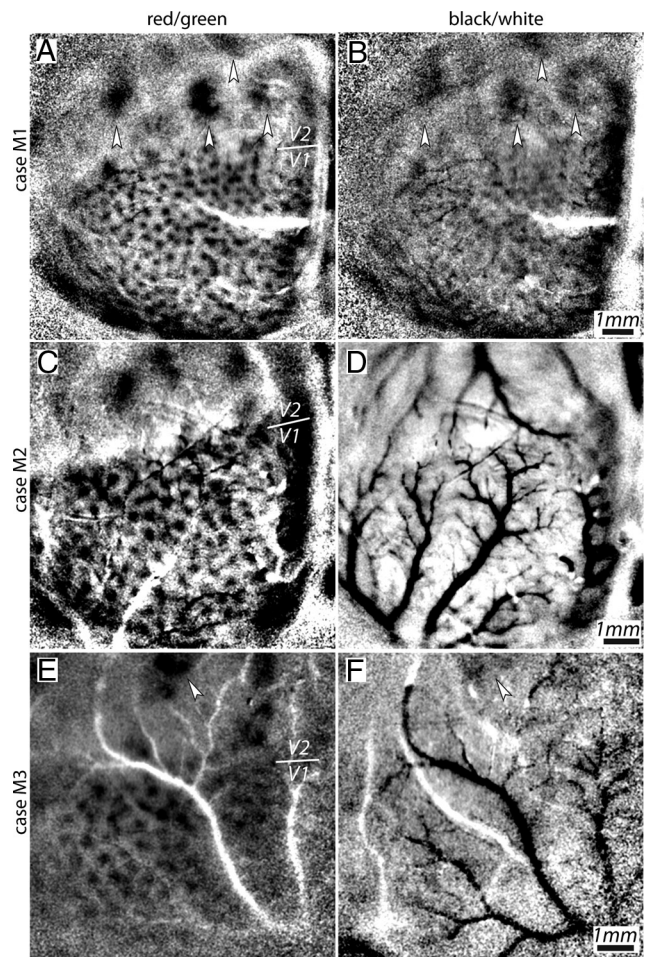


Figure 2. Functional color patches in the visual cortex of a marmoset. **A–F**, single-condition maps from intrinsic OI recorded in the left hemisphere of 3 marmosets (superior sagittal sinus is located on the right side of the pictures). **A, C**, and **E** show IOI maps of the intrinsic response to color-varying (red/green) flicker stimuli. A patchy pattern of activated functional domains can be seen. In V1 (lower half of the pictures) the mapped domains show the typical distance of $400\text{--}450 \mu\text{m}$ (see Colocalization of functional color patches with CO blobs in visual area V1 for quantification). In V2 (upper half of the pictures) larger areas with center to center distances of $2\text{--}2.5 \text{ mm}$ responded to the stimulus. **B, D**, and **F** show the corresponding intrinsic response maps obtained with luminance-varying (black/white). These maps lack any clear pattern formation.

of the imaged cortex region. This image served as a template of the physiological state of the cortex used for the precise alignment of the histological preparations to the functional IOI maps. A modified version of the CO staining protocol by Wong-Riley (1979) was used to reduce distortions (see Valverde Salzmann et al., 2011, for modifications) during tissue processing. Images of the stained sections were taken using an AxioImager.Z1 microscope (Zeiss) with a $5\times$ objective (Neofluar, Zeiss). The images were then registered and aligned to the functional data, and a pseudo three-dimensional reconstruction of the sectioned tissue was made to take into account the three-dimensional nature of the cortical architecture, particularly with regard to cortical curvature and the tilt of radial structures, such as vessels and cortical columns (Valverde Salzmann et al., 2011).

Histological image processing. The images of the stained sections were filtered in the spatial domain by using a Gaussian ($\sigma = 35 \mu\text{m}$) and a radial filter (diameter = $400 \mu\text{m}$). The images of 3 adjacent sections exhibiting blob patterns of V1 were averaged to increase signal-to-noise ratio. The same was done on the images of the three sections exhibiting the stripes of V2. In doing so, we also took the depth shift of the CO signal due to cortical curvature into account. This approach was derived from the multimodal vessel mapping approach used here in combination with

the three-dimensional reconstruction of the processed cortical tissue (Valverde Salzmann et al., 2011). For a center distance measurement of CO blobs, the same method as described in IOI data processing for color patch distance measurements was applied.

Genotype determination. Samples for the genetic analysis were taken from the bloodless liver of the perfused animals to avoid false-positive results due to chimerism (Benirschke et al., 1962; Signer et al., 2000; Kawamura et al., 2001). The tissue samples were washed 6 times for 10 min in 1 ml of TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) at 55°C. Then the samples were incubated in 50 μ l of TE supplemented with 1.7 mg/ml proteinase K for 2 h at 55°C. TE (100 μ l) supplemented with 1 mg/ml proteinase K was added to each sample and incubation continued at 55°C for 3 h followed by 10 min incubation at 75°C to inactivate the proteinase K. One microliter of the solution per reaction was used as template for PCR amplification of exons 2 and 5 of the X chromosomal rod opsin gene using the primers described previously (Hunt et al., 1993; Yeh et al., 1995; Blessing et al., 2004). The PCR was performed in 25 μ l of PCR buffer (New England Biolabs) in the presence of 0.2 mM each primer, 0.04 mM each dNTP, 0.2 mg/ml BSA and 1.5 U of TaqDNA Polymerase (New England Biolabs). For the PCR program, an initial denaturation step (94°C for 2 min) was followed by 35 cycles of 94°C for 30 s (denaturing), 57°C for 30 s (annealing), 72°C for 30 s (extension), and a final extension step (72°C for 7 min). The resulting PCR products were agarose gel purified using the QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and submitted to the on campus sequencing facility at the Max Planck Institute for Developmental Biology for sequencing from both sides using the same primers as for the PCR. The sequences were compared with the published sequences for the different X chromosomal rod opsin alleles (GenBank accession numbers: AF051595, exon 2, 543 nm; AY142349, exon 5, 543 nm; AF051589, exon 2, 556 nm; AF227248, exon 2 556 nm; XM_002763410, whole gene, 563 nm). See Figure 1 for exemplary demonstration of the sequencing results of exon 2 and 5.

Results

Color domains in marmosets

In each of the three monkeys (M1, M2, M3) used for this study, visual stimulation with red/green flicker of a low temporal frequency of 1.5 Hz resulted in intrinsic signal maps showing a patchy columnar-like distribution of signal peaks in primary and secondary visual areas (Fig. 2*A, C, E*). The patches were clearly segregated from neighboring patches by zones of low intrinsic signal responses indicating low stimulus specificity. Thus, these patterns showed the typical appearance of functional color domain patterns reported in previous studies in the macaque monkey (Lu and Roe, 2008). In contrast, black/white flicker presented to the same animals resulted in maps without obvious pattern formation (Fig. 2*B, D, F*).

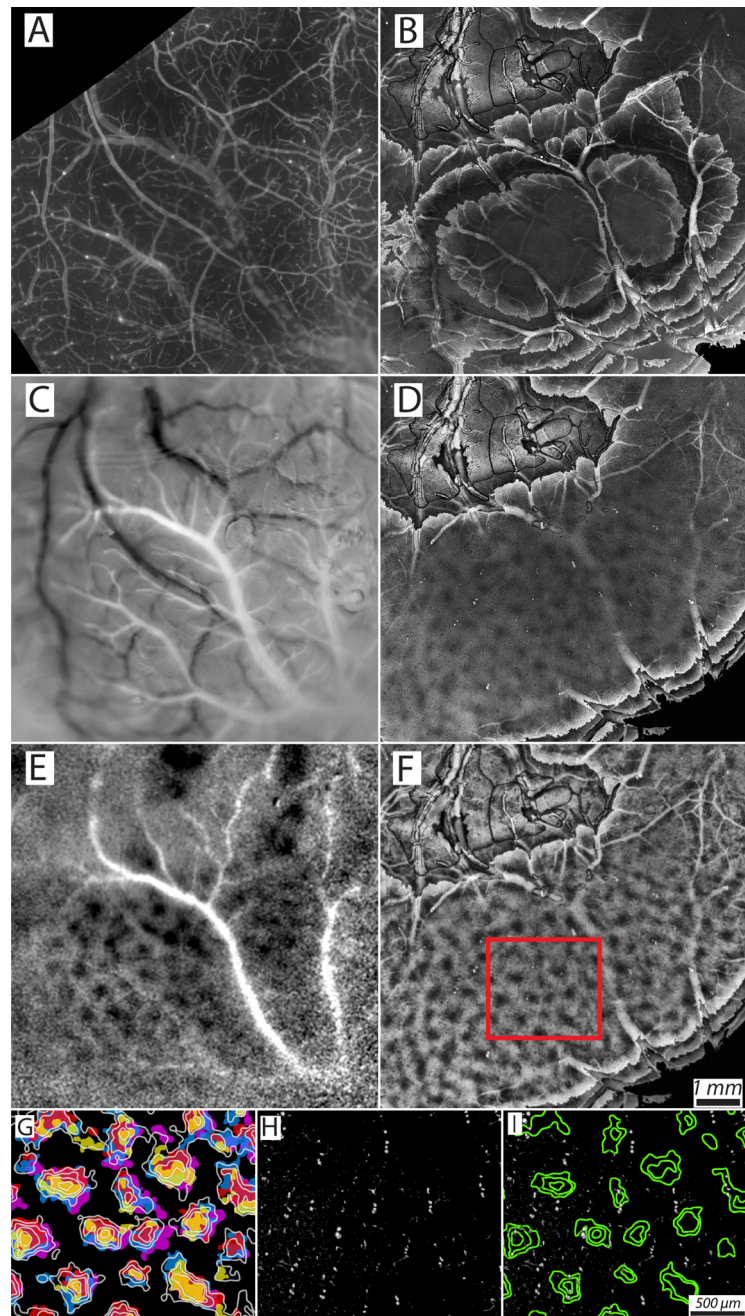


Figure 3. Alignment of functional domains to CO rich zones in histological sections. A multimodal vessel mapping approach was applied to ensure accurate alignment (Valverde Salzmann et al., 2011). *A*, FITC-vessel-map of the cortical surface vasculature. *B*, A stack of tangential sections through the visual cortex, registered to the FITC vessel map. *C*, IOI-vessel-map that was used to align the FITC vessel map in *A*, as well as the 3D reconstruction in *B*, to the functional data. *D*, Section from lower layer 2/3 through V1 stained for CO showing the typical blob pattern. *E*, Intrinsic signal map showing functional color domains. *F*, Averaged CO signal from 3 adjacent sections of layer 2/3 (including section shown in *D*) to increase signal-to-noise ratio. The red box marks a region of interest, shown in more detail in *G–I*. *G*, Color-coded CO blobs from 4 neighboring sections (each 100 μ m thick). Colors (yellow, red, blue, pink) indicate different sections. Contour lines of the averaged CO blob signal are superimposed (white). *H* shows the depth-related displacement of cross sections of radial vessels in the 3D reconstruction. The displacement is a function of the angular orientation of the radial vessels and the cortical curvature. In *I*, the contours of the averaged CO blob signal are superimposed onto *H* to indicate the influence of this displacement on other radial structures such as the columnar CO blobs.

However, we found faint spots of increased stimulus responses in area V2 of cases M1 and M3 that roughly matched with patches seen in the red/green condition maps (see arrows). This colocalization is consistent with results reported for the macaque monkey that color and luminance stimuli activate the same functional regions in V2 (Roe et al., 2005a).

Alignment of functional data with anatomical data

Functional anatomical studies are known to be affected by methodological difficulties in the alignment of the functional data to histologically processed preparations, as has been frequently stated by several authors (Polimeni et al., 2005; Sincich and Horton, 2005; Xiao et al., 2007; Adams and Horton, 2009). Different methodological approaches have been developed to overcome such difficulties. We used a multi modal vessel mapping approach described previously (Valverde Salzmann et al., 2011) to ensure accurate alignment of the functional and anatomical data (Fig. 3). An image of the superficial cortical vasculature labeled by a filling with fluorescent gelatin (Fig. 3A) was used as a precise template of the cortical physiology. Based on that template, distortions of sections were corrected by nonlinear image transformation algorithms. Thus, a three-dimensional reconstruction of the sectioned tissue was obtained (Fig. 3B) which allows for a highly precise alignment of functional maps (Fig. 3C,E) with histological data. The elaborate protocol of this approach allowed us to determine the tilt of radial structures within the imaged cortical region, e.g., of radial vessels descending from the surface of the cortex into deeper layers. Thereby we were able to determine and reduce the dislocation error of functional signals. In addition, this approach enabled us to determine the tilt of the columnar CO blobs (Fig. 3D) throughout the upper layers 2/3. By averaging the CO signal intensities of the corresponding sections (Fig. 3F) we achieved a more precise localization of the CO blobs of layer 2/3 (Fig. 3G–I) while taking the dislocation due to the tilt into account.

Colocalization of functional color patches with CO blobs in visual area V1

The functional color response maps of the red/green stimulus conditions from 2 animals (shown in Fig. 4A,E) were aligned to the corresponding histological CO signal maps (shown in Fig. 4B,F). It is apparent that the locations of the functional color patches coincide with those of the CO blobs (Fig. 4B,F, see white arrows). The extent of the spatial overlap of functional color response with histological CO signals is presented in Figure 4, C and G, which plots the contours of the color response peaks superimposed onto the histological CO sections. The functional signals show a significant overlap with CO rich zones, as visualized in the color-coded overlays shown in Figure 4, D and H. We quantified this empirically evident colocalization of functional and histological blobs by calculating center-to-center distances between blobs within and across functional and histological maps. Functional color patches had a mean center-to-center spacing of $411.4 \pm 101.2 \mu\text{m}$ ($n = 73$) in case M1, of $405.7 \pm 85.1 \mu\text{m}$ ($n = 103$) in case M3 and of $448.8 \pm 80.1 \mu\text{m}$ ($n = 95$) in case M2. CO blobs had a mean center-to-center spacing of $417.3 \pm 88.3 \mu\text{m}$ ($n = 62$) in case M1 and of $416.5 \pm 87.8 \mu\text{m}$ ($n = 60$) in case M3. The dislocation of color patch and CO blob centers was $83.7 \pm 36.5 \mu\text{m}$ ($n = 135$) in case M1 and $85.5 \pm 30.3 \mu\text{m}$ ($n = 162$) in case M3. Consistent with previous studies on CO blobs and patch colocalization (Landisman and Ts'o, 2002; Lu and Roe, 2008), patches did not show a strict restriction to CO rich areas. However, we found that cases in which functional patches were fully disconnected from CO blob regions or vice versa were rare (see Fig. 4D,H).

Blob pattern formation across chromatic stimulus conditions

2DG studies show an activation of CO blob regions for a wide range of hue stimuli. Hue selective responses with patchy shapes in V1 have been reported in one OI study in macaques reported

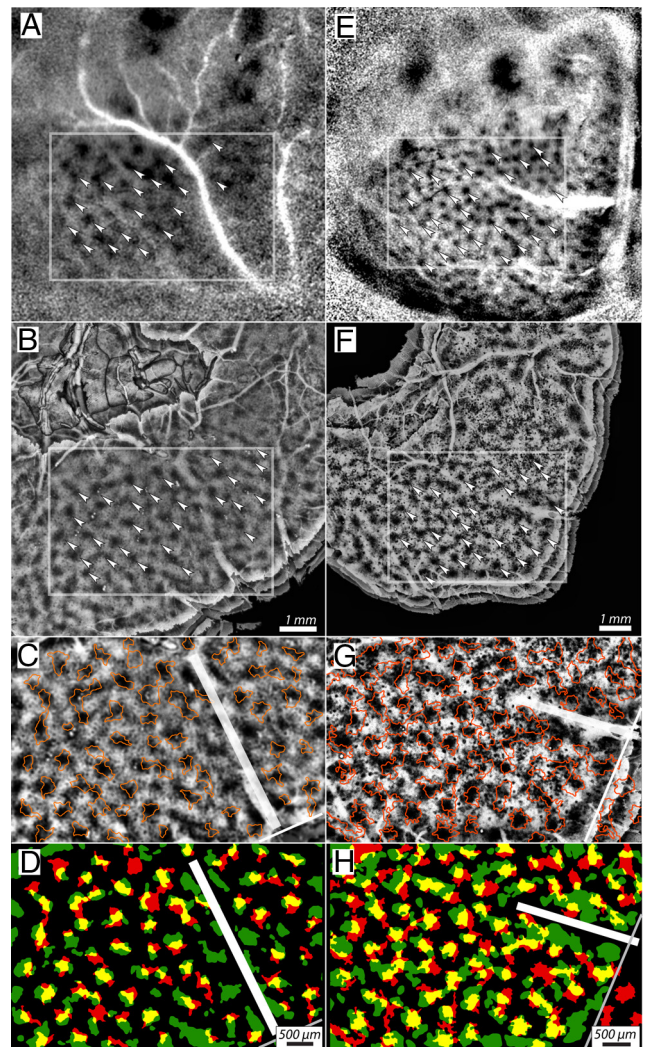


Figure 4. Alignment of functional color domains to CO blobs in 2 marmosets. **A–D** show case M1, **E–H** show case M3. **A, E**, Intrinsic functional signal response to a red/green flicker, revealing color patches that are marked by arrows. **B, F**, Histological sections that were aligned to the functional maps of **A** and **E**, respectively, showing CO signal of the lower layer 2/3. The arrows from **A** and **E** are superimposed on the maps in **B** and **F**, revealing a colocalization of functional patches with CO blobs. **C–H**, Magnification of the ROIs in **A–F**. **C** and **G** show the contour lines of the functional color domains (thin red lines) superimposed on the CO signal. Vessel positions are marked by the white thick lines. Section borders are indicated by thin white lines. **D** and **H** show the overlap (yellow) of functional domains (red) and CO-rich zones (green). The thick and thin white lines indicate vessel positions and section borders, respectively, as shown in **C** and **G**.

by Xiao et al. (2007), but the histological proof for a colocalization with CO blobs was not given in that study. In contrast, color selectivity in V2 has been confirmed by several OI studies (Ts'o et al., 2001; Xiao et al., 2003; see also Tootell et al., 2004; Sincich and Horton, 2005). The 2DG studies suggest that a CO blob selective activation in V1 is predominantly achieved by stimuli consisting of red and blue hues, whereas stimuli consisting of green and yellow hues resulted in a faint labeling of CO blobs. Similar results could not be obtained by differential OI studies (Landisman and Ts'o, 2002) that found that reliable blob activation was achieved only by calculating the difference between red/green grating and achromatic grating stimulus responses.

Below we report the single-condition maps of all color-varying conditions and the luminance-varying condition (Figs. 5, 6) to see whether a non-differential imaging approach (as indicated by the results of Xiao et al., 2007) might allow a more

sensitive imaging of the cortical responses (Vanzetta et al., 2004; Polimeni et al., 2005).

Blob pattern formation in visual area V1
Consistent with Landisman and Ts'o (2002) and Lu and Roe (2008) in macaques we found across all stimulus conditions the most obvious pattern formation with the red/green flicker conditions (shown in Fig. 5 for case M2, and in Fig. 6 for case M3). Flicker conditions in which red was set against isoluminant gray revealed an equally strong pattern formation. In stimulus conditions containing blue hues we found an activation pattern that was spatially overlapping with that obtained in red/green conditions but less prominent (Figs. 5, 6, blue/yellow, blue/gray). In case M2 (Fig. 5) the pattern seen in the blue/yellow map shows a stronger pattern formation compared with the blue/gray flicker condition. The latter one shows only traces of the pattern and is almost unrecognizable to the untrained eye due to blood vessel noise. A more elaborate signal analysis might be able to outline such faint patterns in future studies. In contrast to case M2 we see no patchy pattern in the blue/yellow conditions of case M3 (Fig. 6), but the map shows a similar pronunciation of large superficial blood vessels that dominate the response map as seen in the blue/gray condition of M2. However, the blue/gray flicker stimulus shows an equally faint blob pattern formation in M3 as seen in the blue/gray condition of case M2.

Green/gray and yellow/gray flicker conditions did not reveal any obvious pattern. Neither did black/white flicker conditions, nor single-condition maps of orientation selective responses (Figs. 5, 6; 90°) when calculated in the same way as the color condition maps. With respect to the stimulus specificity for cone activation and the presented pattern formation tendencies we were able to demonstrate that CO blob activation as seen in the single-condition maps demonstrated here was mainly triggered by color-varying stimuli rather than by changes in luminance.

Relative contributions of (L–M), S, and (L+M)-cone contrasts to blob pattern formation in V1

Following the above observations that indicate hue-dependent, but not luminance-dependent patch formation, we were interested to determine the degree to which the formation of color patches could be accounted for by activation of the different L, M, S cone types. We calculated the influence of each hue of the chromatic stimuli on the L-, M-, and S-cones by taking the dot product of the stimulus spectra and the estimated cone spectral sensitivity specific to marmoset cones (Forte et al., 2006). Table 2 shows the resulting raw L, M, S-cone activation values, for easier readability normalized to a maximum of 1 obtained with the

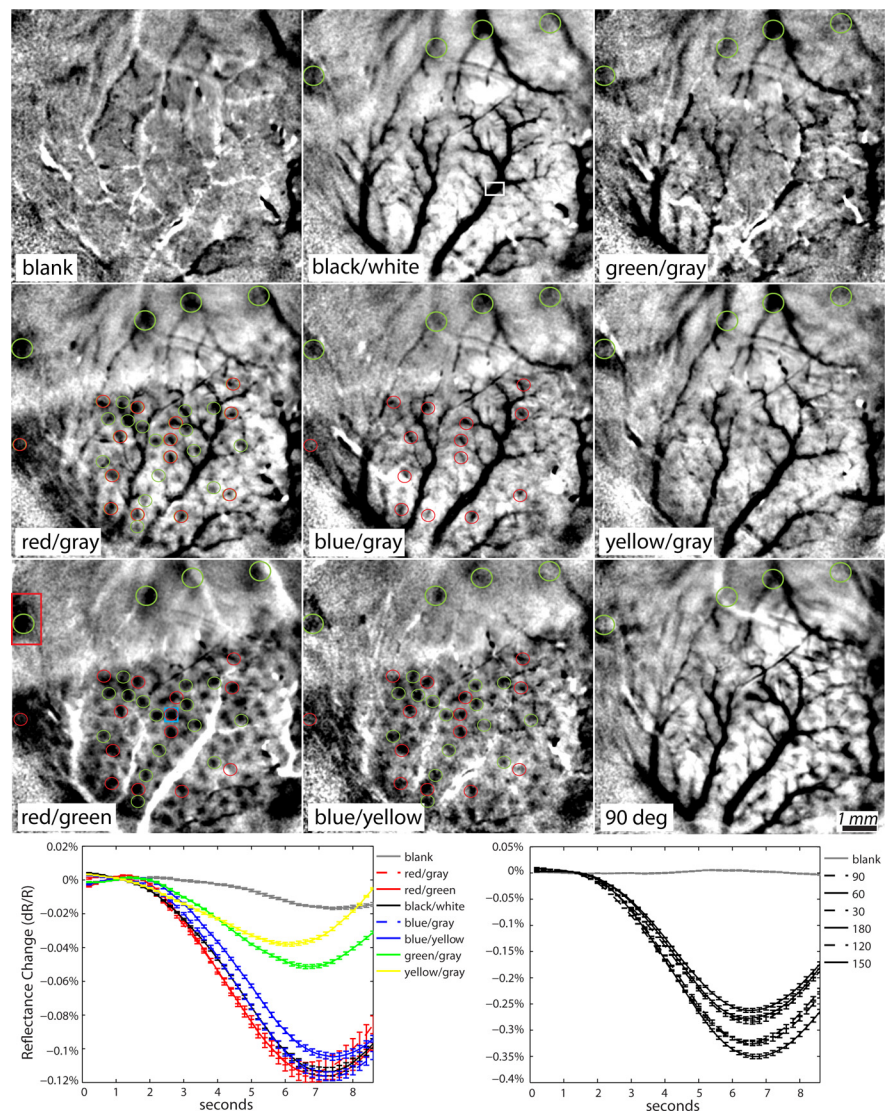


Figure 5. Comparison of intrinsic signal responses of case M2 to color-varying and luminance-varying stimuli. The blank condition shows the control for the non-stimulus condition (gray screen). Red/green, red/gray flicker conditions show clear patchy patterns. A region of interest is marked in red to show subdomains in V2 responses (see Fig. 11). The blue/yellow flicker condition reveals the same pattern but is less prominent. Maps from the blue/gray conditions show only faint pattern formation. Small red and green circles mark exemplary positions of activated color domains. A single-condition map of the intrinsic signal response to a vertical grating (90°) stimulus is presented for comparison. No pattern of orientation domains as seen in differential maps is expressed. The 90° map shows a similar appearance as the black/white flicker condition map. In the latter one, a white rectangle indicates the region of interest for calculating vessel reflectance changes throughout conditions. Large green circles mark the position of color domains in V2 throughout all stimulus conditions. In green/gray, yellow/gray and black/white conditions such positions are dominated by vascular noise. Lower left plot shows the intrinsic signal time courses of a color domain in V1 (blue rectangle in red/green condition) in response to color-varying stimuli, and at the lower right plot the intrinsic signal time courses from the same region of interest in response to achromatic grating stimuli (6 orientations) are presented. The time courses are normalized to frame zero. For more details, see Table 3 and Blob pattern formation and signal amplitude.

white stimulus. Neural activity observed in our seven stimulus conditions would be expected to be related to absolute modulations of L, M, S-cone contrasts or to differences thereof, referred to as cone contrast axes, defined as (L–M) (red/green), S (blue), S-(L+M) (blue/yellow), (L+M) (luminance), elicited by the alternation of the two hues contained in each flicker stimulus. Cone contrasts were calculated as cone activation for one stimulus relative to a background stimulus, resulting in fractional changes [i.e., cone contrast = (cone activity stimulus – cone activity background)/cone activity background]. Since we alternated between two hues (or between white and black), we used

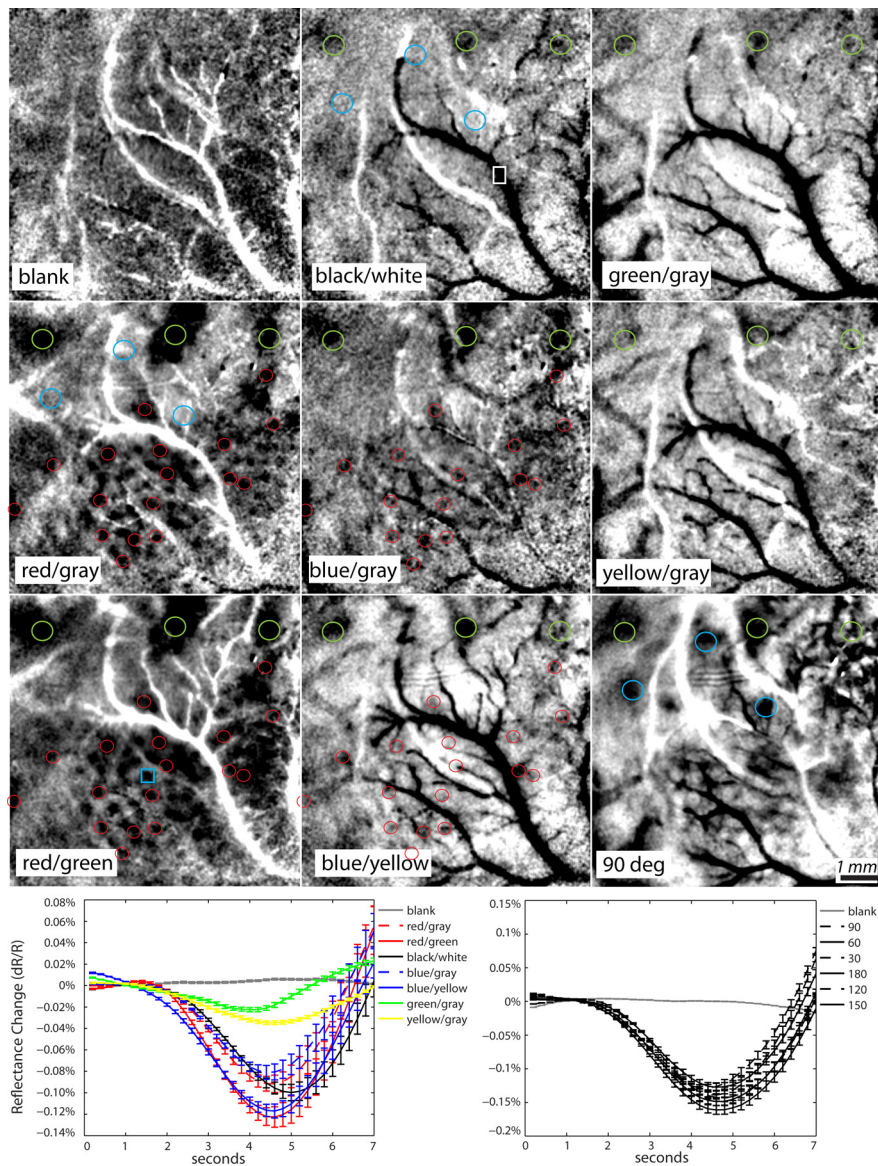


Figure 6. Comparison of intrinsic signal responses of case M3 to color-varying and luminance-varying stimuli. The blank condition shows the control for the non-stimulus condition (gray screen). Red/green, red/gray flicker conditions show clear patchy patterns. Maps from the blue/gray conditions show a faint expression of color domains. The blue/yellow flicker condition revealed no obvious pattern. Small red circles mark exemplary positions of color domains, blue circles in the red/gray condition map mark locations of orientation response patches (see 90°). A single-condition map of the intrinsic signal response to a vertical grating (90°) stimulus is presented. No pattern of orientation domains as seen in differential maps is expressed. Large green circles mark the position of color domains in V2 throughout all stimulus conditions. In green/gray, yellow/gray and black/white conditions such regions show less activation. Blue stars in the 90° condition map shows orientation selective domains in V2 not expressed in chromatic conditions nor in the black/white flicker conditions. In the latter one, a white rectangle indicates the region of interest for calculating vessel reflectance changes throughout conditions. Lower left plot shows the intrinsic signal time courses of a color domain in V1 (see blue rectangle in red/green condition) in response to color-varying stimuli, and at the lower right plot, the intrinsic signal time courses from the same region of interest in response to achromatic grating stimuli (6 orientations) are presented. The time courses are normalized to frame zero. For more details, see Table 3 and Blob pattern formation and signal amplitude.

the mean cone activation between the two flickered hues as background for the calculation. Figure 7A shows cone contrasts for a selection of stimulus pairs used here. Activity along cone contrast axes was calculated as the difference between the relevant cone contrasts. Figure 7B shows the absolutes of cone contrast axes modulations for each stimulus pair.

The red/green flicker stimulus led as expected to maximal (and selective) modulation of the (L–M)-cone contrast axis,

which coincided with the pronounced patch formation tendency seen under the red/green stimulus condition. However, while our red/green stimulus was highly selective for the (L–M)-cone modulation (with near absence of S-cone modulation), we have to acknowledge that the blue/yellow stimulus did not yield the same high specificity for S-cone stimulation, as it also involved modulation along the (L–M)-axis. Thus the fainter patch formation seen in blue/yellow and blue/gray conditions may also be due to a modulation of the (L–M)-axis. However, the green/gray stimulus pair, for which patch-formation was absent, also had near-absent (L–M)-axis modulation, and instead drove almost exclusively the S and S-(L+M) axes. The other stimulus pairs modulated the different color axes to varying degrees. Thus, the multitude of seven flicker stimuli, each with a different involvement of the color-axes (L–M, S, L+M), allowed us to quantify to which extent patch formation was driven by each of the color-axes in context of a general linear model (GLM). For this purpose we measured the difference in IOI signal between patch and interpatch for each of the seven stimuli across both monkeys, and regressed the patch-interpatch difference against the L,M,S-cone contrast modulations evoked by the seven flicker stimuli. The patch-interpatch differences for the seven stimuli were Z-normalized for each animal and then concatenated. The GLM thus modeled 14 data points by estimating β -weights for three regressors. Patch and interpatch activity was extracted as follows. In both animals we defined a mask for blob and interblob areas based on locations of patch and interpatch areas in the blue/yellow condition of case 2 and blue/gray condition of case 3. Note that we avoided red/green-flicker-evoked activity for the definition of blob and interblob masks to avoid data-selection. The masks were defined using the central region of the color domain maps shown in Figures 5 and 6 and were used to extract activity related to all flicker stimulus conditions. The blob-mask consisted of disks of 150 μm diameter centered on 8 (in case 2) and 11 (in case 3) color patches that were identified by eye and that showed no obstructions e.g., by blood vessel noise. Interblob masks consisted of ring shaped areas with a diameter of 650 μm and a ring width of 200 μm that encircled the corresponding patch without overlapping any neighboring patch. Neighboring patches that overlapped with interblob areas were masked with a 250 μm disk to exclude them. Values for blobs and interblobs were averaged separately for each stimulus condition and for each animal. Thus, the subsequent GLM analysis allowed us to estimate the degree to

Table 2. Cone activation: estimated cone activation by the color-varying stimuli and luminance-varying stimuli used

Color varying							Luminance varying	
Cone type	Blue	Yellow	Blue	Gray	Yellow	Gray	Black	White
<i>L563</i>	0.114	0.0662	0.1147	0.0550	0.8689	0.9294	0.0012	1.0000
L556	0.1373	0.0646	0.1381	0.0551	0.8456	0.9280	0.0012	1.0000
M543	0.1909	0.0610	0.1920	0.0554	0.7917	0.9265	0.0013	1.0000
S423	0.9327	0.0073	0.9366	0.0656	0.0467	0.9418	0.0023	1.0000
Color varying								
Cone type	Red	Green	Red	Gray	Green	Gray		
<i>L563</i>	0.2233	0.1930	0.2250	0.2116	0.1866	0.2014		
L556	0.1822	0.1993	0.1836	0.2119	0.1927	0.2016		
M543	0.1146	0.2057	0.1155	0.2130	0.1989	0.2027		
S423	0.0161	0.0144	0.0146	0.2474	0.0135	0.2338		

The cone type L563 was not present in our animals and is plotted for completeness in *italics*.

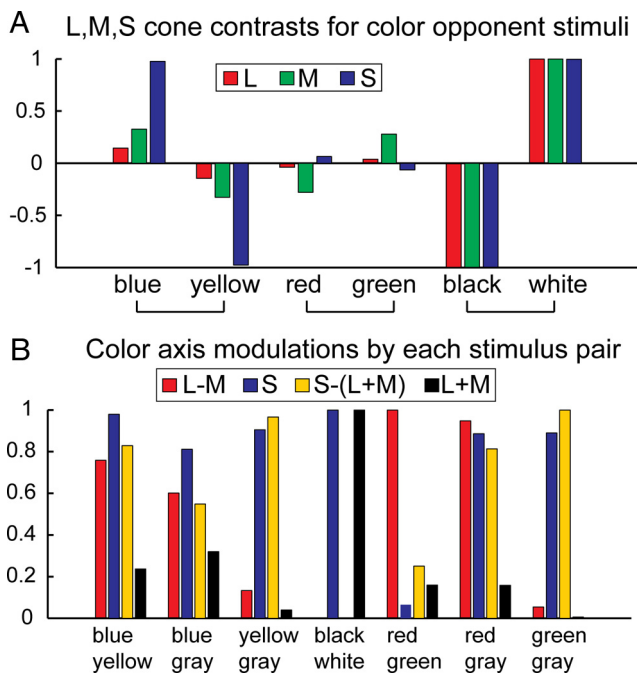


Figure 7. Estimated stimulus-induced L,M,S-cone contrast modulation. **A**, L,M,S-cone contrasts evoked by the different hues used in this study, shown for a selection of stimulus pairs. Cone contrast was calculated relative to the mean cone activity evoked by both stimuli of a given stimulus pair, hence the symmetry for each pair (pairs are indicated by the underlying bracket). Note that results for subsequent analyses did not differ when contrasts were calculated using gray background. **B**, Modulation of cone contrast axes for each stimulus pair. For each stimulus pair the absolute of the difference of cone contrast axis modulation is shown along four cone contrast axes. For easier comparison, each cone contrast axis is normalized to a maximum of 1.

which each (L,M,S)-cone contrast modulation contributed (additively and linearly) to the patch-interpatch difference obtained in the IOI signal across the seven flicker stimuli. The GLM provided a surprisingly good fit, in that its three regressors accounted for 80% of the variance of the patch-interpatch activity difference (F test: $p < 0.0009$; Fig. 8A). The same results show that most of the variance is explained by L- and M-cone contributions with opposite signs, with comparably little contribution of the S-cone contrast (Fig. 8B). We thus ran a mathematically equivalent regression model, using the modulation along the cone contrast axes (L–M, S, L+M) as regressors. This model is equivalent as it uses linear combinations of the regressors of the first model, thus also explaining 80% of the variance. This regression showed that the (L–M)-axis was the only regressor accounting for a significant amount of variance, as only the removal of the (L–M)-

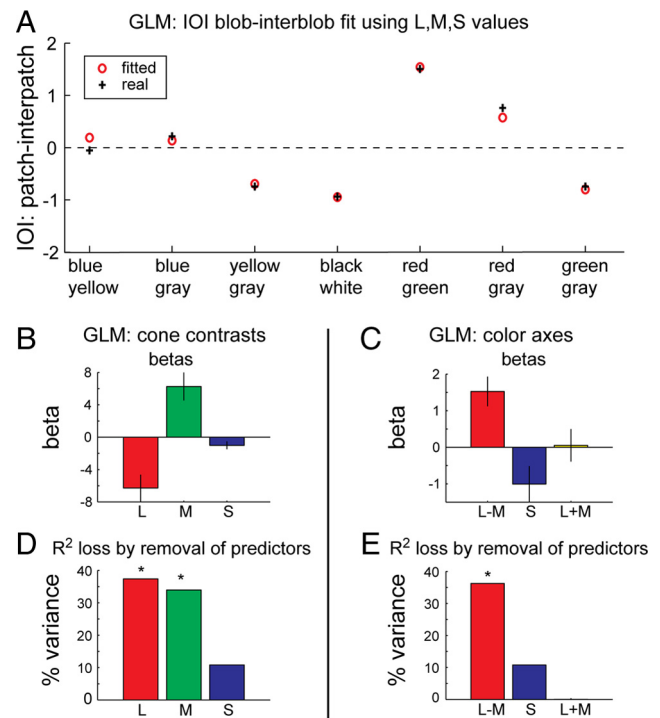


Figure 8. GLM fit between observed patch formation in V1 and calculated L,M,S-cone contrast modulations evoked by the stimulus pairs. **A**, IOI patch-interpatch differences Z-normalized and averaged across monkeys, plotted for each color-stimulus pair (black crosses). Red circles show the fit using a GLM containing as three regressors the L,M,S-cone contrast modulations elicited by each stimulus pair. The fit explains 80% of the IOI variance ($p < 0.0009$). **B**, **C**, β -estimates for a GLM model using L,M,S-cone contrasts as regressors (**B**) and β -estimates of a GLM model using (L–M), S, (L+M) (i.e., cone contrast differences) as regressors (**C**). **D**, **E**, Percentage loss of variance explained by the model (i.e., loss of R^2) when single regressors are removed from the full models. Only L,M or (L–M) account for significant variance. * $p < 0.01$, ** $p < 0.0001$ (F tests).

predictor from the full model lead to a significant loss in the variance explained (F test: $p < 0.0037$, Fig. 8E), with no significant loss of variance when the S-predictor was removed. Equivalently, only removal of either L- or M-predictors in the first model led to significant loss of variance, but not removal of the S-predictor (Fig. 8). [Note that equivalent results were obtained when the S-predictor was replaced by a S-(L+M) predictor; data not shown here.] In sum, this quantitative analysis of L,M,S-cone contrast contributions to patch formation shows that it was the (L–M)-cone contrast modulation that drove the patch formation across the seven flicker stimuli (including the blue/yellow

Table 3. Response amplitudes for all stimulus conditions: intrinsic signal response amplitudes for the different stimulus conditions

	Red/green	Blue/yellow	Red/gray	Green/gray	Blue/gray	Yellow/gray	Black/white	Mean grating
Peak response amplitude ($\Delta R/R$)								
Case M2	−0.116%	−0.104%	−0.114%	−0.051%	−0.116%	−0.038%	−0.113%	−0.303 ± 0.033%
Case M3	−0.061%	−0.058%	−0.045%	−0.011%	−0.040%	−0.017%	−0.049%	−0.140 ± 0.012%
Case M1	−0.178%						−0.115%	−0.291 ± 0.02%
($\Delta R/R$) normalized to mean grating amplitude								
Case M2	0.383	0.343	0.376	0.168	0.383	0.125	0.373	1
Case M3	0.436	0.414	0.321	0.079	0.286	0.121	0.350	1
Case M1	0.612						0.395	1

flicker, that contained considerable (L–M)-modulation), with only little influence of the S and no influence of the (L+M)- (luminance) axis.

Blob pattern formation in visual area V2

As in V1, we found the strongest signal responses in V2 for red/green and blue/yellow flicker stimuli. In red/green and red/gray conditions large elongated patches were revealed. The blue/yellow and blue/gray conditions showed congruent patches of smaller size. Green/gray and yellow/gray conditions also showed congruent activation patches. However these patches resembled those V2 activation patches that were revealed in the black/white flicker conditions. Note that for technical reasons in case M2 (Fig. 5) cortical area V2 was slightly out of focus. Thus, the signals from this area were less intense and the noise of the blood vessels was somewhat more dominant. Nevertheless, the relative signal intensities evoked by the different color stimuli were consistent with the pattern formation in V1, and also consistent with those observed in case M3.

Blob pattern formation and signal amplitude

The intrinsic signal time course of the chromatic stimulus conditions in case M2 (Fig. 5, left plot) and case M3 (Fig. 6, left plot) roughly reflects the pattern formation relations of the single-condition maps. Stimulus conditions containing red or blue hues showed similar strength in response amplitudes (Table 3). Pattern formation seems to correlate with the signal amplitude in these cases (except for the blue/gray condition in case M3 which shows a more obvious pattern but smaller signal amplitude than the corresponding blue/yellow condition). Peak response amplitudes of green/gray and yellow/gray conditions were less than half the size of the amplitudes of stimulus conditions containing red or blue hues. Summing the red/gray, green/gray, blue/gray and yellow/gray responses we end up with a value (case M2 = 0.319%, case M3 = 0.113%) close to the one measured for the mean amplitude of the orientation selectivity response (Table 3). In all cases, the largest chromatic response amplitude observed is in between 38 and 61% of the size of the corresponding grating response amplitude.

Vascular noise and signal

Figures 5 and 6 show—apart from functional patch formation—also large superficial blood vessels, mostly veins. Berwick et al. (2005) show that large HbO₂ responses can be found at the large surface draining veins. We therefore applied our GLM analysis to vein-ROIs (Figs. 5, 6) to examine the strength of stimulus-related functional signal components that may derive from accumulating capillary blood. The results were qualitatively similar to those observed for the patch-interpatch difference, yet weaker. The full GLM accounted for 62% of total signal variance (F test: $p = 0.02$), and the regressors coding for L- and M-cone contrasts (as well as the L–M regressor in the cone contrast axis model) achieved

significances of $p < 0.05$ each. The results suggest that draining veins can carry functional signals related to patches, which in turn may be related to fMRI voxel-pattern formation (Seymour et al., 2009; Shmuel et al., 2010). On the other hand, these results are to be considered very preliminary, as more detailed analyses (e.g., of time courses), as well as new experiments such as 2D spectroscopy at high frame-rates would be required for a comprehensive understanding of the reasons underlying the observed effect, including the exclusion of potential vasomotion artifacts (Mayhew et al., 1996; Berwick et al., 2005). While this is beyond the scope of the present study, this may be worthwhile, in particular in view of the implications for the interpretation of fMRI data.

Ocular dominance and color patches

Ocular dominance and CO blobs are highly correlated in macaque monkeys. CO blobs tend to line up with centers of ocular dominance columns (ODCs) and each CO blob is dominated by one eye or the other (for review, see Adams and Horton, 2009). Landisman and Ts'o (2002) and Lu and Roe (2008) confirmed this relation of ocular dominance and color patches in macaque monkeys using OI. In contrast New World monkeys neither show a strict relationship between CO blobs and ODCs, nor do they necessarily reveal ODCs (Spatz, 1989; Adams and Horton, 2009). Roe et al. (2005b) showed that weak ODCs can be imaged in some marmosets. We looked for differences in color domain maps obtained in two animals by binocular and monocular stimulus presentation. In both cases (M1 and M2) pattern formation due to red/green stimuli could be observed in the monocular conditions, but no differences in the location or spacing of the functional domains obtained using binocular or monocular stimulation were found. In Figure 9, *A* and *B*, the marked domains (small red and green stars) of the monocular signal map showed the same nearest neighbor domains as the corresponding domain of the binocular signal map. Thus, it is very unlikely that only a subset of domains was selectively activated in these animals, in contrast to what was shown by Lu and Roe (2008; see their Fig. 7) for the macaque monkey where the monocularly activated blobs form rows within the ODCs of the stimulated eye.

In case M1, the signal amplitude of the chromatic stimulus conditions showed an equally strong signal amplitude for both—monocular and binocular—chromatic and achromatic flicker conditions (Table 4). Only the peak amplitudes of the achromatic grating conditions differed significantly. In case M2, the peak amplitudes of red/green, blue/yellow, blue/gray, red/gray, black/white flicker conditions differed by <0.023%. In the red/green, blue/yellow, black/white and blue/gray conditions the signal amplitude of the monocular conditions even exceeded the one from the corresponding binocular conditions. Significant differences in signal amplitude were apparent in the green/gray and yellow/

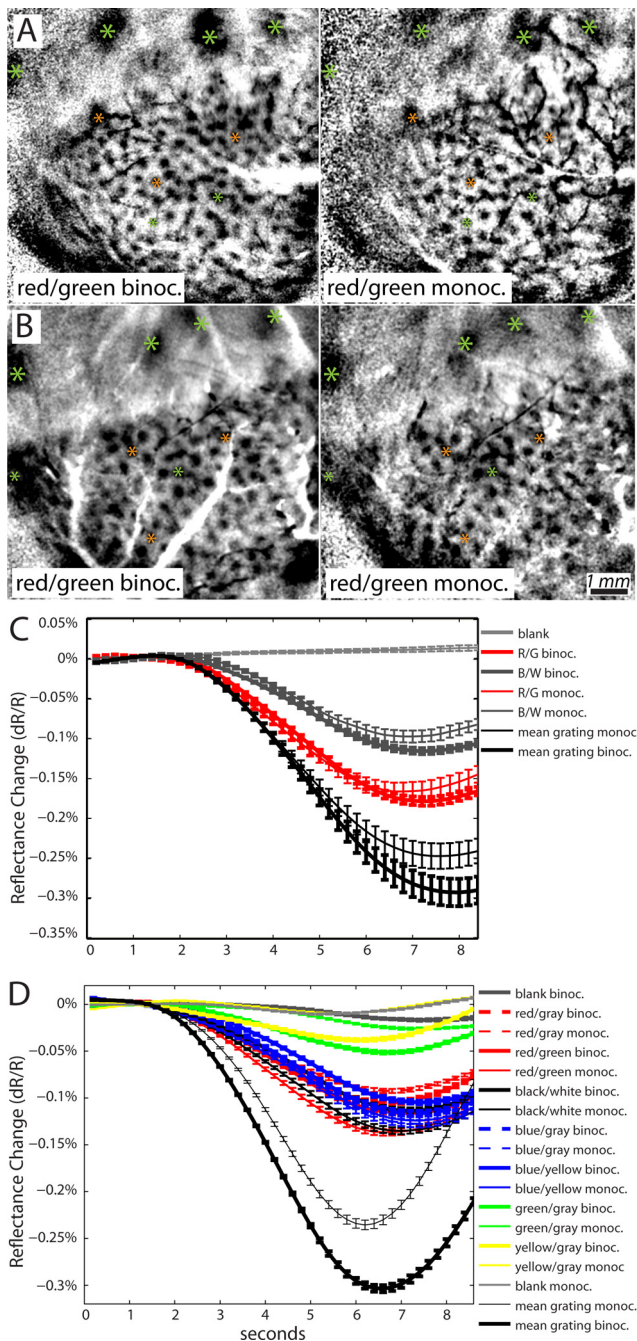


Figure 9. Color domains in single-condition maps of monocular and binocular stimulation. **A, B**, The pattern in the monocular condition maps (**A**, case M1; **B**, case M2) shows the same response peak distribution as that seen in the binocular condition, thus indicating that blobs in marmosets are not subject to ocular dominance. **C, D**, Binocular versus monocular color responses. **C** shows time courses of the intrinsic signal response in case M1 to binocularly and monocularly viewed achromatic gratings (black), red/green flicker (red), and black/white flicker (dark gray) (data normalized to frame zero). **D**, Time courses of the intrinsic signal response in case M2 to binocular and monocular stimulation with the full set of chromatic stimuli and achromatic gratings. For details see also Table 4.

gray conditions and the achromatic grating stimulus conditions (see mean grating response in Fig. 9C,D; Table 4).

Color responses in V2

V1 and V2 are clearly demarcated in the intrinsic signal maps of the chromatic stimulus conditions (Fig. 10A,F) by the abrupt change in spatial frequency of the functional pattern. The corre-

sponding CO stain (Fig. 10C,H) shows an even more abrupt border between V1 and V2. The small color patches of V1 tend to cross the CO border at regular intervals to extend to some amount into V2 (see arrows Fig. 10A,F). These extensions line up with large signal patches that are spaced at intervals of 2–2.5 mm, 1–2 mm away from the border V1/V2. The alignment with the CO staining pattern (Fig. 10E,J) shows a colocalization of the patches with the thin stripes that run roughly orthogonal to the border V1/V2 (Horton, 1984). However there is no obvious relation between CO dark regions and color patches. The contours of the patches indicate a further segmentation of the large patches into smaller functional subdomains (Fig. 10G).

Spatial organization of hues in V2

Unlike color representation in V2 of the macaque monkey, the spatial organization of the color patch subdomains of V2 in the marmoset did not reveal the regular representation of the DIN (Deutsches Institut für Normierung e.V.) color system (Xiao et al., 2003). Instead we find that centers of different color patch subdomains and the patches of black/white conditions clustered within small cortical regions (Fig. 11). We observed that patches evoked by color-varying stimuli consisting of color opponent hue pairs revealed a stronger segregation into subdomains compared with those evoked by color-varying stimuli consisting of a single hue set against gray [see red/gray versus red/green, blue/gray versus blue/yellow, Fig. 11 (y)]. This suggests that color opponent stimulation was advantageous to increase pattern formation in functional maps. However, contours of all color-varying stimulus responses appeared to be congruent. This could indicate that the same subdomains were activated, but we cannot rule out that the lack of spatial organization of hues in our maps is due to differences in signal strength among chromatic conditions.

Discussion

Summary

In the visual cortex of three female trichromatic marmosets, we found domains of cortical response to isoluminant color stimuli. Red/green flicker of low temporal frequency (1.5 Hz) resulted in the strongest signal pattern formation. Blue/gray flicker led to less prominent patterns. Blue/gray and red/gray flicker showed equal pattern formation as blue/yellow and red/green flicker. Patch formation was predominantly driven by the (L–M)-cone contrast color axis of the stimuli, with a marginal contribution of the S-cone contrast axis. Importantly, we found color domains in V1 to be congruent with areas of increased CO reactivity. The functional patterns are consistent in monocular and binocular conditions, suggesting that blobs in marmosets are not subject to ocular dominance. In V2, color domains showed colocalization with thin stripes. Thus, our results are highly consistent with previous studies that show color domains in the visual cortex of macaques (Tootell et al., 1988, 2004; Tootell and Hamilton, 1989; Landisman and Ts'o, 2002; Lu and Roe, 2008).

CO pattern and color patches

We found similar center-to-center distances among CO blobs (416–417 μm) and among color patches (404–448 μm), and a tight colocalization between CO blobs and color patches, demonstrating a significant colocalization of the functional and anatomical columns. However, we found a small dislocation error between CO blob and color patch centers ($\sim 83\text{--}85 \mu\text{m}$), which is around half the size of the error (200 μm) found by Landisman and Ts'o (2002) in macaques. We believe that the smaller error is mainly due to our elaborate alignment approach. We also find

Table 4. Response amplitudes for monocular versus binocular stimulus conditions: intrinsic signal response amplitudes for monocular versus binocular stimulus conditions

	Red/green	Blue/yellow	Red/gray	Green/gray	Blue/gray	Yellow/gray	Black/white	Mean grating
Case M2								
Monocular	−0.136%	−0.124%	−0.092%	−0.026%	−0.127%	−0.010%	−0.135%	−0.235 ± 0.0045%
Binocular	−0.116%	−0.105%	−0.105%	−0.051%	−0.116%	−0.038%	−0.113%	−0.303 ± 0.0033%
Case M1								
Monocular	−0.166%						−0.097%	−0.247 ± 0.015%
Binocular	−0.178%						−0.116%	−0.292 ± 0.017%

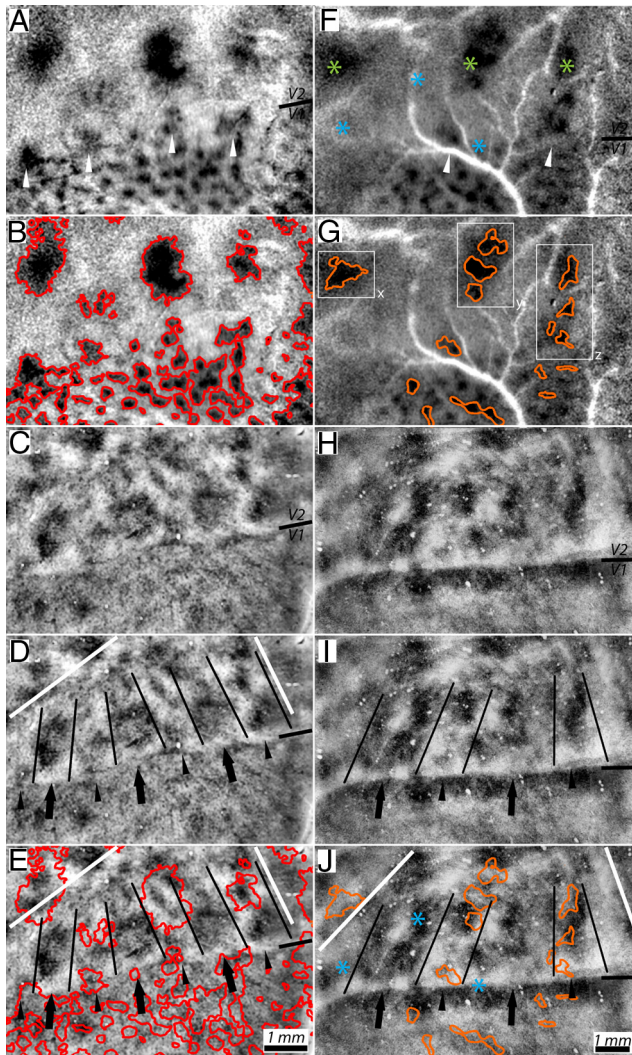
Peak response amplitude ($\Delta R/R$).

Figure 10. Color response in V2. **A–J**, Alignment of red/green color patches and CO reactivity pattern of case M1 (**A–E**) and of case M3 (**F–J**). **A** and **F** show the red/green flicker response map. White arrows mark regions where the domain pattern of V1 extends into V2. Blue stars mark positions of patches from the achromatic grating condition of Figure 6 (90°). **B**, **G**, Contours of the color response. Three regions of interest (x, y, z) are marked in **G** which correspond to contour maps in Figure 11. **C–E** and **H–J** show the CO reactivity pattern of V2. In **D** and **I**, thick and thin stripes are indicated by thick and thin arrows respectively. **E**, **J**, Contours of color patches from **B** and **G** superimposed onto V2. Patch contours indicated a colocalization of color responses and thin stripes. Blue stars show that patches exclusively found in achromatic grating conditions do not fall into thin stripe regions.

smaller distances of CO blobs as reported for macaques (350–550 μm) and humans (0.75–1 mm) (Horton and Hubel, 1981; Horton and Hedley-Whyte, 1984). With respect to the smaller brain size of marmosets and variability of the functional anatomy of the visual areas in primates (Adams and Horton, 2009) these differ-

ences appear consistent and are further corroborated by the similar size of the center-to-center distance of color patches and the blob density in marmosets of 3.9–5.5 blobs/ mm^2 reported by Solomon (2002). Likewise, consistent with previous studies (Tootell and Hamilton, 1989; Tootell et al., 2004; Lu and Roe, 2008), color patches in V2 of marmosets do not show any obvious correlation to regions of high CO density but appear as irregular bands or elongated patches that are oriented perpendicular to the border V1/V2. We find that these color patches are made up of smaller subdomains that vary in size and distribution among the different chromatic conditions. Unlike Xiao et al. (2007), we do not find a spatially organized representation of hues. Subdomains of different chromatic conditions show largely overlapping shapes suggesting a common structural origin. However, the sizes of the individual subdomains correlate with the strength of the intrinsic response. Thus, it is possible that the lack of spatial organization seen in our maps is due to differences in signal strength among chromatic conditions. The use of imaging protocols that are able to equalize the stimulus response strength for several hue stimuli, e.g., differential imaging, might allow carving out a spatial organization that could not be shown here.

Imaging color domains

In all cases the strongest pattern formation was obtained with red/green flicker. In one case we also found clear response patterns to blue/yellow flicker. A second case showed faint pattern formation due to blue/yellow flicker. In that case we observed a general reduction in signal strength throughout the experiment. We can only assume that the anesthesia affected the intrinsic response in this case such that the cortical response to the blue/yellow flicker was weakened. In 2DG studies in macaques by Tootell et al. (1988) a similar preference for red/green and blue/yellow stimuli can be seen. However, they also show a faint blob pattern formation due to green/gray and yellow/gray stimuli. So far only one OI study (Xiao et al., 2007) known to us reported color selective responses in V1 due to green and yellow hue stimuli. Others failed to show reliable activation of blobs by stimuli other than red/green gratings (Landisman and Ts'o, 2002). This is surprising in light of anatomical studies (Sincich and Horton, 2005) showing that KC inputs target specifically blobs of the upper layers 2/3, suggesting that S-cone-selective stimuli should allow demarcation of blobs more effectively than (L–M)-cone-specific stimuli that activate the PC-pathway, which provides direct inputs to layer 4C β without restriction to blobs.

Dichromats versus trichromats

Buzás et al. (2008) specifically addressed the question whether S-cone inputs are segregated within V1 of dichromatic marmosets by using an OI approach. Single-condition maps of the intrinsic response to red/green and blue/yellow gratings did not reveal any pattern. They concluded that S-cone inputs are distrib-

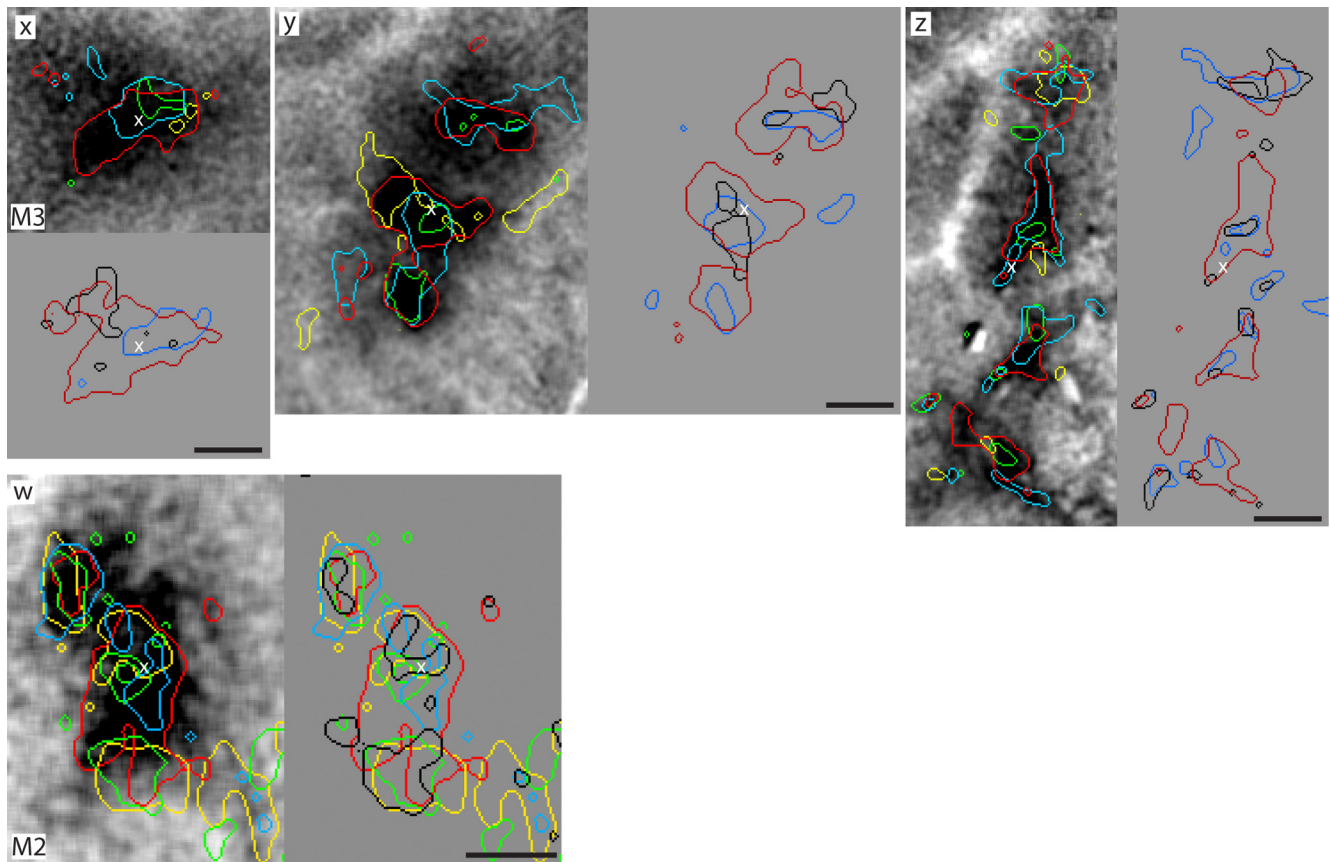


Figure 11. Spatial organization of color patches in V2. Contours of different color-varying stimuli from cases M2 and M3 are shown superimposed onto the patches in ROIs (x, y, z) from Figure 10*G* for case M3, and Figure 5 (red/green) for case M2. Color code: bright red = red/gray, green = green/gray, yellow = yellow/gray, bright blue = blue/gray. Next to the ROIs x, y , and z , the contours of color-varying and of the luminance-varying stimulus responses are shown. Color code: dark blue = blue/yellow, dark red = red/green, black = black/white. Scale bars 500 μm . For case M2 (w), color-varying stimulus responses are plotted together with luminance-varying stimulus responses (black contours).

uted homogeneously in marmosets, but acknowledged: “. . . we cannot rule out the possibility that there does exist a small subset of V1 cells with strong S-cone input. . . which we simply did not encounter” (p. 6).

All monkeys used in our study were shown to be genotypically trichromats. Although we did not confirm the phenotype by physiological recordings as done by Buzás et al. (2008), we found the typical pattern of color responses that is observed in macaques with red/green grating stimuli. The finding of color domains in our trichromats and their absence, in the work of Buzás et al. (2008), in dichromats suggests a dependence of trichromatism and functional blob activation. Our analysis of the patch-interpatch activity difference revealed that the only stimulus-dimension that accounted for a significant amount of variance was the (L–M)-cone contrast axis, with a much reduced contribution of the S axis and no contribution of the (L+M)-axis (Fig. 8). This therefore confirms prior results in macaques, where patch formation is specific to (L–M)-stimuli.

It is important to note that a variety of different stimulus protocols has been used throughout all corresponding OI studies. It is known that even isoluminant color contrast stimuli can activate color-blind orientation or motion selective M cells (Logothetis, 1991). In differential imaging approaches the response to an achromatic grating is subtracted from that to a red/green grating to isolate the faint color-specific response from orientation selective responses. This protocol proved to reliably reveal color patches in macaques (Landis-

man and Ts’o, 2002; Lu and Roe, 2008). No study so far reported color patch patterns due to solitary red/green grating presentation. In preliminary experiments (data not shown here) we experienced that in some cases the intrinsic response to color opponent red/green gratings revealed faint patterns. When compared with response patterns from equally oriented achromatic gratings it emerged that these patterns were induced by the orientation of the chromatic grating. Thus, also differential maps calculated from those two conditions were dominated by the orientation response pattern. Neither the differential maps nor the single-condition maps yielded any indication for color domains. Thus, a single-condition color grating approach as used by Buzás et al. (2008) or differential imaging as used in macaque studies might not be the appropriate stimulus protocols to reveal color domains in marmosets.

Solomon (2002) shows that the distribution of KC inputs within V1 does not differ in dichromatic and trichromatic marmosets thus supporting evidence from the macaque (Fitzpatrick et al., 1983; Horton, 1984; Hendry and Yoshioka, 1994) and owl monkey (Horton, 1984; Xu et al., 2004) that S-cone-selective inputs target specifically blobs (Solomon, 2002). Hence, it is not implausible that a blue/yellow flicker might reveal specific blob activation in trichromatic and also dichromatic marmosets. However, a specific blob activation by red/green flicker seems unlikely due to the lack of color opponent PC cells in dichromatic marmosets (Yeh et al., 1995). Interestingly, the peak response amplitudes of the ach-

romatic and chromatic stimuli published by Buzás et al. (2008) show remarkably small differences (see their Table 1). In contrast, our results show that the response amplitudes of the achromatic gratings are around twice as high as the chromatic response amplitudes (Table 3). Buzás et al. (2008) report amplitude sizes of red/green gratings that differ by less than one third from the peak amplitudes of the achromatic gratings or even exceeds them. This suggests that a strong response to the orientation of the chromatic grating stimulus was induced that contributed to the color response and thus obliterated the faint color domains. Buzás et al. (2008) themselves state: “. . . we cannot rule out the possibility that the suppressive effect of large-field grating stimuli. . . has masked a weak but specific input from S-cone-carrying afferents to blob regions. . .” (p. 12). To dispel doubts we suggest that further OI studies on the color system of dichromatic marmosets should employ color opponent flicker stimuli. Such stimuli have proved to be a valuable tool for a specific blob activation in V1 of macaques (Tootell et al., 1988) and of marmosets (present study). In addition this approach allows to image color patches by a non-differential imaging approach, thus meeting the criteria for high resolution OI (Vanzetta et al., 2004). Finally, we conclude that the blob activation seen in our maps is primarily triggered by a modulation of the (L–M)-cone axis, thus supporting the notion that blobs in New World as well as Old World trichromatic primates are domains of color processing.

References

- Adams DL, Horton JC (2009) Ocular dominance columns: enigmas and challenges. *Neuroscientist* 15:62–77.
- Benirschke K, Anderson JM, Brownhill LE (1962) Marrow chimerism in marmosets. *Science* 138:513–515.
- Berwick J, Johnston D, Jones M, Martindale J, Redgrave P, McLoughlin N, Schiessl I, Mayhew JEW (2005) Neurovascular coupling investigated with two-dimensional optical imaging spectroscopy in rat whisker barrel cortex. *Eur J Neurosci* 22:1655–1666.
- Blessing EM, Solomon SG, Hashemi-Nezhad M, Morris BJ, Martin PR (2004) Chromatic and spatial properties of parvocellular cells in the lateral geniculate nucleus of the marmoset (*Callithrix jacchus*). *J Physiol* 557:229–245.
- Buzás P, Szmajda BA, Hashemi-Nezhad M, Dreher B, Martin PR (2008) Color signals in the primary visual cortex of marmosets. *J Vis* 8:7.1–7.16.
- Casagrande VA (1994) A third parallel visual pathway to primate area V1. *Trends Neurosci* 17:305–310.
- Conway BR (2009) Color vision, cones, and color-coding in the cortex. *Neuroscientist* 15:274–290.
- Ding Y, Casagrande VA (1997) The distribution and morphology of LGN K pathway axons within the layers and CO blobs of owl monkey V1. *Vis Neurosci* 14:691–704.
- Ding Y, Casagrande VA (1998) Synaptic and neurochemical characterization of parallel pathways to the cytochrome oxidase blobs of primate visual cortex. *J Comp Neurol* 391:429–443.
- Fitzpatrick D, Itoh K, Diamond IT (1983) The laminar organization of the lateral geniculate body and the striate cortex in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J Neurosci* 3:673–702.
- Forte JD, Blessing EM, Buzás P, Martin PR (2006) Contribution of chromatic aberrations to color signals in the primate visual system. *J Vis* 6:97–105.
- Hendry SH, Yoshioka T (1994) A neurochemically distinct third channel in the macaque dorsal lateral geniculate nucleus. *Science* 264:575–577.
- Horton JC (1984) Cytochrome oxidase patches: a new cytoarchitectonic feature of monkey visual cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 304:199–253.
- Horton JC, Hedley-Whyte ET (1984) Mapping of cytochrome oxidase patches and ocular dominance columns in human visual cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 304:255–272.
- Horton JC, Hubel DH (1981) Regular patchy distribution of cytochrome oxidase staining in primary visual cortex of macaque monkey. *Nature* 292:762–764.
- Hunt DM, Williams AJ, Bowmaker JK, Mollon JD (1993) Structure and evolution of the polymorphic photopigment gene of the marmoset. *Vision Res* 33:147–154.
- Jacobs GH, Neitz J, Neitz M (1993) Genetic basis of polymorphism in the color vision of platyrrhine monkeys. *Vision Res* 33:269–274.
- Kawamura S, Hirai M, Takenaka O, Radlwimmer FB, Yokoyama S (2001) Genomic and spectral analyses of long to middle wavelength-sensitive visual pigments of common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Gene* 269:45–51.
- Landisman CE, Ts'o DY (2002) Color processing in macaque striate cortex: relationships to ocular dominance, cytochrome oxidase, and orientation. *J Neurophysiol* 87:3126–3137.
- Lim H, Wang Y, Xiao Y, Hu M, Felleman DJ (2009) Organization of hue selectivity in macaque V2 thin stripes. *J Neurophysiol* 102:2603–2615.
- Livingstone MS, Hubel DH (1984) Anatomy and physiology of a color system in the primate visual cortex. *J Neurosci* 4:309–356.
- Logothetis NK (1991) Is movement perception color blind? *Curr Biol* 1:298–300.
- Lu HD, Roe AW (2007) Optical imaging of contrast response in macaque monkey V1 and V2. *Cereb Cortex* 17:2675–2695.
- Lu HD, Roe AW (2008) Functional organization of color domains in V1 and V2 of macaque monkey revealed by optical imaging. *Cereb Cortex* 18:516–533.
- Martin PR (2004) Colour through the thalamus. *Clin Exp Optom* 87:249–257.
- Mayhew JEW, Askew S, Zheng Y, Porrill J, Westby GWM, Redgrave P, Rector DM, Harper RM (1996) Cerebral vasomotion: a 0.1-Hz oscillation in reflected light imaging of neural activity. *Neuroimage* 4:183–193.
- Michael CR (1981) Columnar organization of color cells in monkey's striate cortex. *J Neurophysiol* 46:587–604.
- Polimeni JR, Granquist-Fraser D, Wood RJ, Schwartz EL (2005) Physical limits to spatial resolution of optical recording: clarifying the spatial structure of cortical hypercolumns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4158–4163.
- Roe AW, Ts'o DY (1999) Specificity of color connectivity between primate V1 and V2. *J Neurophysiol* 82:2719–2730.
- Roe AW, Lu HD, Hung CP (2005a) Cortical processing of a brightness illusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3869–3874.
- Roe AW, Fritsches K, Pettigrew JD (2005b) Optical imaging of functional organization of V1 and V2 in marmoset visual cortex. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 287:1213–1225.
- Schaeffel F, Hagel G, Eikermann J, Collett T (1994) Lower-field myopia and astigmatism in amphibians and chickens. *J Opt Soc Am A* 11:487–495.
- Seymour K, Clifford CWG, Logothetis NK, Bartels A (2009) The coding of color, motion, and their conjunction in the human visual cortex. *Curr Biol* 19:177–183.
- Sheinberg DL, Logothetis NK (2001) Noticing familiar objects in real world scenes: the role of temporal cortical neurons in natural vision. *J Neurosci* 21:1340–1350.
- Shmuel A, Chaimow D, Raddatz G, Ugurbil K, Yacoub E (2010) Mechanisms underlying decoding at 7 T: ocular dominance columns, broad structures, and macroscopic blood vessels in V1 convey information on the stimulated eye. *Neuroimage* 49:1957–1964.
- Signer E, Anzenberger G, Jeffreys A (2000) Chimaeric and constitutive DNA fingerprints in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Primates* 41:49–61.
- Sincich LC, Horton JC (2005) The circuitry of V1 and V2: integration of color, form, and motion. *Annu Rev Neurosci* 28:303–326.
- Solomon SG (2002) Striate cortex in dichromatic and trichromatic marmosets: neurochemical compartmentalization and geniculate input. *J Comp Neurol* 450:366–381.
- Spatz WB (1989) Loss of ocular dominance columns with maturity in the monkey, *Callithrix jacchus*. *Brain Res* 488:376–380.
- Tootell RB, Hamilton SL (1989) Functional anatomy of the second visual area (V2) in the macaque. *J Neurosci* 9:2620–2644.
- Tootell RB, Silverman MS, Hamilton SL, De Valois RL, Switkes E (1988) Functional anatomy of macaque striate cortex. III. Color. *J Neurosci* 8:1569–1593.
- Tootell RB, Nelissen K, Vanduffel W, Orban GA (2004) Search for color ‘center(s)’ in macaque visual cortex. *Cereb Cortex* 14:353–363.

- Troilo D, Quinn N, Baker K (2007) Accommodation and induced myopia in marmosets. *Vision Res* 47:1228–1244.
- Ts'o DY, Roe AW, Gilbert CD (2001) A hierarchy of the functional organization for color, form and disparity in primate visual area V2. *Vision Res* 41:1333–1349.
- Valverde Salzmann MF, Wallace DJ, Logothetis NK, Schüz A (2011) Multimodal vessel mapping for precise large area alignment of functional optical imaging data to neuroanatomical preparations in marmosets. *J Neurosci Methods* 201:159–172.
- Vanzetta I, Sloviter H, Omer DB, Grinvald A (2004) Columnar resolution of blood volume and oximetry functional maps in the behaving monkey: implications for fMRI. *Neuron* 42:843–854.
- Williams AJ, Hunt DM, Bowmaker JK, Mollon JD (1992) The polymorphic photopigments of the marmoset: spectral tuning and genetic basis. *EMBO J* 11:2039–2045.
- Wong-Riley M (1979) Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res* 171:11–28.
- Xiao Y, Wang Y, Felleman DJ (2003) A spatially organized representation of colour in macaque cortical area V2. *Nature* 421:535–539.
- Xiao Y, Casti A, Xiao J, Kaplan E (2007) Hue maps in primate striate cortex. *Neuroimage* 35:771–786.
- Xu X, Bosking W, Sáry G, Stefansic J, Shima D, Casagrande V (2004) Functional organization of visual cortex in the owl monkey. *J Neurosci* 24:6237–6247.
- Yeh T, Lee BB, Kremers J, Cowing JA, Hunt DM, Martin PR, Troy JB (1995) Visual responses in the lateral geniculate nucleus of dichromatic and trichromatic marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Neurosci* 15:7892–7904.
- Yoshioka T, Dow BM (1996) Color, orientation and cytochrome oxidase reactivity in areas V1, V2 and V4 of macaque monkey visual cortex. *Behav Brain Res* 76:71–88.

4.3 The Topology of Hemodynamic Responses to Orientation Stimuli in Orientation-Preference Pinwheels. An Optical Imaging Study in the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*).

The Topology of Hemodynamic Responses to Orientation Stimuli in Orientation-Preference Pinwheels. An Optical Imaging Study in the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*).

Matthias F. Valverde Salzmann ^{a,*}, Nikos K. Logothetis ^{a,b}

^a Max Planck Institute for Biological Cybernetics, Spemannstrasse 38, 72076 Tübingen, Germany

^b Division of Imaging Science and Biomedical Engineering, University of Manchester, Manchester, United Kingdom

*Corresponding author: Department of Physiology of Cognitive Processes. Max Planck Institute for Biological Cybernetics, Spemannstrasse 38, 72076 Tübingen, Germany.

Phone: +49-7071-6011703; fax: +49-7071-601652

E-mail address: matthias.valverde@tuebingen.mpg.de (Matthias F. Valverde Salzmann).

Keywords: *marmoset, neurovascular coupling, optical imaging, orientation selectivity, pinwheel, functional organization*

Abstract

Optical imaging has played a key role in the investigation of the functional organization of the primate visual cortex. Topographic maps of orientation selective response regions reveal a strikingly regular organization of functional columns in V1. In these maps singularities - centres of so-called pinwheels - are found which have been considered in the past to be regions of low orientation selectivity. Little is known about the functional role of these entities. In macaque monkeys the spatial relationship between pinwheels and other cortical features such as orientation preference has been investigated intensely. There, pinwheel centres were shown to correlate with ocular dominance columns. However, no study so far investigated the organization of pinwheel centres with respect to the arrangement of orientation columns revealed in differential maps of orthogonal orientation responses. Here, we used the common marmoset to compare the positions of pinwheel centres with contours of orientation columns and we find a clear coincidence of both entities. We further show that pinwheel centres define points where contours of different orientation columns intersect. We discuss the results in the context of a potential link between pinwheel localization and vascularization that may lead to spatial biases in neurovascular coupling.

1. Introduction

Intrinsic optical imaging has led to a better understanding of the functional organization of the primary visual cortex of primates and of other species such as cats and ferrets (Bonhoeffer and Grinvald, 1991; Chenchal Rao et al., 1997; Ts'o et al., 1990). By calculating the vector average of several optical imaging

signal maps of responses to different orientation stimuli (usually 4 to 8) a topographical map of orientation preference or orientation selective regions (usually coded by colours) is gained which reveals a strikingly regular arrangement of these functional modules along the horizontal plane of the visual cortex (Bonhoeffer and Grinvald, 1993; Bonhoeffer and Grinvald, 1996). Orientation preference regions that emerge in the vector maps were also termed iso-orientation domains and have been described as elongated bands, slabs or zones containing cells that respond best to a given stimulus orientation (Bartfeld and Grinvald, 1992; Blasdel, 1992b; Blasdel and Salama, 1986; Bonhoeffer and Grinvald, 1991; Obermayer and Blasdel, 1993; Obermayer and Blasdel, 1997).

These vector maps of orientation preference also reveal peculiarities in the arrangement of the functional modules known as pinwheels (Bonhoeffer and Grinvald, 1991; Swindale et al., 1987). In the current literature pinwheels are commonly defined as zero-dimensional points around which iso-orientation domains are radially arranged, showing a drift of orientation preference of 180 degrees (Bartfeld and Grinvald, 1992; Bonhoeffer and Grinvald, 1991; Obermayer and Blasdel, 1993; Obermayer et al., 1992; Swindale, 2000). This description of the pinwheel pattern is a rule of thumb of the basic principle of these singularities rather than a formal definition of the pinwheel layout since the size and shape of the corresponding iso-orientation domains can be quite irregular.

Several optical imaging studies aimed at correlating pinwheels to macroscopic structures such as cytochrome oxidase (CytOx) blobs and/or ocular dominance columns (ODC) to gain evidence for a relationship of the functional entities with anatomical modules. These were carried out either in macaque monkeys (Bartfeld and Grinvald, 1992; Blasdel, 1992b; Blasdel and Salama, 1986; Landisman and Ts'o, 2002; Lu and Roe, 2008; Obermayer and Blasdel, 1993) or owl monkeys (Kaskan et al., 2007; Xu et al., 2004), marmosets (McLoughlin and Schiessl, 2006; Roe et al., 2005), cats (Crair et al., 1997), bush babies (Xu et al., 2005), or ferrets (White et al., 2001). In macaques and cats, pinwheels tend to be arranged along the centre line of ODC's and iso-orientation domains tend to cross ODC borders at right angles. These findings led to theoretical concepts of a discrete fundamental module that includes a set of pinwheels (Bartfeld and Grinvald, 1992; Vanzetta, 2006).

However, in view of the numerous studies that investigated these spatial relationship in species other than cat and macaque monkey, the question arises as to whether the correlation between pinwheels and e.g. ODC centres is a *conditio sine qua non* for the formation of these singularities - e.g. on account of the necessity to achieve uniform coverage, see (Swindale, 1991). Several studies demonstrate orientation preference maps of similar appearance in species lacking ODC (Adams and Horton, 2009) and CytOx-blobs e.g. the tree shrew (Johnson et al., 2010; Wong-Riley and Norton, 1988), and little is known about the topographic organization of pinwheels in these animals.

The distinct functional role of pinwheels therefore remains vague and no anatomical correlate could be found to date. This has given rise to speculation that pinwheels might be topological artifacts caused by data processing techniques (see Bonhoeffer and Grinvald, 1993; Polimeni et al., 2005) or simply "... a mathematical necessity..." of a distinct arrangement of functional modules (Crair et al., 1997).

However, recent studies using electrophysiology and two photon imaging found that, besides on intrinsic signal maps, pinwheels can also be found on the cellular level and that neurons selective for different orientations are clearly segregated in the pinwheel centres (Maldonado et al., 1997; Ohki et al., 2006). This confirms that populations of neurons are arranged in column-like assemblies and that these columns meet at the pinwheel centres.

Here we used the common marmoset which is known to display no ODC or shows occasionally weak column formation (Chappert-Piquemal et al., 2001; McLoughlin and Schiessl, 2006; Roe et al., 2005; Spatz, 1989) to investigate the topographic organization of pinwheels.

Since we did not find any ODC formation in our animals we focused on the spatial relationship of the pinwheel centres and orientation domains revealed in differential maps of orthogonal orientation responses. Note that orientation domain patches seen on differential maps are not *per se* identical to iso-orientation domains on "orientation angle" maps. Since the latter are a product of the vector averaging process of different orientation responses they differ in size and shape from the original population response domains found on differential maps. To differentiate them from iso-orientation domains we will further on refer to these differential map patches simply as orientation columns (Blasdel, 1992a; Grinvald et al., 1986).

Unlike cellular recordings, orientation columns revealed in intrinsic signal maps display changes in the cortical hemodynamic response which is fundamentally based on the architecture of the vascular system (Logothetis and Wandell, 2004; Vanzetta and Grinvald, 2008; Weber et al., 2008) and: "Due to the nature of neurovascular coupling, hemodynamic signals are known to spread beyond the locus of metabolic activity." (Sirotin and Das, 2010). Bearing this in mind and in view of the increasing number of functional magnetic resonance studies (fMRI) of the visual cortex, and the need for a better understanding of the properties of the hemodynamic response (e.g. its resolution, see Harrison et al., 2002 (Harrison et al., 2002; Sheth et al., 2004) it is of interest to examine whether the highly ordered arrangement of orientation selective neurons in pinwheel centres is also displayed in the hemodynamic response to orientation selective stimuli. Importantly, pinwheel centres in vector-averaged orientation preference maps can result from either equally strong response to several stimulus, or simply from a weak response to all orientations (Bonhoeffer and Grinvald, 1993). The two possibilities have not been investigated using intrinsic optical imaging data. We therefore examined the extent to which the topographic organization of pinwheel centres correlates with the shape of orientation columns. To do so we determined the borders of the activated orientation columns and investigated to what extent neighbouring columns within a pinwheel planarly overlap at pinwheel centres.

We find that orientation columns within pinwheels do not overlap the corresponding centre. Pinwheel centres are therefore never located in the central region of orientation columns. On the contrary, we find that the borders of orientation columns intersect at the pinwheel centres showing a precise tangential arrangement around them. Furthermore, we show that the formation of pinwheel centres is principally restricted to these points of column border intersection.

We thus provide evidence that pinwheel centre formation is correlated with the borders of orientation columns and that pinwheel centre formation is not necessarily correlated with low orientation preference of the underlying neuronal substrate as discussed earlier (Blasdel and Salama, 1986; Bonhoeffer and Grinvald, 1993; Ts'o et al., 1990). Our findings therefore indicate that the hemodynamic response signal provides a similar level of accuracy in spatial organization as shown for the cellular response of neuronal populations (Ohki *et al.*, 2006).

2. Material and Methods

2.1. Animals

Four female adult marmosets (*Callithrix jacchus*; 400-550g) were used in this study as part of a more extensive research on the visual system (see Valverde Salzmann *et al.*, 2011). The animals were kept in pairs in enriched climatized cages of up to 6m³ in size and received water *ad libitum* and daily fresh and changing fruits, vegetables, Arabic gum (Marmoset gum, Mazuri Europe, England), marmoset pellets (Mini Marex, Mazuri Europe) and animal proteins in the form of eggs, locusts and mealworms. All surgical and experimental procedures were approved by the local authorities (Regierungspräsidium) and are in full compliance with the directive of the European community for the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (86/609/EEC). A detailed description of our surgical and anesthesia protocols and of the alignment of anatomical and functional data can be found in (Valverde Salzmann *et al.*, 2011).

2.2. Surgery, anesthesia

Animals were anaesthetized using remifentanyl (Ultiva, GlaxoSmithKline, Munich, Germany) (0.06-0.1µg/kg/min intravenously (i.v.) and additional doses of sevofluran (Sevorane, ABBOTT, Illinois, U.S.A.) (4-6% in medical O₂ applied during the surgery via a facemask and 0-1.5% during experimental conditions via tracheal tube). Muscle relaxation during the experiment was achieved using Mivacron (1 mg/kg body weight/hour i.v.). All incision sites were additionally pretreated with local injections of Lidocain-HCL (2%, B. Braun Melsungen). The femoral vein was cannulated for the infusion of the opioids and additional electrolyte solutions (Aminin, Merial, Hallbergmoos, Germany; Jonosteril, Fresenius Kabi, Homburg, Germany). A tracheotomy was performed for mechanical ventilation. Animals were respirated at 38-45 strokes/min with a mixture of medical air and O₂ (ratio 80%:20%). End-tidal-CO₂ was measured and maintained at 3.4±1% by adjusting respiration rate and/or stroke volume. A craniotomy of approximately 5mm radius was performed over the visual cortex. The dura mater was kept intact. An optical chamber was implanted and filled with agarose gel (6% in NaCl, Type VII Sigma-Aldrich Chemie, Munich, Germany). Physiological parameters and anesthetic depth were constantly monitored by recording ECG, EEG, SpO₂ (maintained at > 98%) and body temperature. The latter was adjusted to 37±1°C via a heated silicone gel pad.

2.3. Preparation for optical recordings

The animals were mounted into a stereotactic apparatus and the eyes were focused on the stimulus screen (24"LCD monitor gamma corrected, Belinea o.display 4.1, Belinea, Wittmund, Germany) - placed 50cm in front of the animals' eyes - using PMM contact lenses (Soflex Israels Contact Lenses Ltd., Misgav, Israel) and an infrared video refractor (Schaeffel et al., 1994; Troilo et al., 2007). The stimulus screen spanned 55° horizontal x 37.5° vertical of the animal's central field of view. The eyes were moistened with saline in regular intervals and periodic eye checks were made to ensure a clear view through the artificial lenses during the experiment. At the end of the experiment the anaesthetic depth was increased by adjusting the rate of sevofluran to 5% and the remifentanil infusion was increased to 0.5µg/kg/min. Animals were then sacrificed by an injection of a lethal dose of pentobarbital (1.5ml Narcoren, 160mg/ml, intracardially). The animals were then perfused intracardially with phosphate buffer (PB) (0.1M) followed by 4% Paraformaldehyd (Roti-Histofix, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) and the brain was extracted for further histological preparation in the context of another study (seeValverde Salzmman *et al.*, 2011).

2.4. Optical imaging

We recorded the intrinsic signals at red light illumination (6x LED ring light, peak wavelength 634nm Nichia 5mm LED NSPR510CS, Lumitronix LED-Technik, Hechingen, Germany) and an optical imaging 3001 system (Optical Imaging Inc.) with a Dalsa 1M60P camera. Reflectance changes were recorded at 60Hz at full camera resolution (1020x1020 pixel). Temporal binning was applied, resulting in a reduction of the raw frame rate to 5Hz. All stimuli were presented randomly 30 times in blocks. Each block consisted of a blank stimulus and six achromatic moving square wave gratings (spatial frequency 1.2 cycles/degrees; temporal frequency 2Hz) of different orientations that alternated movement direction every 0.75 seconds. Stimuli were presented binocularly. The animal was presented with a grey screen during both the blank condition and the interstimulus phases. Stimuli were presented for 3-4 seconds, two seconds after frame recording started. 50 frames were recorded during each presentation. Interstimulus intervals ranged between 13 and 15 seconds. The cortical responses to each stimulus were averaged. Thus, each stimulus condition showed the time course of the mean reflectance changes of 30 stimulations over 50 frames. To test for ocular dominance the same set of stimuli were presented to the left and right eye in separated trails. During stimulation of one eye, the contralateral eye was covered with black tape.

2.5. Data processing

IOI data processing was carried out using custom-written scripts executed in Matlab (The MathWorks, Inc., Massachusetts, U.S.A.). In all cases, image processing was performed pixel wise. Map calculations and filtering were based on a modified version (Valverde Salzmman *et al.*, 2011) of protocols published by (Lu and Roe, 2007). We used a frame-zero-subtraction to calculate a single condition map time series of the optical reflectance changes ($\Delta R/R$) for the relevant 46 (of 50) frames of each stimulus condition. The map of the single condition map time series that revealed the response pattern most clearly was used for further signal correlation analysis. This was usually a map corresponding to the point in time 1-2 seconds after stimulus onset. We calculated differential maps for each stimulus condition by subtracting the response pattern of one orientation from the response pattern of the orientation

orthogonal to it. The contrast of the differential maps was then thresholded at $\pm 2\%$ pixel intensity. We used a standard vector averaging approach to calculate vector maps of orientation selectivity (Macke et al., 2010; Valverde Salzmann *et al.*, 2011). From this we calculated orientation-angle maps to reveal the topographic organization of iso-orientation domains and orientation-magnitude maps showing the local magnitude of orientation preference. The latter was gained by calculating the absolute values of the vector map (figure 1D).

To visualize regions on orientation-angle maps corresponding to a distinct orientation stimulus response a colour map - a table of RGB vectors that define the colour (or grey value) of a displayed image pixel - was applied to the map (see figure 1B). In a second approach we used achromatic colourmaps to highlight a single orientation response in the angle maps (for details see Pinwheel detection).

2.6. Ocular dominance maps

Due to the short distance ($\sim 1.5\text{cm}$) between marmoset's eyes, it is difficult to place mechanical shutters in front of the eyes to present stimuli alternating to each eye within a single stimulus block. We therefore took an alternative approach by which stimuli were presented to each eye singly in separate blocks. We calculated ocular dominance maps by summing up all responses of the left eye conditions and subtracted the resulting map from the sum of right eye conditions.

2.7. Pinwheel detection

In previous studies, colour-coded orientation-angle maps were used to identify pinwheels by searching for zero-dimensional points on the map around which the colour-coded orientation preference turns (convergence of different coloured regions). An RGB colour map is therefore usually assigned to the orientation-angle map.

When examining these colour-coded maps for pinwheel centre positions, we noticed that the identification of the pinwheel centre positions can sometimes be difficult. To simplify identification, colour-coding of the angle maps was performed with achromatic colour maps.

In these (achromatic colour) maps, the pixel values indicating response values for one orientation were set to RGB black. The bandwidth of pixel values set to black resembled that of the corresponding RGB colour in the standard colour-coded angle map. The colour for the complementary orientation was set to white. The values for orientations in between the two complementary orientations were adjusted to show a smooth transient from dark grey to bright grey (see figure 1C). We then calculated 12 different achromatic maps to highlight different orientation response values of the angle map in steps of 15 degree. The resulting series of 12 different achromatic angle maps sorted for correct angular order was then animated by converting the series to a movie file (see movie 1). Next, the movie was played and turning points were identified by eye. The coordinates of these points were determined and then used to calculate a pinwheel map where each pinwheel was represented by a white dot (4 pixel diameter = $\sim 50\ \mu\text{m}$). Pinwheels could thus be identified with higher certainty and convenience than had been possible using the colour-coded maps. All marked pinwheel centre positions were validated by superimposing the corresponding orientation-magnitude map and checking the match of each pinwheel

position with the domains of low orientation selectivity magnitude (also known as fractures) (figure 1 C, 2 A). Finally, we calculated the nearest neighbor distance for all pinwheel centres in the map (table 1).

2.8. Orientation column contours

To identify the contours of functional orientation columns as revealed in the differential maps for each orientation condition, we used a canny edge detector algorithm (Matlab 2010b; (Canny, 1986)). This has also been used in previous studies to identify borders of functional columns (see Adams et al., 2007). First, the differential maps were again thresholded, this time at the top 80% pixels, and converted to a binary image. The canny edge detection algorithm was then applied on the binary image using a *sigma* of 3 and an *empty thres* value as function parameters. The contour maps of the orthogonal conditions (e.g. horizontal and vertical) showed the same result.

Moreover, by calculating the absolute values of each of the six differential maps (for details see result section) we were able to determine the orientation column contours in differential maps. This simple alternative data processing technique enabled us to compare the results of both procedures and to verify the correct contour detection of the canny edge detector algorithm. One example of the resulting column-contour maps gained by this method is shown in figure 2 E.

2.9. Distance measurement between orthogonal orientation columns

Since the size of functional columns in differential maps depends on several parameters (e.g. thresholding, filtering, slope of pixel intensity in activated regions (see Polimeni *et al.*, 2005) we calculated the centre to centre distance of one orientation column to its nearest neighbour column of the orthogonal orientation. This enabled us to compare our results with those of a detailed studies on functional column sizes in marmosets (McLoughlin and Schiessl, 2006). We used a methodological approach reported elsewhere to define the centres of the functional columns (Lu and Roe, 2008). The centres were identified by eye. Disks with a diameter of 150 μm were superimposed on these locations and the coordinates of the disc centres were determined. Column-coordinates of orthogonal orientation columns were merged together. We then calculated the mean of the nearest neighbor distance for the disk centres. To avoid the danger of taking distances into account that exceed a plausible nearest neighbor distance, we ignored values that exceeded the repeat distance of the orientation columns in marmosets reported by (McLoughlin and Schiessl, 2006). These values should be theoretically twice as high as the values measured here.

3. Results

3.1. Distance measurement between orthogonal orientation columns

We measured the distances between complementary orientation column peaks on differential maps (table 1). Assuming that the complementary columns require an equal amount of cortical space this calculation provides a measurement of the actual orientation column diameter (ocd). As expected, we find that the mean column peak distance shows half the size of the repeating distance (rp) of orientation columns in marmosets reported by (McLoughlin and Schiessl, 2006) (ocd: $2 \times 292.98 \mu\text{m} = 585.96 \mu\text{m}$ versus rp: $577 \pm 69 \mu\text{m}$).

3.2. Ocular dominance

Some new world monkeys, such as squirrel monkeys and marmosets show no or only a very obscure expression of ODC. Horton and colleagues (see Adams and Horton, 2009) showed that the ocular dominance pattern of squirrel monkeys does not consist of regularly alternating bands (as observed in macaques, cats, and owl monkeys) and that CytOx-blobs are not aligned with ODC centre lines. For marmosets, diverging data exists. Few studies show ODC in juvenile animals (Spatz, 1989), one optical imaging study shows weak ODC in adult animals (Roe *et al.*, 2005). Several studies report the absence of ODC in marmosets (see e.g. McLoughlin and Schiessl, 2006).

We tested three of our four monkeys for ocular dominance by presenting gratings of six different orientations to each eye separately and calculating the difference between the individually summed left and right eye responses. None of the resulting maps showed a regular pattern of left eye/right eye difference that would resemble linear zones of ODC as shown in previous studies on macaque monkeys or marmosets (Lu and Roe, 2007; Obermayer and Blasdel, 1993; Roe et al., 2005; Xu et al., 2005).

3.3. Pinwheel centre determination

An investigation of the achromatic orientation-angle maps showed that the identification of pinwheel centres is significantly facilitated. The animation of the achromatic orientation-angle map series was helpful in clearly identifying pinwheels in regions of irregular orientation preference topography, where pinwheel centres are found at irregular intervals (see supplementary files). An example of this is shown in figure 4 B. Several pinwheel centres - connected by a single low orientation-magnitude fracture - are found to form pairs with centre to centre distances below $\sim 80 \mu\text{m}$ (arrow). At first glance, this might be considered as an artifact. However, since orientation selectivity shows a full radial drift of 180 degrees at both centres, each of them must be considered as an individual pinwheel centre. Such pinwheel centre pairs were found in each case. However, a rule for the emergence of this pairing could not be found.

3.4. Orientation column contours

By calculating the absolute values of the six differential maps we gained absolute-differential maps that show a cell-like pattern of white patches separated by dark linear zones (figure 2 E). In this way, we gained only three different maps since the absolute-differential maps of orthogonal orientations were identical. The white patches observed on the absolute-differential maps match with the functional columns seen on the corresponding differential maps. When superimposing the absolute-differential maps on the results of the canny edge detection algorithm we find an almost perfect match of the dark lines from the absolute maps and the "canny contours" (figure 2 E). This match confirms that the canny algorithm faithfully detected the column contours and also *vice versa* that the results of the absolute-differential maps principally reflect the column contours or rather the borders between two orthogonal orientation columns. Mathematically, the dark linear zones in the absolute-differential maps display regions of minimum difference in signal amplitude of the corresponding single condition maps.

The canny algorithm results could be considered as reflecting the iso-orientation contours as described by (Obermayer and Blasdel, 1993).

However, in earlier studies iso-orientation contours (sometimes also referred to as iso-orientation lines) were calculated by determining the contours of iso-orientation regions in angle maps of orientation preference (Obermayer and Blasdel, 1993), or by drawing the contours of the orientation response peaks found in differential maps (Bonhoeffer and Grinvald, 1993).

It is important to consider, that the orientation-angle maps of the vector averaging approach show a continuous change in orientation preference, although these maps are based on only few actual orientation stimulus conditions. Thus, they provide an interpolated topography of orientation preferences. As a consequence of this, iso-orientation contours gained from these maps do not necessarily reflect the true shapes of the functional columns found in single orientation responses. Similarly, the size and the shape of the response peaks found on differential maps are strongly dependent on the thresholding parameters that are used to display the map. By contrast, the column contours found on the absolute-differential maps are independent from such parameter bias. They therefore display the extent of the functional columns, that is inherently determined by the differential imaging approach.

Fracture patterns similar to the ones presented here have been shown previously in maps of direction selectivity (Swindale et al., 2003), or spatial frequency (Villeneuve et al., 2009).

However, to our knowledge, this is the first time that the absolute "fractures" calculated on differential maps of orientation preference are shown to reflect the borders of the functional columns displayed in the differential maps and that this borders are correlated with pinwheel centres.

3.5. Spatial correlation of pinwheel centres, column contours and regions of low orientation magnitude (fractures)

In early studies, maps of the magnitude of orientation preference were gained by calculating the absolute values of the corresponding orientation-angle maps. Regions of low orientation preference magnitude - the so-called 'fractures' - were shown to correlate with the centres of pinwheels (Bartfeld and Grinvald, 1992; Blasdel and Salama, 1986; Bonhoeffer and Grinvald, 1991). Fractures have been placed into context with cortical regions containing clusters of cells that tend to be less orientation selective. However, several findings indicate that the change in orientation preference magnitude at pinwheel centres is not due to low orientation preference of the surrounding cells. Early physiological recording studies of upper layer V1 cells showed abrupt changes in orientation preference with pinwheel-like organization in the cortical plane (Swindale, 1982; Swindale *et al.*, 1987). Other physiological studies (Maldonado *et al.*, 1997) demonstrated the high selectivity of neurons in pinwheels thus showing that pinwheel centres do not contain a higher rate of orientation unselective cells than iso-orientation domains. Using two photon microscopy (Ohki *et al.*, 2006) recently showed that neurons selective for different orientations are clearly segregated in pinwheel centres.

On the basis of the above mentioned findings, we tested two assumptions (A,B) in order to examine whether our novel data analysis protocols allow to confirm either of the two notions. A) If the formation of a pinwheel centre is due to a clustering of non-orientation selective cells that respond equally to all orientation stimuli then one would expect the different orientation columns revealed in the differential

maps to have a distinct planar overlap. Figure 3 A demonstrates this scenario. B) By contrast, if the highly accurate spatial arrangement as seen in the two photon studies (Ohki *et al.*, 2006) is reflected in the hemodynamic response and thus in the intrinsic signal, one would expect to find a distinct arrangement of column borders that intersects at the pinwheel centre as demonstrated in figure 3 B.

Thus, an overlay of the column border from the different orientation stimulus conditions should either show a pattern similar to figure 3 A or figure 3 B.

The overlay of the three associated "canny" contour maps confirms that the zones of low orientation preference magnitude in orientation-magnitude maps match those regions where column contours intersect with each other (figure 4), thus resembling assumption B.

In all four animals we find that the contours of orientation columns that correspond to a distinct pinwheel intersect at its centre (figure 6). No pinwheel centre formed by regions of significant planar overlap of orientation columns, resembling assumption A, was observed.

However, unlike the one dimensional canny contours the fractures in the differential absolute maps show a certain width of roughly 30 to 60 μm .³

To demonstrate the influence of this width on the formation of the low orientation magnitude fractures we calculated the sum of the three differential absolute maps. By doing so, we obtained the same fracture pattern as seen on the orientation-magnitude map of the original orientation-angle map (for comparison see figure 5 D and 2 A, respectively). Thus, the orientation-magnitude fractures could be considered to be structures principally displaying regions of a distinct column border overlap (figure 4).

As shown in figure 4 Ba, circular fractures in orientation-magnitude maps are found to indicate regions in the cortical plane where three column borders intersect at a single point. Elongated fractures indicate regions where the column borders of only two orientation responses show a distinct segmental overlap (figure 4 Bb).

To provide further support for this finding, we also calculated the sum of the absolute maps of only two differential maps. The resulting maps (figure 5 A,B,C) show elongated curved fractures. These fractures indicate regions where the column borders of the two corresponding differential maps show a segmentally overlapping course. Thus, the fractures in orientation-magnitude maps can also be considered as a result of an overlap of the differential map fractures and the size of these fractures is determined by the width of the column borders.

One explanation for the formation of the cell-like fracture pattern in the absolute-differential maps is that these fractures display regions where the intrinsic responses to both orientation stimuli are of equal amplitude, hence low orientation selectivity. Subsequently, since the fractures in orientation-magnitude maps are formed by the overlap of the absolute-differential map fractures this findings also support the notion that pinwheel centres are regions of low orientation selectivity.

³ Note that, since the resolution of single condition optical imaging maps is assumed to be in the range of $\sim 50 \mu\text{m}$ (Vanzetta and Grinvald, 2008) our measurement result provides a definite uncertainty.

On the other hand, the overlap of columns which leads to the formation of the fractures might also simply display the spread of the intrinsic signal beyond the borders of sharply segregated cell populations (as demonstrated by Ohki *et al.*, 2006).

In any case, our findings show that by imaging the hemodynamic response to orientation stimuli in pinwheels a similar accurate spatial arrangement at the pinwheel centres as seen in the two photon studies can be found.

When pinwheel centre positions are superimposed on differential maps of orientation preference we find that each orientation column is surrounded by several pinwheel centres which are located at its border region.

The number of pinwheels per column is difficult to calculate since the activated regions in our data tend to form elongated rows of interconnected orientation columns instead of clearly segregated modules. However, if we take only the peaks of the orientation selective responses into account, we end up with a ratio of approximately 3 to 4 pinwheels per column peak (see figure 2 C).

4. Discussion

4.1. Topology of intrinsic optical imaging signals in pinwheels

Intrinsic signal maps show that the cortical response to a single orientation stimulus evokes a rather diffuse activation of the imaged tissue. Differential imaging techniques allow one to separate the cortical regions that are highly specific to the stimulus cue (Bonhoeffer and Grinvald, 1996), and which are commonly referred to as functional columns.

The functional columns recorded in intrinsic optical imaging experiments are assumed to show a population response vector of cells (Lu and Roe, 2008; Ohki *et al.*, 2006; Vanzetta and Grinvald, 2008). Two photon studies showed that orientation selective cells show a highly ordered arrangement in pinwheel centres which resembles the arrangement of iso-orientation domains found in corresponding optical imaging angle maps (Ohki *et al.*, 2006). Thus, these studies indicate that pinwheels are made up of a set of functional columns that are spatially separated at the centre of the pinwheel.

Here we aimed at investigating whether this spatial separation is also reflected in intrinsic signal maps of the hemodynamic response to orientation stimuli. In contrast to previous studies we investigated for this purpose the borders of the functional columns which are different from the contours of iso-orientation domains. We did this by determining the functional column contours on differential maps of orthogonal orientation stimulus responses. We then examined the spatial correlation between pinwheel centres found on angle maps of orientation preference and the column contours. We show that pinwheel centres correlate with regions where functional columns intersect at a single point in the cortical plane. By determining the contours of functional columns surrounding pinwheel centres we show that the spatial extent of the intrinsic signal within pinwheels reflects a highly accurate organization similar to that reported for cellular responses in two photon studies (Ohki *et al.*, 2006),

physiological recordings (Swindale *et al.*, 1987) and early models for the formation of orientation columns (Braitenberg, 1992; Swindale, 1982).

In addition we investigated our data to ascertain whether the vector averaging used to calculate topological maps of orientation preference also leads to pinwheel centre formation at points where two or more functional columns planarly overlap. The latter approach is based on the fact that a low orientation magnitude - and hence pinwheel centre formation - can be the result either of various stimulus orientations evoking the same strong response, or simply of a weak response to all orientations (Bonhoeffer and Grinvald, 1993). In either case the lack in stimulus-response specificity should theoretically lead to overlapping columns. However, we find that in no instance were pinwheel centres located within the central region of an orientation column, thus indicating that a distinct planar overlap of columns is not the decisive factor in pinwheel centre formation. On the contrary, pinwheel centres strictly coincided with points where the contours of two or more orientation columns tangentially intersect.

Thus our results support the view that pinwheel centres mark points in the cortical plane where cell populations that are highly selective for different orientations show an accurate spatial separation. They also indicate that the formation of a pinwheel centre is restricted to the border region of columns.

4.2. Pinwheel formation

In the past several authors indicated that pinwheels might be simply a mathematical necessity (Crair *et al.*, 1997; Grinvald *et al.*, 1986) of orientation maps that results out of the arrangement of functional columns for achieving uniform coverage (see Swindale, 2000; Swindale *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2005) or even may be an artifact whose structural composition (e.g. density and centre position) is strongly dependent on the image acquisition techniques and data processing protocols (see Polimeni *et al.*, 2005). This is due to the fact that up to now no anatomical correlate of a pinwheel centre could be found. Nevertheless, so far the contrary notion - that pinwheels are functional units that play a certain role in the cortical architecture - still remains a plausible hypothesis (e.g. Bartfeld and Grinvald, 1992; Dow, 2002; Kang *et al.*, 2003; McLaughlin *et al.*, 2000; Obermayer and Blasdel, 1997; Ohki *et al.*, 2006; Swindale, 1982; Vanzetta and Grinvald, 2008). In addition, our data suggests that the formation of a pinwheel centre is restricted to certain points in the map e.g. where column borders intersect. It is thus unlikely that variations within a reasonable range of image processing techniques as discussed by (Polimeni *et al.*, 2005) lead to a deviation from that rule. Since we did not test e.g. different filtering protocols we cannot exclude that additional image filtering affects the appearance (e.g. size) of functional columns in intrinsic signal maps and therefore might lead to a change in the location of the pinwheel centre in the cortical plane. Though, it seems unlikely that this also affects the correlation between pinwheel centres and column border intersections.

On the other hand, in regard of our data showing that orientation-magnitude fractures can be calculated by summing over all absolute-differential maps it becomes again plausible that the fractures indicate regions of low orientation preference. The dark fracture bands seen on the absolute-differential map are the result of low signal amplitude differences between two orthogonal orientation responses. The local

minimum values found by summing the three absolute-differential maps thus indicate regions where all of the corresponding absolute-differential maps show low response differences. Hence the orientation-magnitude fractures could also be assumed to display regions where all stimulus orientations evoke similar response amplitudes - resulting in low orientation preference values on the vector maps. However, their appearance is significantly different from that of other functional columns showing low orientation selectivity e.g. colour domains (Landisman and Ts'o, 2002; Livingstone and Hubel, 1984; Lu and Roe, 2008).

As shown in previous studies (e.g. Polimeni *et al.*, 2005), and others), our results indicate that the optical imaging technique hardly allows one to distinguish between areas of low orientation selectivity and areas of mixed orientation preferences, since it does not resolve single cell activity.

However, it is worthwhile to examine the formation of the low-orientation fracture patterns and the topology of orientation selective responses within pinwheels using intrinsic optical imaging, since this method might be able to provide positional information about structures that beside -neuronal populations- contribute to the formation of the intrinsic signal maps and that have been unmentioned so far (to our knowledge) in corresponding studies (such as (Maldonado *et al.*, 1997), or (Ohki *et al.*, 2006)) concerning pinwheel formation, namely: draining or feeding vessels.

4.3. Pinwheel formation and angioarchitecture

Despite the explanations of a pinwheel centre formation due to cellular connectivity, our results suggest another possible mechanism that is based on neurovascular coupling.

It has been shown that the topography of neural maps in the brain is determined by axon guidance receptors (Imai *et al.*, 2009), and that these molecules also influence vascular patterning (for reviews see Adams and Eichmann, 2010), and (Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005)). Others (Sheth *et al.*, 2004) find, that cortical neurons with similar properties are grouped in columnar structures and supplied by matching vascular networks. So it is plausible to assume that the functional topography of orientation selectivity in V1 is influenced by the underlying vascular network.

Using intrinsic optical imaging, functional columns are mapped by measuring changes in the intrinsic signal. Since the latter is fundamentally based on the hemodynamic response (Vanzetta and Grinvald, 2008) these functional columns may be considered as structures whose shapes are principally determined by the underlying angioarchitecture. Strong evidence for this is provided by the vascular graph model of (Reichold *et al.*, 2009), which shows columnar distribution patterns of increased blood flow within a realistic cortical vascular net that solely emerges by a change in diameter of a single supplying artery.

A pinwheel centre might thus display the position of a structure in control of a columnar draining-feeding mechanism. Such a structure might either be a vascular shunt that controls the flow to a bunch of capillaries or simply a feeding or a draining vessel (see e.g. Duvernoy *et al.*, 1981; or Reichold *et al.*, 2009) that either directs oxygenated blood radially toward cell populations located within the surrounding columns, or directs deoxygenated blood away from these columns.

In their figure 61, Duvernoy et al., 1981 show a drawing of a tangential section of venous units that are surrounded by arteries arranged in a ring-like pattern. From this arrangement it seems plausible to assume that a single vein (as in their cases 1 and 3) serves as the principle draining unit (or the draining pole of several draining/feeding units) for the oxygenated and deoxygenated blood delivered by the surrounding arteries to different cell populations.

In the same way and with regard to case 2 of Duvernoy et al.'s figure 61 which shows two adjacent principal veins in the centre of a single venous unit, it is possible to explain the phenomenon of the pinwheel pairs (see our figure 4 A and results section) as the representation of two adjacent draining poles.

Such a radial arrangement of functional columns around a single vessel could indicate a distinct vascular distribution mechanism that would enable a highly economic supply of spatially clustered neuronal populations.

We think that the evolution of such a distribution mechanism could also account for the difference between the regular organization of orientation selective neurons within the large cortical areas of primates and the "salt and pepper"-distribution of orientation selective neurons as it is found e.g. in the small brain of rodents (Ohki et al., 2005); see also (Horton and Adams, 2005), since the blood supply of the larger visual areas of primate cortices might lead to an increased need for highly economic blood supply mechanisms.

Note that a vertical blood vessel (mean diameter in primates = 23.8 - 26.1 μm (Keller et al., 2011)) e.g. a feeding artery that supplies several columns of different orientation preferences, should theoretically lead to similar signal amplitudes in all corresponding maps. Since the predominant signal (at red light illumination) is assumed to originate from activity-dependent oxygen delivery from capillaries (Frostig et al., 1990) it may be also important to consider that vertical vessels are surrounded by the capillary-free "Pfeifer space" (Duvernoy *et al.*, 1981; Keller *et al.*, 2011). This may contribute to the assumed lack of response specificity of a vertical vessel. On the whole, this should lead to a peak of low orientation preference (fracture) in orientation magnitude maps which accompanies every pinwheel centre as well to a low difference magnitude in the absolute-differential maps.

In sum, this concept provides a simple and anatomically anchored explanation for the radial arrangement of orientation columns around pinwheel centres and therefore for the formation of the pinwheel pattern itself.

However, we are not yet aware of any report in which anatomical structures are shown to be spaced at distances that would either match with pinwheel distances or the diameter of orientation columns. Correlations between vascular structures such as vertical vessels and pinwheel centres are difficult to detect due to the large dislocation error in such functional-anatomical studies (see Polimeni *et al.*, 2005; Valverde Salzmann *et al.*, 2011). Further studies using functional high resolution imaging approaches (such as two photon microscopy) combined with the concurrent registration of vascular structures may afford deeper insights into this matter.

Acknowledgements

This work was supported by the Max Planck Society. Special thanks go to Almut Schüz for the support of this work. We thank Andreas Bartels and Damian Wallace for proofreading and helpful comments on the manuscript

References

Adams, D.L., Horton, J.C., 2009. Ocular Dominance Columns: Enigmas and Challenges. The Neuroscientist 15, 62-77.

Adams, D.L., Sincich, L.C., Horton, J.C., 2007. Complete Pattern of Ocular Dominance Columns in Human Primary Visual Cortex. The Journal of Neuroscience 27, 10391-10403.

Adams, R.H., Eichmann, A., 2010. Axon Guidance Molecules in Vascular Patterning. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2.

Bartfeld, E., Grinvald, A., 1992. Relationships between orientation-preference pinwheels, cytochrome oxidase blobs, and ocular-dominance columns in primate striate cortex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, 11905-11909.

Blasdel, G., 1992a. Differential imaging of ocular dominance and orientation selectivity in monkey striate cortex. The Journal of Neuroscience 12, 3115-3138.

Blasdel, G., 1992b. Orientation selectivity, preference, and continuity in monkey striate cortex. J. Neurosci. 12, 3139-3161.

Blasdel, G.G., Salama, G., 1986. Voltage-sensitive dyes reveal a modular organization in monkey striate cortex. Nature 321, 579-585.

Bonhoeffer, T., Grinvald, A., 1991. Iso-orientation domains in cat visual cortex are arranged in pinwheel-like patterns. Nature 353, 429-431.

Bonhoeffer, T., Grinvald, A., 1993. The layout of iso-orientation domains in area 18 of cat visual cortex: optical imaging reveals a pinwheel-like organization. The Journal of Neuroscience 13, 4157-4180.

Bonhoeffer, T., Grinvald, A., 1996. Optical Imaging based on intrinsic signals: the methodology. Brain mapping; the methods, 55-97.

- Braitenberg, V., 1992. *How Ideas Survive Evidence to the Contrary: a Comment of Data Display and Modelling*. In: Aertsen, A. (Ed.), *Information Processing in the Cortex: Experiments and Theory*. Springer, Berlin, Germany, pp. 447-450.**
- Canny, J., 1986. *A Computational Approach to Edge Detection*. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on PAMI-8*, 679-698.**
- Carmeliet, P., Tessier-Lavigne, M., 2005. *Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring*. *Nature* 436, 193-200.**
- Chappert-Piquemal, C., Fonta, C., Malecaze, F., Ccedil, OIS, Imbert, M., 2001. *Ocular dominance columns in the adult New World Monkey Callithrix jacchus*. *Visual Neuroscience* 18, 407-412.**
- Chenchal Rao, S., Toth, L.J., Sur, M., 1997. *Optically imaged maps of orientation preference in primary visual cortex of cats and ferrets*. *The Journal of Comparative Neurology* 387, 358-370.**
- Crair, M.C., Ruthazer, E.S., Gillespie, D.C., Stryker, M.P., 1997. *Ocular Dominance Peaks at Pinwheel Center Singularities of the Orientation Map in Cat Visual Cortex*. *Journal of Neurophysiology* 77, 3381-3385.**
- Dow, B.M., 2002. *Orientation and Color Columns in Monkey Visual Cortex*. *Cerebral Cortex* 12, 1005-1015.**
- Duvernoy, H.M., Delon, S., Vannson, J.L., 1981. *Cortical blood vessels of the human brain*. *Brain Research Bulletin* 7, 519-579.**
- Frostig, R.D., Lieke, E.E., Ts'o, D.Y., Grinvald, A., 1990. *Cortical Functional Architecture and Local Coupling Between Neuronal Activity and the Microcirculation Revealed by In vivo High-Resolution Optical Imaging of Intrinsic Signals*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 6082-6086.**
- Grinvald, A., Lieke, E., Frostig, R.D., Gilbert, C.D., Wiesel, T.N., 1986. *Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals*. *Nature* 324, 361-364.**
- Harrison, R.V., Harel, N., Panesar, J., Mount, R.J., 2002. *Blood Capillary Distribution Correlates with Hemodynamic-based Functional Imaging in Cerebral Cortex*. *Cerebral Cortex* 12, 225-233.**
- Horton, J.C., Adams, D.L., 2005. *The cortical column: a structure without a function*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360, 837-862.**
- Imai, T., Yamazaki, T., Kobayakawa, R., Kobayakawa, K., Abe, T., Suzuki, M., Sakano, H., 2009. *Pre-Target Axon Sorting Establishes the Neural Map Topography*. *Science* 325, 585-590.**
- Johnson, E.N., Van Hooser, S.D., Fitzpatrick, D., 2010. *The Representation of S-Cone Signals in Primary Visual Cortex*. *The Journal of Neuroscience* 30, 10337-10350.**

Kang, K., Shelley, M., Sompolinsky, H., 2003. Mexican hats and pinwheels in visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2848-2853.

Kaskan, P.M., Lu, H.D., Dillenburger, B.C., Roe, A.W., Kaas, J.H., 2007. Intrinsic-signal optical imaging reveals cryptic ocular dominance columns in primary visual cortex of New World owl monkeys. *Frontiers in Neuroscience*, 10.

Keller, A.L., Schüz, A., Logothetis, N.K., Weber, B., 2011. Vascularization of Cytochrome Oxidase-Rich Blobs in the Primary Visual Cortex of Squirrel and Macaque Monkeys. *The Journal of Neuroscience* 31, 1246-1253.

Landisman, C.E., Ts'o, D.Y., 2002. Color Processing in Macaque Striate Cortex: Relationships to Ocular Dominance, Cytochrome Oxidase, and Orientation. *J Neurophysiol* 87, 3126-3137.

Livingstone, M., Hubel, D., 1984. Anatomy and physiology of a color system in the primate visual cortex. *The Journal of Neuroscience* 4, 309-356.

Logothetis, N.K., Wandell, B.A., 2004. Interpreting the BOLD Signal. *Annual Review of Physiology* 66, 735-769.

Lu, H.D., Roe, A.W., 2007. Optical Imaging of Contrast Response in Macaque Monkey V1 and V2. *Cerebral Cortex* 17, 2675-2695.

Lu, H.D., Roe, A.W., 2008. Functional Organization of Color Domains in V1 and V2 of Macaque Monkey Revealed by Optical Imaging. *Cerebral Cortex* 18, 516-533.

Macke, J.H., Gerwinn, S., White, L.E., Kaschube, M., Bethge, M., 2010. Gaussian process methods for estimating cortical maps. *NeuroImage In Press, Corrected Proof*.

Maldonado, P.E., Gödecke, I., Gray, C.M., Bonhoeffer, T., 1997. Orientation Selectivity in Pinwheel Centers in Cat Striate Cortex. *Science* 276, 1551-1555.

McLaughlin, D., Shapley, R., Shelley, M., Wielaard, D.J., 2000. A neuronal network model of macaque primary visual cortex (V1): Orientation selectivity and dynamics in the input layer 4Ca. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 8087-8092.

McLoughlin, N., Schiessl, I., 2006. Orientation selectivity in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): The periodicity of orientation columns in V1 and V2. *NeuroImage* 31, 76-85.

Obermayer, K., Blasdel, G., 1993. Geometry of orientation and ocular dominance columns in monkey striate cortex. *J. Neurosci.* 13, 4114-4129.

Obermayer, K., Blasdel, G.G., 1997. Singularities in primate orientation maps. *Neural Comput.* 9, 555-575.

- Obermayer, K., Blasdel, G.G., Schulten, K., 1992. Statistical-mechanical analysis of self-organization and pattern formation during the development of visual maps. *Phys. Rev. A* 45, 7568-7589.**
- Ohki, K., Chung, S., Ch'ng, Y.H., Kara, P., Reid, R.C., 2005. Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature* 433, 597-603.**
- Ohki, K., Chung, S., Kara, P., Hubener, M., Bonhoeffer, T., Reid, R.C., 2006. Highly ordered arrangement of single neurons in orientation pinwheels. *Nature* 442, 925-928.**
- Polimeni, J.R., Granquist-Fraser, D., Wood, R.J., Schwartz, E.L., 2005. Physical limits to spatial resolution of optical recording: Clarifying the spatial structure of cortical hypercolumns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 4158-4163.**
- Reichold, J., Stampanoni, M., Keller, A.L., Buck, A., Jenny, P., Weber, B., 2009. Vascular graph model to simulate the cerebral blood flow in realistic vascular networks. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 1429-1443.**
- Roe, A.W., Fritsches, K., Pettigrew, J.D., 2005. Optical imaging of functional organization of V1 and V2 in marmoset visual cortex. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 287A, 1213-1225.**
- Schaeffel, F., Hagel, G., Eikermann, J., Collett, T., 1994. Lower-field myopia and astigmatism in amphibians and chickens. *J. Opt. Soc. Am. A* 11, 487-495.**
- Sheth, S.A., Nemoto, M., Guiou, M., Walker, M., Pouratian, N., Hageman, N., Toga, A.W., 2004. Columnar Specificity of Microvascular Oxygenation and Volume Responses: Implications for Functional Brain Mapping. *The Journal of Neuroscience* 24, 634-641.**
- Sirotin, Y.B., Das, A., 2010. Spatial relationship between flavoprotein fluorescence and the hemodynamic response in the primary visual cortex of alert macaque monkeys. *Frontiers in Neuroenergetics* 2.**
- Spatz, W.B., 1989. Loss of ocular dominance columns with maturity in the monkey, *Callithrix jacchus*. *Brain Research* 488, 376-380.**
- Swindale, N.V., 1982. A Model for the Formation of Orientation Columns. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 215, 211-230.**
- Swindale, N.V., 1991. Coverage and the design of striate cortex. *Biol. Cybern.* 65, 415-424.**
- Swindale, N.V., 2000. How Many Maps are there in Visual Cortex? *Cerebral Cortex* 10, 633-643.**
- Swindale, N.V., Grinvald, A., Shmuel, A., 2003. The Spatial Pattern of Response Magnitude and Selectivity for Orientation and Direction in Cat Visual Cortex. *Cerebral Cortex* 13, 225-238.**

- Swindale, N.V., Matsubara, J.A., Cynader, M.S., 1987. Surface organization of orientation and direction selectivity in cat area 18. J. Neurosci. 7, 1414-1427.*
- Swindale, N.V., Shoham, D., Grinvald, A., Bonhoeffer, T., Hubener, M., 2000. Visual cortex maps are optimized for uniform coverage. Nat Neurosci 3, 822-826.*
- Troilo, D., Quinn, N., Baker, K., 2007. Accommodation and induced myopia in marmosets. Vision Research 47, 1228-1244.*
- Ts'o, D., Frostig, R., Lieke, E., Grinvald, A., 1990. Functional organization of primate visual cortex revealed by high resolution optical imaging. Science 249, 417-420.*
- Valverde Salzmann, M.F., Wallace, D.J., Logothetis, N.K., Schüz, A., 2011. Multimodal vessel mapping for precise large area alignment of functional optical imaging data to neuroanatomical preparations in marmosets. Journal of Neuroscience Methods 201, 159-172.*
- Vanzetta, I., 2006. Hemodynamic responses in cortex investigated with optical imaging methods. Implications for functional brain mapping. Journal of Physiology-Paris 100, 201-211.*
- Vanzetta, I., Grinvald, A., 2008. Coupling between neuronal activity and microcirculation: implications for functional brain imaging. HFSP Journal 2, 79-98.*
- Villeneuve, M.Y., Vanni, M.P., Casanova, C., 2009. Modular organization in area 21a of the cat revealed by optical imaging: comparison with the primary visual cortex. Neuroscience 164, 1320-1333.*
- Weber, B., Keller, A.L., Reichold, J., Logothetis, N.K., 2008. The Microvascular System of the Striate and Extrastriate Visual Cortex of the Macaque. Cerebral Cortex 18, 2318-2330.*
- White, L.E., Bosking, W.H., Fitzpatrick, D., 2001. Consistent mapping of orientation preference across irregular functional domains in ferret visual cortex. Visual Neuroscience 18, 65-76.*
- Wong-Riley, M.T., Norton, T.T., 1988. Histochemical localization of cytochrome oxidase activity in the visual system of the tree shrew: normal patterns and the effect of retinal impulse blockage. J Comp Neurol 278, 633-634.*
- Xu, X., Bosking, W., Sary, G., Stefansic, J., Shima, D., Casagrande, V., 2004. Functional Organization of Visual Cortex in the Owl Monkey. J. Neurosci. 24, 6237-6247.*
- Xu, X., Bosking, W.H., White, L.E., Fitzpatrick, D., Casagrande, V.A., 2005. Functional Organization of Visual Cortex in the Prosimian Bush Baby Revealed by Optical Imaging of Intrinsic Signals. Journal of Neurophysiology 94, 2748-2762.*

Tables

Case	Mean column peak distance of orthogonal orientation pairs (a=0-90°; b=30-120°; c=60-140°)	Mean pinwheel distance
1	a. 301.38 ± 79.77 μm (n=277) b. 306.78 ± 74.76 μm (n=343) c. 292.47 ± 79.61 μm (n=387)	155.56 ± 65.63 μm (n=372)
2	a. 287.85 ± 82.40 μm (n=400) b. 274.54 ± 81.83 μm (n=433) c. 282.93 ± 77.54 μm (n=394)	144.64 ± 63.83 μm (n=438)
3	a. 298.50 ± 85.93 μm (n=393) b. 293.78 ± 86.13 μm (n=446) c. 298.67 ± 91.90 μm (n=396)	158.40 ± 53.35 μm (n=452)
4	a. 299.81 ± 84.67 μm (n=296) b. 299.24 ± 84.55 μm (n=393) c. 279.85 ± 85.80 μm (n=378)	143.02 ± 48.95 μm (n=461)
Average	292.98 ± 82.90 μm	150.41 ± 57.94 μm

Table 1 Distance measurement of functional columns

Figures

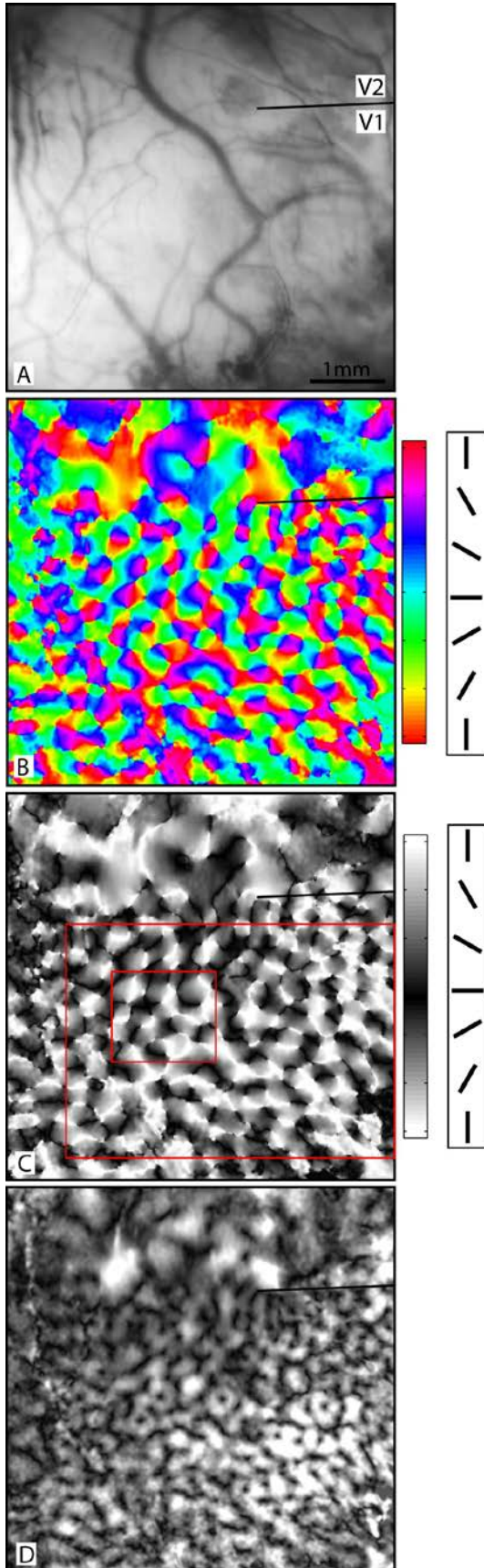


figure 1.

Optical imaging of the topographic organization of orientation preference. (A) Vessel pattern of the imaged area. (B) Angle map of orientation preference. Iso-orientation domains corresponding to different stimulus angles are coded by an RGB colour map (right). (C) Same map as in (B) but coded by an achromatic colour map. Large red rectangle indicates ROI seen in figure 2. Small red rectangle shows ROI seen in figure 4. (D) Orientation-magnitude map of the orientation preference. Dark regions (fractures) indicate low orientation preference.

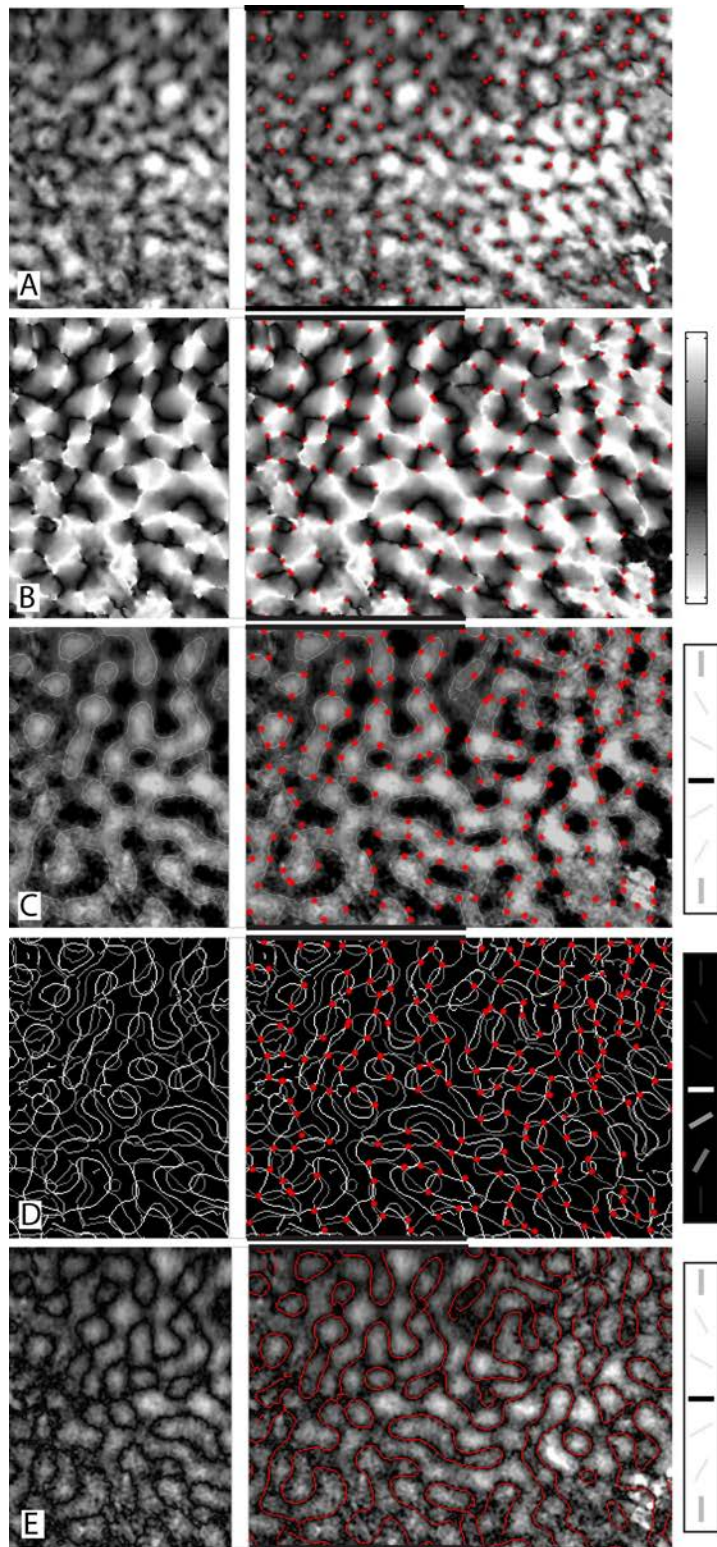


figure 2.

Correlation between pinwheel centres and functional column borders. A comparison between different maps and the positions of pinwheel centres is given. Left side = map without and right side = map with superimposed pinwheel centres (red dots). (A) The orientation-magnitude map of orientation preference shows a strict correlation between pinwheel centres and regions of low orientation preference. (B) demonstrates the increased visibility of pinwheel positions in achromatic orientation-angle maps. (C) Differential map of two orthogonal orientation responses. The canny contours of the activated regions are superimposed in white. Pinwheel centres show a strict correlation with the column borders. (D) Superimposed column contour maps of six different orientation responses. Pinwheel centres are located at points where the contours of different orientation responses intersect. (E) Absolute map of a single differential map (same as in (C)). Column contours (of (C)) calculated with an edge detection algorithm are shown in red.

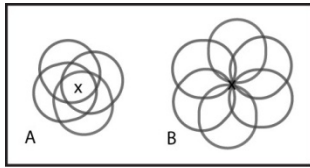


figure 3.

Theoretical arrangement of orientation columns in pinwheels. Scheme in (A) shows a diffuse or random arrangement of orientation selective cells in or near pinwheel centres resulting in a planar overlap of functional columns. (B) demonstrates an accurate separation of functional columns at pinwheel centres.

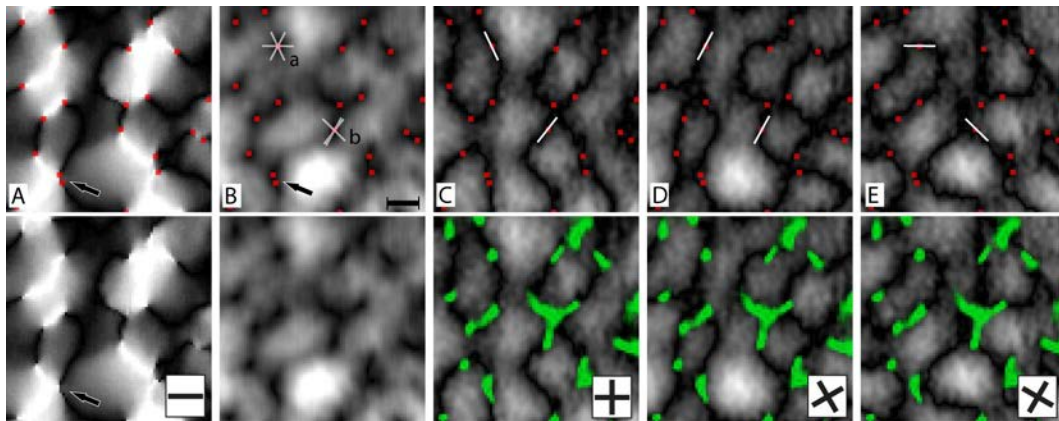


figure 4.

Correlation between orientation preference magnitude and column border intersections. Pinwheel centres are marked by red dots. (A) shows a ROI of an achromatic orientation-angle map. Iso-orientation domains corresponding to a horizontal stimulus angle are coded in black. The position of a pinwheel pair is marked by an arrow. (B) Orientation-magnitude map of orientation preference. Scale bar= 80 μm . (Ba) marks a circular fracture that is formed by radially intersecting column borders. (Bb) marks an elongated fracture formed by a segmental overlap of two column borders (compare with white contour lines in C-E). (C, D, E) show the three absolute maps of the six differential maps. Regions of low orientation preference taken from (B) are superimposed (in green) to show the amount of segmental overlap of the three column contours (black lines) and the orientation-magnitude fractures. Calculating the sum of the absolute maps in (C, D, E) results in a map that shows the same fracture pattern as seen on the orientation-magnitude map shown in (B).

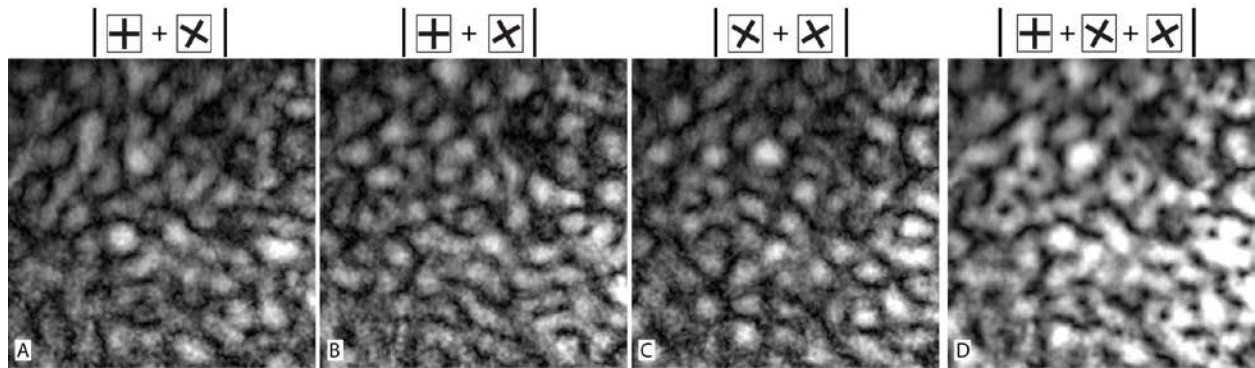


figure 5.

Formation of low orientation preference magnitude fractures. (A, B and C) show the sum of the absolute maps of two differential maps. Fractures indicate regions where the column border of the two differential maps segmentally overlap. (D) shows the sum of all absolute maps.

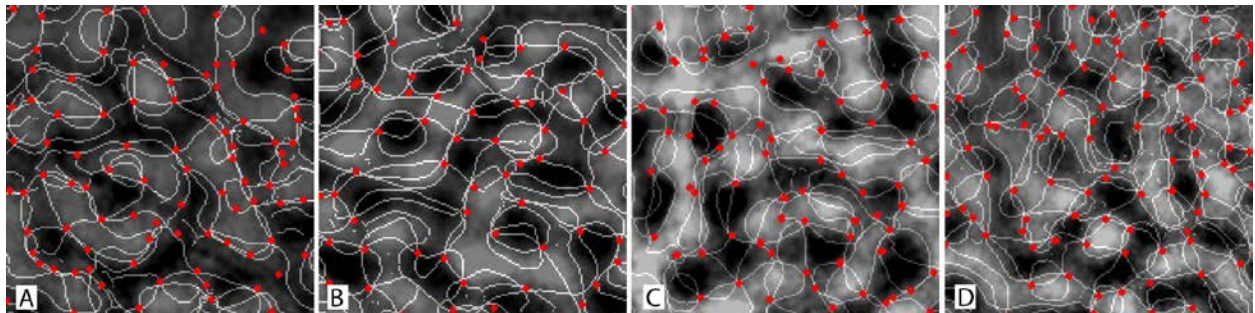
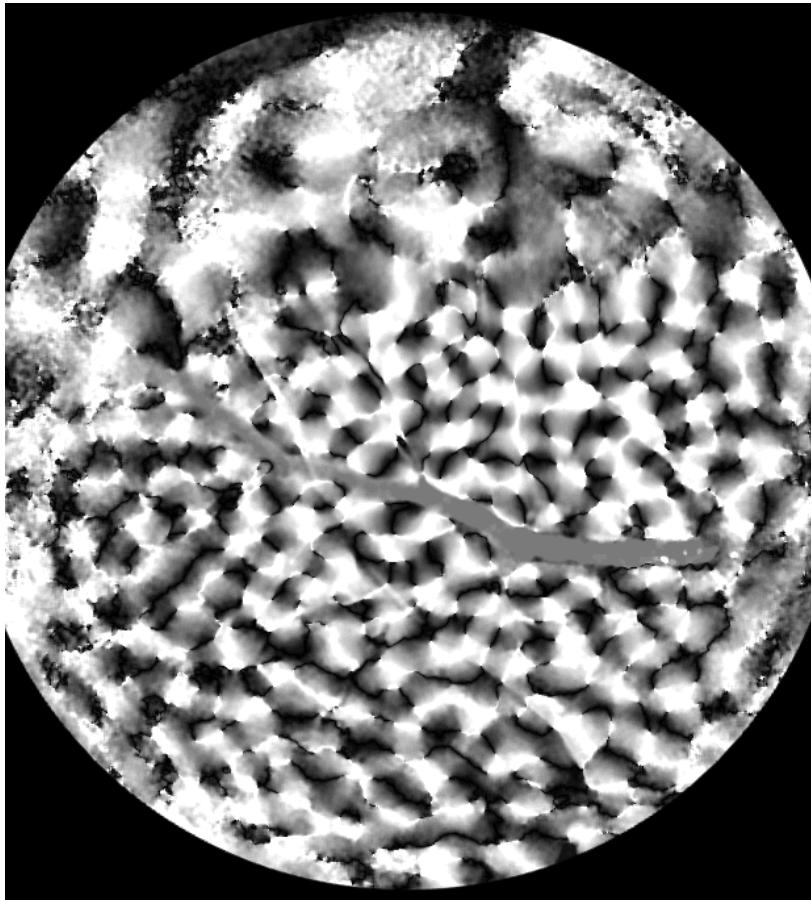


figure 6.

Spatial correlation of pinwheel centres, functional columns and column borders. (A, B, C and D) show examples of the spatial correlation for four different animals. Pinwheel centres are marked by red dots. Contour lines of all orientation responses are superimposed on one out of six (randomly selected) differential maps of a single orientation response.



movie 1.

Animated series of achromatic angle maps. See Pinwheel detection for details.

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Studie: *Multimodal Vessel Mapping for Precise Large Area Alignment*

Wie in Kapitel 4.1 beschrieben, besteht in Studien, in denen funktionale Daten histologischen Strukturen zugeordnet werden, eine grundlegende Schwierigkeit darin, eine ausreichend hohe Genauigkeit der Zuordnung zu gewährleisten. Ein Ziel bei der Alignierung muss daher darin liegen, die Größe des Zuordnungsfehlers kleiner zu halten als die Größe der zu untersuchenden Strukturen. Andernfalls ist eine verlässliche Zuordnung zueinander nicht gegeben, und beeinträchtigt so die Korrelation von funktionellen und anatomischen Strukturen (siehe Polimeni et al. (2005)).

Die grundlegenden Fehlerquellen bei solchen Alignierungen liegen zum einen in Verzerrungen und Schrumpfungprozessen, die während der histologischen Aufbereitung des neuronalen Gewebes zu Abweichungen in der räumlichen Anordnung von Strukturen führen. Zum anderen ist die Zuordnung von Landmarken (in der Regel Blutgefäßstrukturen), die in den funktionellen Daten sichtbar sind, zu ihren Gegenstücken in den histologischen Präparaten aus mehreren Gründen schwierig.

In intrinsischen Optical-Imaging-Studien wird in der Regel zusätzlich zu den Aufnahmen bei Rotlicht ein Bild von dem Aufnahmebereich unter Grünlicht-Beleuchtung gemacht, das die oberflächigen Blutgefäßnetze deutlich hervortreten lässt. Mit dieser Grünlicht-Blutgefäßkarte lassen sich dann die intrinsischen Signale aus den Rotlichtkarten mit den Positionen von vertikal verlaufenden Blutgefäßen in Relation setzen. Anhand dieser lassen sich wiederum die Gefäßanschnitte in den histologischen Präparaten zuordnen, und so wird eine räumliche Zuordnung der Schnitte zu der Blutgefäßkarte und damit zu den intrinsischen Signalkarten erreicht.

Obwohl vor Beginn eines Optical-Imaging-Experiments die Kamera so zur Kortexoberfläche ausgerichtet wird, dass die optische Achse des Kamerasystems möglichst senkrecht zur Kortexoberfläche steht, verlaufen - aufgrund der natürlichen Krümmung des Kortex - die vertikalen Gefäße (und auch die vertikal verlaufenden funktionellen Kolumnen) nicht zwangsläufig parallel zur optischen Achse. Das heißt, dass die Zuordnung von tieferliegenden Gewebeschnitten zu den oberflächigen Gefäßpositionen grundsätzlich eine Fehlpositionierung beinhaltet, solange der Einfluss der Achsenneigung nicht bestimmt und korrigiert wird.

Hinzu kommt, dass die Fokusebene der Kamera normalerweise vor Beginn der Rotlichtaufnahmen auf eine Tiefe von 300-400µm eingestellt wird, um den Einfluss der oberflächigen Blutgefäße auf das intrinsische Signal zu reduzieren, die ansonsten zu einer starken Artefaktbildung in den Signalkarten führen.

Diese Defokussierung im Zusammenspiel mit der geringen Dicke der Fokusebene hat aber zur Folge, dass vor allem die tiefer liegenden Abschnitte der funktionellen Kolumnen zur Signalbildung beitragen und diese wiederum bei ihrer Abbildung in der 2-dimensionalen Kartenebene eine Abweichung relativ zu ihrem oberflächigen Ursprung erfahren. Letztendlich wirken so bei der Alignierung von intrinsischen Signalen und histologischen Strukturen eine Reihe von Messfehlern additiv zusammen.

In den Untersuchungen zu den vorliegenden Arbeiten ist deutlich geworden, dass diese Einflüsse in der einschlägigen Literatur unterschätzt werden und selten eine Quantifizierung oder auch nur eine Diskussion dieser Fehlereinflüsse erfolgt.

Um eine solche Quantifizierung der Fehler zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit zuerst eine Alignierung nach einer herkömmlichen Methode - anhand von Blutgefäßzuordnungen – vorgenommen und das Ergebnis mit dem einer Alignierung, bei der Gewebeverzerrungen rechnerisch korrigiert wurden, verglichen.

Zur Korrektur der Gewebeverzerrungen wurde eine Blutgefäßfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) eingesetzt. Der Farbstoff wird dabei in eine Gelatinelösung gegeben, mit der das Blutgefäßsystem der Versuchstiere nach Versuchsende (*post mortem*) perfundiert wird. Nachdem die Gelatine im Lumen der Gefäße ausgehärtet ist (und dadurch den physiologischen Zustand des Lumens während der weiteren histologischen Prozessierung konserviert), lässt sich das oberflächige Gefäßsystem des untersuchten Hirnbereiches im Auflicht-Mikroskop darstellen. Nach McLoughlin und Blasdel (1998) werden allein 40% der Kortexoberfläche von Blutgefäßen eingenommen, die einen Durchmesser von über 50µm haben. Die Auflösung, die bei der mikroskopischen Aufnahme der Oberflächengefäße erreicht wird, lässt die Darstellung von kleinsten Gefäßen bis herunter auf die Kapillarebene zu, so dass sich eine detaillierte Karte der Oberflächengefäße erstellen lässt. Diese FITC-Gefäßkarte bildet einen wichtigen Zwischenschritt, da sie als eine Art Eichschablone bei der Alignierung der Grünlicht-Blutgefäßkarten und der histologischen Gewebeschnittpräparate genutzt werden kann.

Da die Gefäßfärbung durch vorsichtiges Prozessieren der Gewebeschnitte während der histologischen Aufarbeitung erhalten bleibt, können zusätzlich zu den eigentlichen Färbungen (wie etwa CytOx oder Antikörperfärbungen) auch die Gefäßverläufe in den einzelnen Gewebeschnitten dargestellt werden. Die Gefäßverläufe bzw. Gefäßanschnitte in den Schnitten werden als Landmarken eingesetzt, um jeden der Schnitte mit der FITC-Gefäßkarte abzugleichen und vorhandene Verzerrungen rechnerisch zu korrigieren. Letztendlich kann so eine 3-dimensionale Rekonstruktion des geschnittenen und gefärbten Kortexareals angefertigt werden, die es erlaubt, Aussagen über den Verlauf der vertikalen Gefäße sowie der histologisch gefärbten Strukturen innerhalb der Kortexschichten darzustellen und so eine Abweichung mit zunehmender Tiefe zum oberflächigen Ursprung zu bestimmen.

Durch den Vergleich der weiterentwickelten Methode mit der herkömmlichen Methode zeigt sich, dass bei dem Alignierungsverfahren, bei dem die Kortexkrümmung nicht mit in Betracht gezogen wird, Gefäßpositions-Abweichungen zum oberflächigen Gefäßursprung von durchschnittlich 150 bis 300µm unkorrigiert bleiben. Diese Abweichung ist beträchtlich, bedenkt man, dass beispielsweise Orientierungskolumnen in Optical-Imaging-Karten von Weißbüschelaffen einen Durchmesser von durchschnittlich 280µm zeigen (siehe Kapitel 4.3.).

Der Einfluss dieses Fehlers und die Relevanz der hier vorgestellten, verbesserten Methode wird an einem weiteren Fallbeispiel besonders deutlich, für das einige Ergebnisse der in Kapitel 4.2 vorgestellten Arbeit herangezogen werden sollen. In einer der ersten Studien, in denen Blobs durch die Optical-Imaging-Technik in Makaken dargestellt werden konnten, messen Landisman und Ts'Ö (2002) eine

Abweichung der funktionell dargestellten Blobs und ihrer CytOx-gefärbten Gegenstücke von $\sim 200\mu\text{m}$ (Zentrumsabstände). Damit liegt der Alignierungsfehler in dieser Studie in der gleichen Größenordnung wie der durchschnittliche Blobdurchmesser in Makaken (Horton, 1984). Hingegen finden wir in den Daten unserer Farbwahrnehmungs-Studie an Weißbüschelaffen bei der Alignierung von funktionell dargestellten Blobs und den CytOx-gefärbten Blobs eine Abweichung von nur $80\mu\text{m}$. Die Reduktion der Fehlergröße um mehr als die Hälfte resultiert zum Teil aus den Maßnahmen zur Korrektur der Gewebeverzerrungen. Zudem wurde der aber auch Einfluss der Achsenneigung ausgeglichen, indem eine Mittelung der CytOx-Färbedichte über mehrere Schnittpräparate der oberen Schichten hinweg vorgenommen wurde und so die relativen Blobzentrumspositionen den Bedingungen der intrinsischen Signalkartenerstellung angeglichen werden konnten. Die Achsenneigung selbst wurde anhand der Blutgefäßverläufe in der 3D-Rekonstruktion ermittelt. Die Werte, die hier für die durchschnittliche Abweichung eines Gefäßanschnitts der unteren Schichten 2/3 zu seinem oberflächigen Ursprung gefunden wurden, liegen bei $360.03 \pm 286.77\mu\text{m}$ und $161.10 \pm 118.84\mu\text{m}$ und sind damit um einen Faktor 3-7 grösser als der Abweichungsfehler, der in einer Studien von Roe et al. (2005) angenommen wird.

5.2 Ergebnisse der Studie: Color Blobs in Cortical Areas V1 and V2 of Marmosets

Dass Blobs durch Farbreize aktiviert werden, konnte bisher nur in Optical-Imaging-Studien an Makaken nachgewiesen werden. In zwei vorherigen Studien an Weißbüschelaffen war es nicht gelungen, eine Farbblobaktivierung nachzuweisen (Roe et al., 2005; Buzás et al., 2008). Die *in vivo*-Darstellung der Farbblobs ist jedoch eine wichtige Voraussetzung für detaillierte Untersuchungen des Zusammenhangs von Funktion und der anatomischen Architektur von V1. Zum einen erlaubt diese Technik, die Alignierungs-Problematik zu umgehen und dadurch mit hoher räumlicher Genauigkeit die kortikale Aktivierung von Blob- und Interblobkompartimenten durch verschiedene Reizmodalitäten zu untersuchen. Zum anderen ermöglicht die *in vivo*-Blobdarstellung, gezielte Ableitungen mittels Elektroden oder auch Injektionen von Farbstoffen in Blob- oder Interblobkompartimenten durchzuführen, um so die anatomische Architektur der thalamo-kortikalen und kortiko-kortikalen Informationspfade von V1 untersuchen zu können.

Mit diesem Hintergrund testeten wir in mehreren Weißbüschelaffen zuerst die an Makaken etablierten Stimulus Protokolle zur Blobdarstellung, bei denen eine farbspezifische Blobaktivierung aus der Differenz der Aktivierungsmuster von chromatischen und achromatische Strichreizen berechnet wird (siehe Differenzkarten, Kapitel 3.2.). Wie in den Vorgängerstudien konnten jedoch auf diesem Wege auch hier keine blobspezifische Aktivität nachgewiesen werden. In Anlehnung an die autoradiographische 2-DG Studie von Tootell et al. (1988), in der - ebenfalls in Makaken - eine spezifische Blobaktivierung mittels geflickerter Gegenfarben erreicht wurde, testeten wir farbige und achromatische Flickerreize.

Die von uns verwendeten Reize bestanden aus schnell aufeinander folgenden (1.5Hz) Vollbild-Farbdarstellungen von Gegenfarbenpaaren, z.B. Rot/Grün, oder Blau/Gelb. Um die Stärke der kortikalen Aktivierung durch einzelne Farben zu testen und zudem einen Test auf eine topographische

Repräsentation von Farbe in V1 und V2, wie sie in Makaken gezeigt wurde (Xiao et al., 2003; Xiao et al., 2007), durchzuführen, wurden den Tieren zusätzlich Flickerreize gezeigt, bei denen ein einzelner Farbton (z.B. Rot, Grün, Blau, Gelb) gegen einen isoluminanten Grauton geflickert wurde.

Außerdem wurden achromatische Schwarz/Weiß-Flickerreize gezeigt, um die Aktivierungsmuster, die durch Helligkeitsunterschiede gebildet werden, mit den durch Farbreize hervorgerufenen Aktivierungsmustern vergleichen zu können.

Drei adulte weibliche Weißbüschelaffen wurden für diese Experimente untersucht. Bei allen Tieren konnte durch die Sequenzierung der entsprechenden Abschnitte des Genoms gezeigt werden, dass sie über jeweils eines der entsprechenden Allele für einen M- und L- Photorezeptortypus (M543, L₁556 oder L₂563) verfügen und damit Trichromaten, also voll farbsichtig sind. Das genetische *Profiling* wurde von unserem Kooperationspartner Adrian Streit am Max Planck Institut für Entwicklungsbiologie Tübingen durchgeführt.

In den visuellen Kortizes der drei Tiere konnten mittels der Optical-Imaging-Technik und unter Verwendung der oben genannten Farbreize abgegrenzte kolumnenartige Bereiche dargestellt werden, die selektiv durch die Farbreize aktiviert wurden und das typische Verteilungsmuster der CytOx-Blobs aufwiesen.

Vor allem Rot/Grün-Flickerreize führten zu einer starken Aktivierung dieser Bereiche. Blau/Gelb-Flickerreize zeigten eine schwächere Aktivierung derselben Bereiche. Rot/Grau- und Blau/Grau-Flickerreize führten zu einer ähnlich starken Aktivierung wie Rot/Grün- und Blau/Gelb-Reize. Gelb/Grau- und Grün/Grau-Reize führten zu keiner spezifischen Aktivierung der farbselektiven Bereiche. Schwarz/Weiß-Reize führten zu einer homogen verteilten Aktivierung des gesamten V1 Areals ohne erkennbare Musterbildung.

Für die farbspezifischen Bereiche in V1 konnte unter Verwendung der weiterentwickelten Alignierungsmethode (siehe Kapitel 4.1.) gezeigt werden, dass sie mit den CytOx-Blobs zusammenfallen, die funktionell dargestellten Bereiche folglich eine Repräsentation der anatomischen CytOx-Blobs sind. Für die Blobs in den funktionellen Daten wurden von uns Zentrumsabstände von 404-448µm gemessen. Die Messung der Zentrumsabstände der CytOx-Blobs in den histologischen Präparaten ergab einen Wert von 416-417µm.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die durch die Farbreize aktivierten Bereiche in V2 mit den dünnen Streifen (*Thin stripes*) in den CytOx-Färbungen zusammenfallen. Diese liegen in Abstände von ~2-2.5mm zueinander.

Durch einen Vergleich der Intensitätsspektren der verwendeten Farbreize mit den Absorptionsspektren der retinalen Photorezeptorpigmente konnte gezeigt werden, dass die Rot/Grün-Flickerreize selektiv die L-M- Zellen aktivieren und damit zu einer spezifischen Aktivierung der parvozellulären Bahnen führen. Hingegen wurden durch die verwendeten Blau/Gelb-Reize anteilig auch L-M- Zellen aktiviert, so dass die Blobaktivierung, die durch die Blau/Gelb-Reize erreicht wurde, nicht allein auf eine Aktivierung der koniozellulären Bahnen zurückgeführt werden kann.

Des Weiteren wurden die farbspezifischen Aktivierungsmuster bei monokulärer und binokulärer Stimulation verglichen. Unter beiden Stimulations-Bedingungen wurden die gleichen Blobs aktiviert, so dass daraus geschlossen werden kann, dass Blobs in Weißbüschelaffen binokulär innerviert sind. Wären die Blobs in Weißbüschelaffen, wie es bei Makaken nachgewiesen wurde, monokulär innerviert, hätte sich zeigen müssen, dass bei monokulärer Reizung nur diejenigen Blobs welche dominierenden Einfluss eines Auges beziehen aktiviert werden. Dadurch sollte in den monokulären Konditionen nur etwa die Hälfte (jeder zweite) der Blobs nachweisbar sein, die sich in den Aktivitätskarten der binokulären Stimulationskonditionen zeigen (Lu und Roe, 2008).

Ebenfalls im Gegensatz zu vorherigen Studien an Makaken, konnten wir in den dünnen Streifen von V2 keine topographische Anordnung von Farbrepräsentationen nachweisen. Allerdings muss hierbei eingeräumt werden, dass in der vorliegenden Studie der Fokus des Kamerasystems auf V1 ausgerichtet war und die Fokusebene dadurch nicht optimal für die Aufnahme der schwachen Farbaktivierungen in den rostral liegenden V2-Bereichen eingestellt war. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Nachweis einer topographische Anordnung durch die suboptimalen Aufnahmebedingungen verhindert wurde.

5.3 Ergebnisse der Studie: *The Topology of Hemodynamic Responses to Orientation Stimuli in Orientation-Preference Pinwheels*

In dem überwiegenden Teil der Studien zu okulärer Dominanz in adulten Weißbüschelaffen konnten keine ODK nachgewiesen werden (McLoughlin und Schiessl, 2006). Nur vereinzelt wurden unregelmäßige ODK gefunden (Chappert-Piquemal et al., 2001; Roe et al., 2005). Es ist deshalb anzunehmen, dass die Ausbildung von ODK in Weißbüschelaffen ähnlich variabel ist, wie es von Adams und Horton für Totenkopffaffen gezeigt wurde (Adams und Horton, 2009). In den von uns für diese Studien untersuchten Weißbüschelaffen konnte ebenfalls kein Nachweis für ODK erbracht werden. ODK scheinen von zentraler Bedeutung für die Ausprägung von Pinwheels (Verteilungsmuster) innerhalb der topographischen Karten der Orientierungsselektivität zu sein. Zumindest in Makaken wurde durch mehrere Studien gezeigt, dass Pinwheels tendenziell entlang der Mittellinie der ODK positioniert sind woraus sich schließen lässt, dass zwischen beiden Strukturen ein Zusammenhang besteht, aus dem sich eventuell ein Hinweis auf die Funktion von pinwheelartigen Anordnungen der Orientierungskolumnen ergeben könnte. In diesem Zusammenhang ist es interessant, die Verteilung von Pinwheels in Orientierungskarten von Primaten wie z.B. Weißbüschelaffen zu untersuchen, bei denen keine ODK ausgebildet sind und daher eine Abhängigkeit zwischen okulärer Dominanz und Pinwheels wie in Makaken nicht vorkommen kann. Zu diesem Zweck haben wir die Position von Pinwheel-Zentren in den topographischen Orientierungskarten, die durch das Vektorsummations-Verfahren gewonnen wurden, bestimmt, da Pinwheel-Zentren bisher nur in diesen Kartentypen nachgewiesen werden konnten. Anschließend wurden die Positionen der Pinwheel-Zentren mit dem Verlauf der Umrisse bzw. Konturen der Orientierungskolumnen, wie sie in den Differenzkarten ausgeprägt sind, verglichen. Die Konturen wurden durch einen Kanten-Detektor-Algorithmus (Canny, 1986), der in Matlab (Matlab 2011b, MathWorks) implementiert ist, berechnet. Auf den ersten Blick scheint dieser Vergleich redundant, da die topographischen Orientierungskarten den Verlauf aller Orientierungskolumnen, aus denen die Karte

berechnet wird, enthalten und die Pinwheels und ihre Zentren aus der Anordnung der Orientierungskolumnen in der Karte hervorgehen. Jedoch gibt es einen entscheidenden Unterschied zwischen dem Verlauf der Orientierungskolumnen, die in den Differenzkarten ausgebildet sind, und dem Verlauf den sogenannten Iso-Orientierungs-Domänen, die durch die Orientierungskarten dargestellt werden. Die topographischen Orientierungskarten zeigen eine quasi kontinuierliche Abfolge von Orientierungspräferenzen, obwohl nur kortikale Aktivierungsmuster von (in diesem Fall) sechs verschiedenen Orientierungsreizen (30, 60, 90, 120, 150, 180) zu ihrer Berechnung verwendet wurden. Das heißt, dass durch das Vektorsummutations-Verfahren jedem Punkt (Pixel) der Karte eine Orientierungspräferenz zwischen Null und 180° Grad zugeordnet wird, die sich aus dem Verhältnis der Signalamplituden an der entsprechenden Position der sechs Einzelaufnahmen ergibt. Bei einem Großteil der so dargestellten Orientierungspräferenzen handelt es sich damit um interpolierte Reizantworten. Daraus ergibt sich, dass die Repräsentation einer einzelnen Orientierungspräferenz nur noch einen schmalen, länglichen Bereich wiedergibt, der in seiner Ausprägung wesentlich kleiner ist als der eigentliche signalgebende Bereich, wie er in der Einzelaufnahme gefunden wird. Durch die Differenzkarten Berechnung hingegen wird der natürliche Verlauf der signalgebenden Gewebereiche in den Einzelaufnahmen mit größerer Zuverlässigkeit wiedergegeben, da hierbei auf interpolierende Verfahren verzichtet wird.

Bei einem ersten Vergleich der Pinwheel-Zentrum-Positionen mit den Konturen der Orientierungskolumnen zeigte sich, dass Pinwheel-Zentren strikt entlang der Konturen ausgebildet werden. Diese Abhängigkeit war bis *dato* so nicht gezeigt worden und weist vor allem darauf hin, dass die Verteilung der Pinwheel-Zentren nicht zufällig ist, sondern in einem engen Bezug zu den Strukturen stehen muss, die zur Ausbildung von Orientierungskolumnen verantwortlich sind.

Des Weiteren konnten wir durch eine Überlagerung der Konturen, die aus allen 6 Differenzkarten resultieren (die Konturen der jeweils orthogonalen Differenzkarten Paare ergeben dieselben Verläufe, so dass aus 6 Differenzkarten nur 3 Konturkarten gewonnen werden), zeigen, dass Pinwheel-Zentren speziell an solchen Punkten ausgebildet sind, an denen sich die Konturlinien von mehreren Orientierungskolumnen in einem Punkt schneiden. Dies ist ein wichtiger Befund, da er die Ergebnisse einer 2-PM Studie bestätigt, in der gezeigt werden konnte, dass orientierungsselektive Zellen innerhalb eines Pinwheel-Zentrums, strikt nach ihrer Präferenz gruppiert, um das Zentrum herum angeordnet sind.

Die Pinwheel-Zentren fallen immer zusammen mit Bereichen in Orientierungskarten, die eine scheinbar schwache Orientierungsselektivität zeigen, sogenannten *fractures* (engl. Brüche, Risse) (Blasdel und Salama, 1986). Die Stärke der Orientierungsselektivität kann aus den Vektorsummutations-Karten berechnet werden, indem die Absolutwerte der Vektoren in einem Grauwertbild dargestellt werden. In solchen Karten werden die *fractures* als punktuelle oder längliche Bereiche in einem wurmstichartigen Muster sichtbar. Bisher war nicht klar, was diese Bereiche darstellen. Erste Vermutungen, dass sie durch eine generell schwache Reaktion der dort ansässigen Neuronen auf Orientierungsreize hervorgerufen werden, konnten durch elektrophysiologische Ableitungen (Maldonado et al., 1997) und 2-PM (Ohki et al., 2006) widerlegt werden. Eine zweite Erklärung für diese Bereiche ist, dass die dort liegenden Zellen auf alle Orientierungsreize gleich stark antworten, also orientierungsselektiv sind, aber keine

Orientierungspräferenz zeigen. Das sollte theoretisch zu sich überlappenden Orientierungskolumnen führen. Jedoch zeigen die von uns gewonnenen Konturkarten, dass solche Überlappungen in diesen Bereichen nicht vorkommen.

Bei der Aufbereitung der Differenzkarten zur Bestimmung der Konturen fanden wir heraus, dass durch die Berechnung der Absolutwerte der Differenzkarten neuartige -bisher nichtgezeigte- *fractures* dargestellt wurden, die erstaunlich genau den Verlauf der Konturen nachzeichnen. Diese *fractures* zeigen die Bereiche der Differenzkarten auf, in denen die jeweils zugehörigen Einzelaufnahmen gleich starke Signalamplituden aufweisen. Es ist noch vollkommen unklar, warum durch dieses Verfahren die Konturbereiche der Kolumnen derart genau wiedergegeben werden. Wenn jedoch die absoluten Werte der verschiedenen Differenzkarten aufsummiert werden, ergibt sich das gleiche Muster wie es durch die *fractures* der Vektorsummations-Karten ausgebildet wird. Analog zu den Konturen zeigt sich, dass die *fractures* der Vektorsummations-Karten an solchen Stellen gebildet werden, an denen sich die *fractures* der Differenzkarten überschneiden.

Das lässt zum einen den Schluss zu, dass es sich bei den *fractures* der Vektorsummations-Karten tatsächlich um Bereiche handelt, die in allen Reizkonditionen gleich stark aktiviert wurden. Jedoch sind diese Bereiche wesentlich kleiner, als man es z.B. von farbselektiven Kolumnen wie den Blobs erwarten würde (Horton, 1984; Landisman und Ts'o, 2002; Lu und Roe, 2008).

Zum anderen ist aber ebenso denkbar, dass die *fractures* dadurch entstehen, dass das intrinsische Signal -etwa Aufgrund der optischen Eigenschaften des Gewebes und des Aufnahmesystems sowie der räumlichen Ausprägung des versorgenden Gefäßnetzgebietes- nicht exakt die Position der ihm zugrundeliegenden neuronalen Aktivität wiedergibt, sondern eine größere Ausdehnung als diese zeigt.

Das direkte und scharf abgegrenzte Aneinanderliegen von Neuronenpopulationen (wie sie in der 2-PM Studie von Ohki et al. (2006) in Pinwheels gezeigt wurde) würde dadurch zu einer Überlappung des größer zeichnenden intrinsischen Signals führen und als Konsequenz daraus zur Ausbildung der vermeintlich schwachen Orientierungsselektivität in den Pinwheelzentren führen.

Es zeigt sich jedoch, dass mittels der intrinsischen Optical-Imaging-Technik allein nicht abschließend geklärt werden kann ob sich die Pinwheel-Zentren durch nichtorientierungsselektive Neuronenpopulationen bilden oder als Artefakt - bedingt durch die Auflösung der Technik und des intrinsischen Signals selbst - entstehen.

Jedoch lässt sich aus der Größe und dem Erscheinungsbild der *fractures* eine weitere mögliche Erklärung für die Pinwheel-Zentren Entstehung herleiten, nach der vaskuläre Strukturen die Basis für die Ausbildung von Pinwheel-Zentren bilden. Dieses Konzept wird in der Diskussion zu diesem Kapitel näher erörtert (siehe Kapitel 6.3.).

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Ergebnisse der Studie: *Multimodal Vessel Mapping for Precise Large Area Alignment*

Die neu entwickelte Methode zur Alignierung von histologischen und funktionellen Daten erfordert im Vergleich zu den herkömmlichen Verfahren einen gewissen praktischen Mehraufwand. Zugleich ermöglicht sie jedoch, die Alignierung von großen Gewebebereichen auch ohne die zusätzliche Einbringung von invasiven Markern wie Läsionen oder Farbstoffinjektionen durchzuführen und so die dadurch eingebrachten Artefakte zu vermeiden. Zudem erlaubt die neue Methode eine Quantifizierung des Einflusses der Kortextrümmung auf die Alignierung und ermöglicht, zudem eine Einschätzung der Ausbreitung von histologischen Strukturen innerhalb der Tiefe der oberflächennahen Kortexschichten vorzunehmen.

Das ist das erste Mal, dass eine derartige Quantifizierung der Fehlergrößen in einer Alignierungsstudie durchgeführt wurde. Die Unterschiede zwischen den nicht korrigierten und den anhand der FITC-Blutgefäßschablone korrigierten Alignierungen machen deutlich, dass mit den herkömmlichen Alignierungsverfahren weit größere Positionsabweichungen auftreten, als im Vorhinein erwartet wurde. Zudem konnten wir durch die 3D Rekonstruktion der Verläufe von vertikalen Blutgefäßen zeigen, dass die Annahmen früherer Studien zur Positionsabweichung bei zunehmender Kortextiefe eine zu geringe Fehlergröße veranschlagten.

Dadurch wird deutlich, wie wichtig eine sorgfältige Bestimmung der Fehlergrößen für eine zuverlässige Zuordnung von funktionellen Signalen zu histologischen Strukturen ist. Zudem zeigen unsere Ergebnisse, dass die Fehlergrößen nur schwer generalisierbar sind und daher eine individuelle Bestimmung der Fehlergröße in jedem einzelnen Fall notwendig ist, um gesicherte Aussagen über räumliche Zusammenhänge vornehmen zu können.

Das von uns entwickelte Methodenprotokoll bietet diese Möglichkeiten und ist prinzipiell mit einer Vielzahl von weiteren histologischen und funktionellen Methoden (vor allem unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen) kombinierbar. Die hohe Präzision die dieser Ansatzes bietet, ermöglicht z.B. die Topographie von funktionellen Signalen mit dem Verlauf von Axon- oder Dendritenbäumen von einzelgefärbten Zellen zu vergleichen (wie z.B. in Karube und Kisvárdy, 2011). Zudem erlaubt er im speziellen den Zusammenhang zwischen den Eingangsbereichen der koniozellulären Afferenzen (die mittels Antiköpernachweisen gegen Kalziumbindende-Proteine wie etwa Calbindin, Parvalbumin oder Calretinin gezeigt werden können) und der Ausbildung von funktionellen Domänen zu untersuchen, etwa um eine Relation zwischen der Verteilung der Blobs und der Aktivierungsmuster die durch Blau/Gelb-Farbreize hervorgerufen werden zu untersuchen (siehe Buzás et al., 2008, oder Hashemi-Nezhad et al., 2008). Aber auch der akkurate Abgleich mit anderen volumetrischen Datensätzen, die z.B. aus anatomischen oder funktionalen MRT-Messungen resultieren, wird durch diesen Ansatz stark vereinfacht, wie in einer Vorabstudie (siehe Valverde Salzman et al., 2011) gezeigt werden konnte (siehe auch Bild 13).

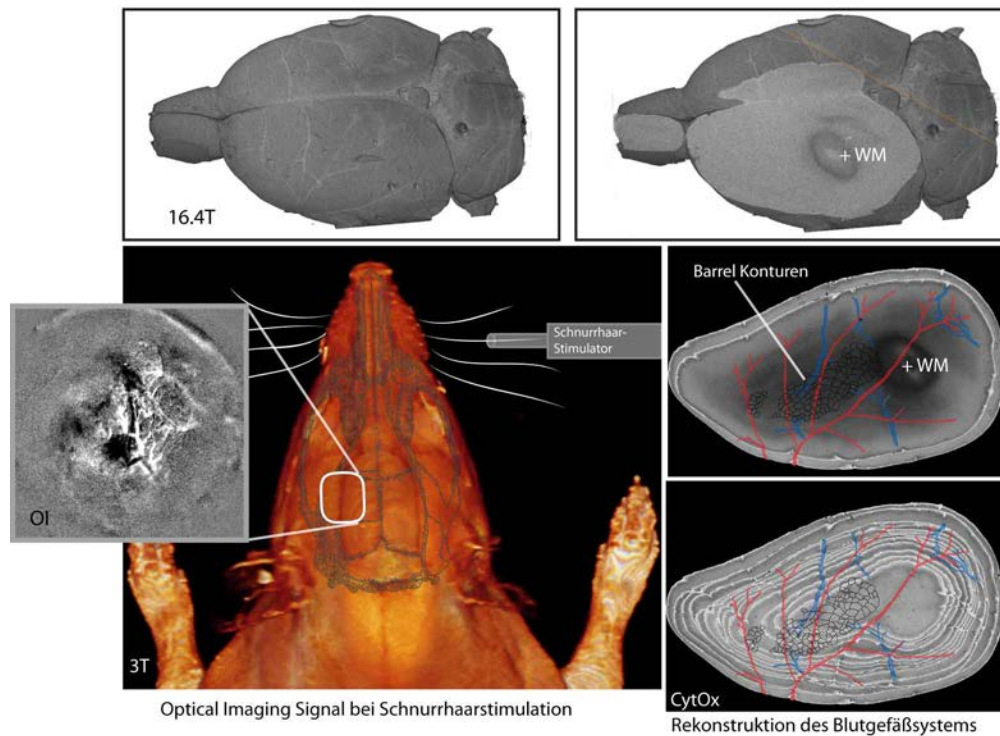


Bild 13. Alignierung von volumetrischen MRT-Daten und 3D-Rekonstruktion von histologischen Schnittpräparaten. Durch den Einsatz von Kontrastmitteln und Fluoreszenzfarbstoffen lässt sich das Oberflächen-Blutgefäßmuster sowohl im hoch aufgelösten MRT Scan (oben) als auch in der histologischen 3D-Rekonstruktion (rechts) und Optical-Imaging-(OI)-Karten (links) zeigen und für eine präzise Überlagerung der Datensätze verwenden. Details siehe Valverde Salzman et al. (2011).

6.2 Diskussion der Ergebnisse der Studie: *Color Blobs in Cortical Areas V1 and V2 of Marmosets*

Neuweltaffen werden aufgrund der bekannten Dichotomie ihres Farbsystems als eine frühe Entwicklungsstufe der Primaten angesehen, die den Übergang vom farbenblinden (Dichromaten) zum voll farbsichtigen Primaten (Trichromaten) repräsentiert (Roe et al., 2005). Bisher war unklar, ob Blobs in Weißbüschelaffen oder anderen Neuweltaffen durch Farbreize aktiviert werden bzw. bei der Wahrnehmung von Farbe eine ähnliche Funktion einnehmen, wie es für die Blobs in Makaken nachgewiesen wurde. In den trichromatischen Makaken konnte schon früh von Livingstone und Hubel durch elektrophysiologische Ableitungen gezeigt werden, dass Zellen in den Blobs hauptsächlich auf Farben reagieren (Livingstone und Hubel, 1984). Vor allem Gegenfarbenreize Rot/Grün und Blau/Gelb führten zu einer Aktivierung der Nervenzellen in Blobs. Dabei zeigte sich, dass in manchen Blobs vornehmlich solche Zellen vorkamen, die auf Blau/Gelb-Reize reagierten, und andere Blobs vermehrt über Rot-Grün-selektive Zellen verfügten (Livingstone und Hubel, 1984). Der Nachweise für eine *in vivo* Blobaktivierung durch Farbreize war durch bildgebende Untersuchungsverfahren bisher nur mittels der

Optical-Imaging-Technik - und ausschließlich in Makaken gelungen (Landisman und Ts'o, 2002; Xiao et al., 2007; Lu und Roe, 2008). In diesen Studien wurden Gegenfarbenstrichmuster und gleichorientierte achromatische Strichmuster getrennt gezeigt, um dann durch ein Differenzverfahren aus den Aktivierungen der beiden Reize die farbspezifische Aktivität zu isolieren (siehe auch Kapitel 4.2.). Allerdings zeigte sich in diesen Studien übereinstimmend, dass sich Blobs hauptsächlich durch Rot/Grün-Reize darstellen lassen, nicht aber – oder nur unzuverlässig - durch Blau/Gelb-Reize. Damit machten diese Ergebnisse die Erwartung der Autoren der Landisman und Ts'O (2002) Studie zunichte, durch Blau/Gelb-Reize die durch anatomische Studien nachgewiesenen Verbindungen zwischen Blobs und den koniozellulären Schichten des LGN bestätigen zu können.

In zwei neueren Optical-Imaging-Studien von Roe et al. (2005) und Buzás et al. (2008) an Weißbüschelaffen wurde untersucht, ob sich Blobs in Krallenaffen auch durch Farbstimuli nachweisen lassen. Sowohl Buzás et al. als auch Roe et al. führten diese Untersuchungen an männlichen, also dichromatischen Weißbüschelaffen mittels Gegenfarben-Strichreizen (Rot/Grün und Blau/Gelb) durch. Während Roe et al. versuchten, über das Differenzverfahren, wie es in Makaken erfolgreich verwendet wird, eine farbspezifische Aktivierung nachzuweisen, versuchten Buzás et al. blobartige Aktivierungsmuster direkt in den Aktivitätskarten der Einzel-Konditionen nachzuweisen. In beiden Studien konnte keine spezifische Blobaktivierung nachgewiesen werden. Buzás *et al.* denen es (ähnlich wie Landisman und Ts'O (2002)) vornehmlich darum ging, die funktionellen Verbindungen der Blobs mit den koniozellulären Bahnen zu untersuchen, schlossen daraus, dass die Projektionen des koniozellulären Systems nach V1 entgegen den Ergebnissen der anatomischen Studien nicht ausschließlich die Blobs innervieren, sondern einen homogen verteilten Einfluss ausüben.

Die von uns gefundenen Zusammenhänge lassen jedoch die Ergebnisse der Buzás et al. (2008) Studie in manchen Punkten fraglich erscheinen.

In Übereinstimmung mit Optical-Imaging-Experimenten am Makaken (Landisman und Ts'o, 2002; Lu und Roe, 2008) und anatomischen sowie elektrophysiologischen Experimenten an Weissbüschelaffen (Solomon, 2002; Blessing et al., 2004) weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Blobs in trichromatischen Weißbüschelaffen einem starken Einfluss durch das parvozelluläre System unterliegen und dass dieser Einfluss durch direkte Verbindungen der parvozellulären Schichten mit den Blobs, wie sie in manchen Studien nachgewiesen wurden, etabliert wird.

Die schwache, aber nicht signifikante Aktivierung durch Blau/Gelb-Reize, die wir in unseren Tieren finden, lässt darauf schließen, dass durch modifizierte Blau/Gelb-Stimuli, die eine selektivere Aktivierung der S und M+L Rezeptoren erreichen, sowie eventuell zusätzlich über die Mittelung größerer Datenmengen, durchaus eine Aktivierung der Blobs durch Stimulation der koniozellulären Bahnen möglich ist. Jedoch wird sich das nur durch weitere Experiment klären lassen. Durch unsere Vorabexperimente, in denen ebenfalls chromatische Stimuli eingesetzt wurden, scheint jedoch klar, dass durch chromatische Strichmuster vor allem eine starke Reizantwort auf die Orientierung des Reizes ausgelöst wird, die das schwache farbspezifische Signal überdeckt. Die in der Buzás et al. (2008) Studie gezeigten hohen Signalamplituden, die durch ihre chromatischen Strichreize erzeugt werden, entsprechen etwa den ebenfalls gezeigten Signalamplituden der achromatischen Strichreize. Hingegen

zeigt sich in unseren Daten, dass durch Farbflicker wesentlich schwächere Signalamplituden ausgebildet werden als durch achromatische Strichreize. Dies ist ein deutliches Indiz dafür, dass die Verwendung von chromatischen Strichmustern vor allem zu einer starken Antwort auf die Orientierung des Reizes führt und daher solche Stimulusprotokolle für Untersuchungen von farbspezifischen Reizantworten ungeeignet sind.

Die Ergebnisse unserer Studie bieten den erste Nachweis für eine farbspezifische Aktivierung der Blobs in Neuweltaffen und legen damit nahe, dass das visuelle System zur Farbwahrnehmung in trichromatischen Weißbüschelaffen ähnlich wie das von Altweltaffen bzw. von Makaken aufgebaut ist. (Tootell et al., 1988; Tootell und Hamilton, 1989; Landisman und Ts'o, 2002; Tootell et al., 2004; Lu und Roe, 2008). Durch die von uns gefundenen Stimulusprotokolle zur Darstellung der Blobs mittels intrinsischem Optical-Imaging eröffnen sich zudem nun zahlreiche experimentelle Möglichkeiten, um die Unterschiede zwischen den Sehsystemen von dichromatischen und trichromatischen Primaten im direkten Vergleich zu untersuchen und so weitere Aufschlüsse über die Entwicklung des Farbsehens in Primaten zu erlangen.

6.3 Diskussion der Ergebnisse der Studie: *The Topology of Hemodynamic Responses to Orientation Stimuli in Orientation-Preference Pinwheels*

Aufgrund der MRT-Technik hat sich in den letzten Jahren der Fokus bei der Analyse des intrinsischen Signals in Optical-Imaging-Studien verschoben. Dadurch, dass MRT-Untersuchungen eine Darstellung der Hirnaktivität im gesamten Gehirn erlauben ohne dabei auf invasive bzw. chirurgische Techniken angewiesen zu sein, hat sich die Anzahl der fMRT-Studien in den letzten Jahren enorm gesteigert. Gleichzeitig stieg das Interesse daran zu verstehen, wie das haemodynamische Signal, das sowohl bei der fMRT-Technik als auch in intrinsischen Optical-Imaging-Studien der Hauptsignalgeber ist, aufgebaut ist bzw. ausgebildet wird. Um diesen Zusammenhang zu klären, wird in zunehmend mehr Studien ein auf der intrinsischen Optical-Imaging-Technik basierendes spektroskopisches Verfahren angewandt, bei dem mittels mehrerer Wellenlängen (2-3) die Untersuchung der einzelnen Komponenten des haemodynamischen Signals wie Blutflußänderungen, Blutvolumenänderungen, sowie des relativen Verhältnisses von oxigeniertem zu deoxigeniertem Blut, durchgeführt werden kann. Während man in den Anfangsjahren der Optical-Imaging-Technik (~1975- 2000) darauf bedacht war zu zeigen, dass die Technik ein ähnlich hohes räumliches Auflösungsvermögen (~50µm; Vanzetta und Grinvald, 2008) der neuronalen Aktivität leisten kann wie vergleichbare elektrophysiologische Untersuchungen (Swindale et al., 1987), rückt in den letzten Jahren die Architektur des Blutgefäßsystems als signalbestimmende Entität in den Fokus der Forschung. Und während einige Studien versuchen, die physikalische Genauigkeit des intrinsischen Optical-Imaging-Signals anhand der Eigenschaften seiner optischen Komponenten und der Lichtbrechung im Gewebe zu bestimmen (*point spread*) (Polimeni et al., 2005; Bien et al., 2007), ist der Ansatz neuerer Studien, die Auflösung des haemodynamischen Signals selbst zu bestimmen, indem die räumliche minimal-Ausbreitung des intrinsischen Signals gemessen und mit der Dichte und der Verteilung von Blutgefäßen abgeglichen wird (Harrison et al., 2002; Berwick et al., 2008). Die Idee dahinter ergibt sich aus Modellen zur Entstehung der haemodynamischen Antwortfunktion, nach der, durch neuronale Aktivität getriggert, lokale vaskuläre Steuerungsmechanismen den Zufluss

und Abfluss von oxigeniertem und deoxigeniertem Blut im Bereich des Aktivitätslocus regulieren. Theoretisch reicht zur Versorgung eines kolumnenartigen Aktivitätslocus eine Versorgungseinheit, bestehend aus a) einer einzelnen Blut zuführenden Arteriole, b) davon ausgehenden Kapillaren, von denen die aktivierten Neuronen den Sauerstoff rekrutieren, c) einer Blut abführende Venole, und d) eine Reihe von vaskuläre *Shunts*/Ventilen (bestehend aus glatter Muskulatur, die ringförmig Bereiche der Arteriolen und Venolen umgibt und deren Durchmesser regulieren kann), die den Blutfluss zu dem Gewebereich, in dem die aktivierten Neuronen liegen, kontrollieren. Dies konnte durch Computersimulationen, die auf 3D Rekonstruktionen von realen vaskulären Netzwerken basieren, gezeigt werden (Reichold et al., 2009).

Aus anatomischen Studien über die Ausstattung von kortikalen Gefäßen mit vaskulären *Shunts* (Duvernoy et al., 1981) und Studien die die Volumenänderungen von Gefäßen während neuronaler Aktivierung untersucht haben (Reichold et al., 2009; Tian et al., 2010) zeigt sich, dass diese Blutfluss-Regulation vor allem im Bereich der radialen Gefäße von statten geht. So zeigen Reichold et al. (2009) an einem realistischen Gefäßnetzmodell, dass allein durch die Änderung des Durchmessers einer zuführenden radialen Arterie die Blutflussgeschwindigkeit in einem nachgelagerten 'kolumnenartigen' Gefäßnetzbereich ansteigt und so theoretisch zu einer erhöhten Versorgung der dort liegenden Neuronen mit sauerstoffreichem Blut führt. Dem Modell von Reichold et al. (2009) zufolge ergibt sich aus der Dichte der radialen Arterien und Venen die Minimalgröße eines kontrollierbaren Gewebereiches. Demzufolge resultiert aus der Dichte der radialen Gefäße zwangsläufig das räumliche Auflösungsvermögen des haemodynamischen Signals und damit auch das Auflösungsvermögen, mit dem die dem haemodynamischen Signal zugrundeliegende neuronale Aktivität dargestellt werden kann. Es ist nahe liegend anzunehmen, dass sich dieses Auflösungsvermögen in den Aktivierungsmustern der Differenzkarten widerspiegelt und das dadurch auch die Größe der einzelnen Kolumnen (Durchmesser, Zentrumsabstände) bestimmt wird.

Aufbauend auf diesem Theorem, ist es plausibel anzunehmen, dass eine einzelne zuführende Arterie nicht nur eine einzige Orientierungskolumne versorgt, sondern an der Versorgung mehrerer Kolumnen beteiligt ist, die radiär um sie herum angeordnet sind, und so lediglich die neuronale Ansteuerung einiger weniger vaskulärer *Shunts* notwendig ist um den Blutfluss in verschiedene -horizontal abzweigende- Arteriolen zu leiten die jeweils eine individuelle Kolumne versorgen.

Vor allem im Hinblick auf strukturelle Ökonomie macht solch eine Funktion Sinn, denn solch ein Versorgungsmechanismus würde es erlauben mit einer relativ geringen Dichte von radiären Gefäßen (sowohl zuführende Arterien als auch abführende Venen) eine effiziente Versorgung von kleineren voneinander unabhängigen Gewebereichen (wie z.B. kleinen Gruppen von Neuronen die über ähnliche Perzeptionseigenschaften verfügen) zu ermöglichen.

Im Fall einer solchen Anordnung von Kolumnen um eine zuführende Arterie sollte bei der Stimulation der verschiedenen Kolumnen durch visuelle Reize in einem Optical-Imaging-Experiment an der Position der Versorgungseinheit ein immer gleich stark geartetes intrinsisches Signal in den Karten zu finden sein und so in einer daraus errechneten Vektorkarte einen entsprechend geringen Wert für die Stärke der Orientierungspräferenz ergeben. Der Durchmesser der radialen Gefäße liegt allerdings im Schnitt

unterhalb der Auflösungsgrenze der Optical-Imaging-Technik (23.8 - 26.1 μ m; Keller et al., 2011). Bedenkt man jedoch, dass die radialen Gefäße in der Regel von dem sogenannten Pfeiferschen Raum umgeben sind - einem kapillarfreien kreisförmigen Bereich von über 100 - 150 μ m Durchmesser (eigene Messung an *Callithrix*-Präparaten) um das Gefäß herum - und die Kapillaren die eigentlich signalgebenden Strukturen sind (Frostig et al., 1990), muss angenommen werden, dass es vor allem an den Positionen der zuführenden radialen Arterien, aber auch an denen der abführenden radialen Venen zu lokal begrenzten, aber signifikanten Auswirkungen auf die Signalstärke kommt. Eine zuverlässige Zuordnung der Gefäßanschnitte in den histologischen Präparaten zu den Pinwheels ist durch die Auflösung der Optical-Imaging-Technik und der Größe des Alignierungsfehlers zurzeit noch nicht möglich. Ebenso ist es mit den bisherigen Methoden nicht möglich zu bestimmen, ob es sich bei einem Gefäßanschnitt um den Anschnitt einer Arterie oder einer Vene handelt. Das wäre jedoch notwendig, um die Abstände von Gefäßpaaren bzw. den Durchmesser einer Versorgungseinheit (bestehend aus einer zuführenden Arterie und einer abführenden Vene) bestimmen zu können. Ein Vergleich der Pinwheelabstände mit undifferenzierten Gefäßabständen zeigt in eigenen vorläufigen Untersuchungen keine erkennbare Korrelation der beiden Strukturen. Andere hochauflösende Untersuchungsansätze z.B. unter Verwendung von 2-PM sollten es ermöglichen, diese Zusammenhänge zu klären.

6.4 Diskussion Fazit

6.4.1 Methodik

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen ein experimentelles Physiologie-Setup aufzubauen mit dem Optical-Imaging-Aufnahmen aber auch elektrophysiologische Ableitungen am Kortex von anästhesierten Krallenaffen und Ratten bis zu einer Narkosedauer von 24 Stunden und darüber hinaus durchgeführt werden können.

Die Entwicklung von speziell auf die Weißbüschelaffen angepasste Protokolle für Anästhesie und Chirurgie inklusive der dafür notwendigen Instrumenten, sowie eine spezielle Infrarot-refraktometrische Methode in Kombination mit eigens für diese Affenart angefertigten Kontaktlinsen, haben es ermöglicht, Stimulationsexperimente am visuellen System der Tiere durchzuführen und dabei auch visuelle Reize mit hoher räumlicher Frequenz, bei gleichzeitigem Erhalt von hohen Helligkeitskontrastwerten, einzusetzen. Solche Reize sind vor allem für eine optimale Darstellung der Orientierungspräferenzen im visuellen Kortex eine wichtige Voraussetzung (siehe dazu auch Lu und Roe, 2007).

Mit dem Setup konnten in einer Serie von Langzeitversuchen qualitativ hochwertige intrinsische Optical-Imaging-Daten in Form von neuronal-topographischen Aktivitätskarten im primären und sekundären visuellen Kortex aufgezeichnet werden. Speziell die gewonnenen Orientierungspräferenzkarten zeigen im Vergleich mit anderen Veröffentlichungen (Roe et al., 2005; McLoughlin und Schiessl, 2006; Buzás et al., 2008) eine hohe Datenqualität.

Desweiteren wurde ein methodisches Protokoll entwickelt, dass es ermöglicht über eine multimodale Darstellung der kortikalen Blutgefäße die funktionell gewonnen Optical-Imaging-Daten mit histologischen Schnittpräparaten zu alignieren und so einen -in vergleichbaren Experimenten bisher

unerreicht- hochgenauen Abgleich der Positionen von funktionell dargestellten Aktivitätsbereichen und anatomischen Strukturen zu gewährleisten, bei dem insbesondere der 3-dimensionale Verlauf der anatomischen Strukturen im Gewebe berücksichtigt wird.

6.4.2 Physiologische Ergebnisse

Aufbauend auf dieser methodisch-technischen Basis, konnten Experimente am visuellen System von Weissbüschelaffen durchgeführt werden bei denen die räumliche Verteilung von Farb- und orientierungsselektiven Aktivitätsbereichen untersucht wurde. Dabei zeigte sich, dass Farbflicker (mit einer Frequenz von 1.5Hz) die aus Gegenfarbenpaaren wie Rot/Grün und Blau/Gelb aufgebaut waren, zu einer Aktivierung der Blobs in V1 und der *thin stripes* in V2 führten.

Dieses Ergebnis ist insofern von besonderer Relevanz, da diese Ergebnisse zum ersten mal zeigen, dass - ähnlich wie es für Makaken und anderen Altweltaffen nachgewiesen wurde- auch im visuellen System von trichromatischen Neuweltaffen Blobs und *thin stripes* gesonderte Bereiche im visuellen Kortex bilden, die eine spezielle Rolle bei der Wahrnehmung von Farbe spielen.

Nicht zuletzt ermöglichen diese Ergebnisse einen neuen methodischen Ansatz, um in weiteren Experimenten die räumlichen Zusammenhänge zwischen Blobs und anderen Strukturphänomenen zu untersuchen und so die Daten, die in Makaken zu diesem Sachverhalt gewonnen wurden, mit Daten aus einem weiteren Tiermodell abgleichen zu können.

Da bei Makaken ebenfalls ein räumlicher Zusammenhang zwischen Pinwheels und dem Verlauf der ODK gezeigt werden konnte, wurde diesbezüglich eine Untersuchung der räumlichen Anordnung von orientierungsselektiven Bereichen im Hinblick auf die Ausbildung des pinwheelartigen Strukturphänomens zum Anlass genommen, um eine Abhängigkeit zwischen Pinwheels und ODK zu untersuchen. Drei von vier der an der Studie beteiligten Tiere wurden auf ODK getestet. Jedoch konnten in keinem der Tiere ODK nachgewiesen werden. Sowohl die Topographie der orientierungsselektiven Bereiche, als auch das Erscheinungsbild der Pinwheels zeigten in diesen Tieren die typische Anordnung der Orientierungsselektivität wie sie von Makaken und anderen Primatenarten bekannt ist. Allerdings konnte aufgrund des Mangels von Tieren welche ODK aufweisen (und dem Mangel an diesbezüglichen Daten in der Literatur) kein direkter Vergleich mit Daten von Weissbüschelaffen, welche ODK aufweisen, vorgenommen werden.

Es scheint plausibel, dass das Vorhandensein oder das Fehlen von ODK in Weissbüschelaffen keinen wesentlichen Einfluss auf grundlegende Struktur des Pinwheelphänomens hat. Offen bleibt lediglich die Frage, ob das Vorhandensein von ODK einen Einfluss auf die räumliche Verteilung der Pinwheelzentren ausübt.

6.4.3 Einbindung in den Stand der Forschung (Hypothesenbildung)

Die Daten im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden haben keinen Hinweis auf eine räumliche Beziehung zwischen Blobs und Pinwheels oder zwischen Blobs und der Verteilung von Orientierungspräferenzen in Weissbüschelaffen erkennen lassen. Genauere Untersuchungen hierzu konnten aber zum einen aufgrund der geringen Zahl der Versuchstiere und dem begrenzten Zeitraum

der bzw. die im Rahmen dieser Arbeit für die rein wissenschaftlichen (nicht-technischen) Experimente zur Verfügung stand nicht durchgeführt werden.

Zudem trugen -neben der schwer einschätzbaren Größe des statistischen Fehlers der Optical-Imaging-Technik- eine Reihe von intrinsischen Artefaktquellen (wie etwa *slow oscillation waves* bzw. *vasomotion*), die z.B. eine starke Prononcierung der oberflächigen Blutgefäße bewirken und dadurch zu positionellen Einflüssen auf die Verteilung der Pinwheels, sowie zu Verzerrungen der Orientierungskolumnenverläufe führten, dazu bei, dass ein wohlfundierter und statistisch signifikanter Positionsabgleich der verschiedenen Strukturen über eine ausreichend hohe Versuchstierzahl an dem vorhandenen Datenmaterial nicht durchgeführt werden konnte.

Letztendlich konnten aber anhand von Untersuchungen zur Entstehung des Pinwheelphänomens Hinweise gewonnen werden, die darauf schließen lassen, dass der Struktur des Pinwheelphänomens ein physiologisch-vaskulärer Blutverteilungsmechanismus zugrunde liegt, der das Prinzip einer separaten und damit ökonomischen Sauerstoffversorgung von Neuronengruppen mit gleichartigen Eigenschaften (etwa gleiche Orientierungspräferenz oder auch Farbselektivität) aufzeigt.

Dieser Mechanismus wurde daher als mögliche Arbeitshypothese für zukünftige Projekte vorgestellt. Er bietet einen potentiell neuen Ansatz für eine anatomisch-ausgerichtete Erweiterung bisheriger Modelle zur Entstehung der topographischen Eigenschaften (Musterbildungsprozesse) und der räumlichen Zusammenhänge der funktionellen Systeme: Blobs, Pinwheels, Orientierungskolumnen, ODK in Makaken als auch in anderen Tiermodellen.

Letztendlich bestätigt sich in den hier gezeigten Weissbüschelaffen-Daten (speziell in der Ausprägung von ODK, sowie Pinwheel-, Blob- und Orientierungskolumnenabständen, siehe 3.6.2, sowie 4.2, 4.3) die große Varianz in der Musterbildung der einzelnen funktionellen Systeme zwischen verschiedenen Tierarten, wie sie auch von Horton und Adams (2005) im Vergleich zwischen Makaken und Totenkopffaffen für die Ausbildung von ODK und Blobverteilungsmustern gezeigt wurde. Es kann daher angenommen werden, dass eine räumliche Beziehung der einzelnen funktionellen Systeme, wie sie in Makaken vermutet wird, keine zwingende Bedingung für die Funktionalität der einzelnen Systeme darstellt, sondern dass die grundlegenden Funktionsmechanismen der verschiedenen Systeme weitgehend unabhängig voneinander etabliert sind.

6.4.4 Ausblick

Hinsichtlich der Varianz der Topographien der einzelnen visuellen Systeme in verschiedenen Tierarten, scheint es plausibel anzunehmen, dass eine Ausprägungsform wie sie bisher lediglich in Makaken gefunden wurde eventuell einer besonderen, artspezifischen Ursache unterliegt, die etwa besondere evolutionsethologische Eigenschaften der visuellen Wahrnehmung des Makaken widerspiegelt.

Allerdings scheint es aufgrund neuerer Erkenntnisse im Bereich der Angiogenese naheliegender zu sein, dass solch eine Ausprägungsform auf strukturbildenden Prozessen beruht, wie sie z.B. von Adams und Eichmann et al. (2010) berichtet werden: einer während der Entwicklung durch gemeinsame Wachstumsfaktoren verknüpften Ausbildung von Faserverläufen (Axonwachstum), Angioarchitektur und Zellmigration.

Solche angiogenen Prozesse könnten dafür verantwortlich sein, dass z.B. aufgrund von strukturökonomischen Gründen Neuronen mit gemeinsamen Eigenschaften in Gruppen um vaskuläre Versorgungseinheiten (wie sie in Kapitel 6.3. diskutiert werden) herum angeordnet werden, wodurch es zu einer Ausbildung von diskreten kolumnenartigen Neuronenaggregationen kommen würde.

Im Folgeschluss daraus würde sich die räumliche Beziehung der einzelnen funktionellen Systeme in Makaken dadurch erklären, dass es in ihrem Kortex -entgegen den visuellen Kortizes von Tierarten wie z.B. Ratten oder Totenkopffaffen, in denen zufällige bzw. homogene Verteilungsmuster von Neuronen mit gleichen Eigenschaften (Orientierungsselektivität, bzw. okuläre Präferenz) nachgewiesen wurde (Ohki et al., 2005; Horton und Hocking, 1996)- zu einer erhöhten Notwendigkeit einer ökonomischen Blutversorgung des -im Vergleich zu den oben genannten Tierarten- relativ großen Makakenhirns⁴ kommt; etwa um das zusätzliche Volumens des sauerstoffreichem Blutes zu minimieren, welches zur Versorgung aktivierter Gewebereiche benötigt wird.

Es ist deshalb auch plausibel anzunehmen, dass Kolumnen, die von verschiedenen visuellen Systemen gebildet werden und über gemeinsame rezeptive Felder verfügen, ebenfalls durch eine gemeinsame vaskuläre Versorgungseinheit versorgt werden. Letztendlich würde eine solche Verknüpfung darin resultieren, dass die Topographien der verschiedenen Systeme miteinander korrelieren und sich die räumlichen Beziehungen zwischen Pinwheels, Blobs und ODK ergeben.

Vermutlich weisen Tierarten mit kleineren visuellen Arealen wie Totenkopffaffen, Weissbüschelaffen sowie Ratten und Mäuse, bei denen schon relativ geringe Blutvolumina (und weniger spezifische Versorgungsmechanismen wie z.B. *vasomotion*) ausreichen um etwa das gesamte V1 Areal (oder zumindest Großteile davon) zu durchspülen, einen weniger hohen Bedarf nach ökonomischen, stark lokalisierten, Blutversorgungsmechanismen auf, weshalb in diesen Tierarten auch eine weniger deutlich ausgeprägte, bzw. nur eine teilweise, oder gar keine erkennbare Kolumnenbildung vorliegt (siehe dazu auch die Diskussion in (Muir et al., 2011) zum Zusammenhang zwischen Kolumnenbildung und Hirngröße in Primaten und anderen Tierarten).

Der Nachweis eines solchen Blutversorgungsmechanismus würde zum einen wertvolle Erkenntnisse über das Auflösungspotential des haemodynamischen Signals bringen und damit Erkenntnisse bis zu welchem Maße durch funktionelle Methoden, wie etwa fMRT, neuronale Organisation dargestellt werden kann. Zum anderen böte er einen anatomisch-basierten Ansatz um die Musterbildungen/Topographien der funktionellen Systeme in V1 und anderen Bereichen des Kortex zu verstehen.

Bislang fehlen aussagekräftige tierexperimentelle Daten zu diesem Sachverhalt. Jedoch weisen einige der hier vorgestellten Sachverhalte darauf hin, dass weiterführende Untersuchungen dieses Zusammenhangs lohnenswert sind.

⁴ ... bzw. der relativ großen Fläche seines primären visuellen Areals...

Eigenanteil an der Arbeit:

Etablierung der Krallenaffenhaltung und intrinsischem Optical-Imaging an Primaten am MPI-Tübingen:

- Etablierung der Krallenaffenhaltung, Käfigeinrichtung, Tiereinkäufe, Transporte und Tierpflege. Kontaktaufnahme mit dem Deutschen Primaten Zentrum Göttingen (Besuch, Diätpläne). Kontaktaufnahme mit der Universität Düsseldorf (Bezug von Weißbüschelaffen) sowie mit **Prof. Dr. Erkert** an der Universität Tübingen (Bezug von Weißbüschelaffen, Beratung zur Haltung von Krallenaffen).
- Entwicklung der Chirurgie- und Narkoseprotokolle für Langzeitexperimente in Krallenaffen.
- Selbständiger Aufbau eines eigenen Labors für Optical-Imaging an Ratten und Krallenaffen.
- Planung, Entwurf und Entwicklung von Instrumenten zur Stimulation, Fixierung und medizinischen Versorgung für Ratten und Krallenaffen (u. A. Beatmungs-/Narkosesysteme, Krallenaffen-Stereotakt, Optical-Imaging (OI) Kammersystem, OI-LED-Ringlicht, OI-Kamerakühlsysteme, OI-Vibrationsisolation, Elektrodenpositioniersystem)
- Aufbau des Elektrophysiologie-Setups unter Einbeziehung des Fachpersonals der hauseigenen Elektronikwerkstatt (Axel Öltermann, Oliver Holder, u. w.).
- Etablierung der intrinsischen Optical-Imaging-Technik an Primaten am MPI-Tübingen.
- Programmierung der Skripte zur Bildbearbeitung und Auswertung der Optical-Imaging-Daten in Matlab.
- Anpassung der histologischen Methodenprotokolle u. A. für CytOx-Färbungen und FITC-Blutgefäßfärbungen an die physiologischen Verhältnisse der Krallenaffen.
- Aufbau eines Infrarot-Refraktometrie-Kamerasystems für Weißbüschelaffen unter Einbeziehung von **Prof. Dr. Frank Schaeffel** (Universität Tübingen). Programmierung der Skripte zur live-Refraktion und Korrektur des Sehfehlers durch Kontaktlinsen im Experiment.
- Eigenständige Durchführung aller Optical-Imaging-Versuche (~24-28h Dauer) an Ratten und Krallenaffen inklusive der Durchführung der chirurgischen Eingriffe sowie der Narkose. Narkoseüberwachung und Assistenz bei der Chirurgie erfolgten zuerst durch die Tierärztin Cornelia Stamm, später durch Saskia Kroll (wissenschaftstechnische Angestellte).

Publikation 1:

- Planung und Durchführung der Experimente
- Eigenständige Entwicklung des Methodenprotokolls zur Alignierung von funktionellen und anatomischen Daten.
- Programmierung der Skripte zur Datenbearbeitung und Datenauswertung in Matlab.
- Etablierung der Kooperation mit Dr. Damian Wallace MPI für biologische Kybernetik (Nachwuchsgruppe: Dr. Jason Kerr).
- Planung und schriftliche Ausarbeitung des Manuskripts.
- **Dr. Damian Wallace** war vor allem durch eine Beratung zur Auswertung der Meßfehlergrößen und Überprüfung der fachspezifischen Terminologie, sowie durch Sprachkorrektur an der Arbeit beteiligt.
- **Prof. Dr. Almut Schüz** hat das Manuskript auf thematische Logik hin überprüft sowie sprachliche Korrekturen vorgeschlagen.
- **Prof. Dr. Nikos Logothetis** hat das Projekt finanziert und die Räume/Laboratorien zur Verfügung gestellt.

Publikation 2 :

- Planung und Durchführung der Experimente

- Test verschiedener Protokolle zur Stimulation der Blobs mittels verschiedener chromatischer und achromatischer Stimuli.
- Eigenständige Entwicklung des Methodenprotokolls zur Untersuchung der Farbwahrnehmung von Krallenaffen (Gegenfarbenflicker, Farbe/Grau-Flicker, Helligkeitsflicker).
- Programmierung der Skripte zur Datenbearbeitung und Auswertung in Matlab.
- Auswertung der Daten, eigenständige Planung und Ausarbeitung des Manuskripts.
- Etablierung der Kooperation mit Dr. Andreas Bartels als Experte für Farbwahrnehmung.
- Etablierung der Kooperation mit **Dr. Adrian Streit** vom MPI für Entwicklungsbiologie zum Nachweis des Genotypus (Dichromat/Trichromat) mittels PCR der untersuchten Krallenaffen. Dr. Adrian Streit hat an den von mir aufbereiteten Gewebeproben die PCR mit den entsprechenden Restriktionsnukleasen durchgeführt. Die Sequenzierung wurde am MPI für Entwicklungsbiologie durch einen technischen Assistenten von Dr. Adrian Streit gemacht. Die Auswertung des Sequenzierungsergebnisses erfolgte durch Dr. Adrian Streit.
- **Dr. Andreas Bartels** war anteilig bei den Berechnungen und Beschreibungen des Einflusses der chromatischen und achromatischen Stimuli auf die jeweiligen Farbwahrnehmungssysteme (M+L, S, L-M) beteiligt und hat die Verwendung der *General Linear Model*-Methode vorgeschlagen um die Signifikanz der Ergebnisse zu beschreiben. Dafür hat er Matlab-Skripte zur Anwendung der Methode bereitgestellt und eigene Berechnungen beigetragen.
- **Prof. Dr. Almut Schüz** hat das Manuskript auf thematische Logik hin überprüft sowie sprachliche Korrekturen vorgeschlagen.
- **Prof. Dr. Nikos Logothetis** hat das Projekt finanziert und die Räume/Laboratorien zur Verfügung gestellt.
-

Publikation 3:

- Eigenständige Untersuchung der Optical-Imaging-Daten auf Zusammenhänge der Architektur des Blutgefäßnetzwerkes (oberflächige Blutgefäßverläufe, sowie Korrelation der Blutgefäßstrukturen in den 3D Rekonstruktionen mit intrinsischen Signalen).
- Programmierung der Skripte zur Datenbearbeitung und Auswertung in Matlab.
- Eigenständige Planung und Ausarbeitung des Manuskripts.
- **Prof. Dr. Almut Schüz** hat das Manuskript auf thematische Logik hin überprüft sowie sprachliche Korrekturen vorgeschlagen.
- **Prof. Dr. Nikos Logothetis** hat das Projekt finanziert und die Räume/Laboratorien zur Verfügung gestellt.

Weitere etablierte Kontakte und Kooperationen:

Prof. Dr. Jan Kremers (Universitätsklinikum Erlangen): Beratung zum Aufbau eines Stimulussystems für Krallenaffen.

Dr. Jakob Macke (damals MPI für biol. Kyb., Nachwuchsgruppe: Prof. Dr. Matthias Bethge): Beratung bei der Programmierung der Matlabskripte zur Berechnung der topographischen Orientierungskarten.

Prof. Dr. Anna Wang-Roe (Vanderbilt University Nashville, Tennessee, USA): Laborpraktikum, Beratung zur Verbesserung von Aufnahme-Protokollen für intrinsisches Optical-Imaging an Weissbüschelaffen.

Prof. Dr. Bruno Weber (ETH Universitätsklinikums Zürich, Schweiz): Laborpraktikum, Beratung und Training in Präparation von Ratten für intrinsisches Optical-Imaging.

Prof. Dr. Ingo Schiessel (University of Manchester, Vereinigtes Königreich): Beratung zu Kontaktlinsen für Krallenaffen.

Prof. Dr. Ralf Galuske (MPI Frankfurt): Beratung zu Agarosegelen zur Füllung der OI-Kammer und Stabilisierung der Kortexoberfläche.

Prof. Dr. Bernd Pichler (Universität Tübingen, Labor für Präklinische Bildgebung und Radiopharmazie): Hochaufgelöste Computertomographie eines fixierten Weißbüschelaffen mittels des Kleintier-CT.

Prof. Dr. Marcello Rosa (Department of Physiology, Monash University, Australien): Beratung bzgl. medizintechnischer Methoden zur Behandlung von Weissbüschelaffen.

Dr. David Troilo (The New England College of Optometry, Boston, USA): Beratung zu Kontaktlinsendaten für Weißbüschelaffen.

Prof. Dr. David Hunt (School of Animal Biology, University of Western Australia, Australien): Informationen zum Problem des Chimerismus bei der Genotypisierung von dichromatischen Weißbüschelaffen.

Weitere Kontaktaufnahmen: mit zahlreichen Firmen zum Zwecke des Laboraufbaus.

Beispielsweise: Recherche zu geeigneten Silikongelen, Silikonölen zur Kammerabdichtung und Kammerfüllung, zur Herstellung spezieller Kontaktlinsen für Weißbüschelaffen, zur Modifikation der Kamerasoftware durch Optical-Imaging Inc. u.v.m.

Sowie zu verschiedenen Institutionen zur Beschaffung von Krallenaffen z.B. mit der Universität Düsseldorf (Dr. Treiber) und dem Deutschen Primatenzentrum in Göttingen.

Literatur

- Adams DL, Horton JC (2006) Monocular Cells Without Ocular Dominance Columns. *Journal of Neurophysiology* 96:2253-2264.
- Adams DL, Horton JC (2009) Ocular Dominance Columns: Enigmas and Challenges. *The Neuroscientist* 15:62-77.
- Albeanu DF, Soucy E, Sato TF, Meister M, Murthy VN (2008) LED Arrays as Cost Effective and Efficient Light Sources for Widefield Microscopy. *PLoS ONE* 3:e2146.
- Albus K (1975) A quantitative study of the projection area of the central and the paracentral visual field in area 17 of the cat. II. The spatial organization of the orientation domain. *Experimental Brain Research* 24:181-202.
- Bartfeld E, Grinvald A (1992) Relationships between orientation-preference pinwheels, cytochrome oxidase blobs, and ocular-dominance columns in primate striate cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:11905-11909.
- Berwick J, Johnston D, Jones M, Martindale J, Martin C, Kennerley AJ, Redgrave P, Mayhew JEW (2008) Fine Detail of Neurovascular Coupling Revealed by Spatiotemporal Analysis of the Hemodynamic Response to Single Whisker Stimulation in Rat Barrel Cortex. *J Neurophysiol* 99:787-798.
- Bien AH, Parikh P, Entcheva E (2007) Lenses and effective spatial resolution in macroscopic optical mapping. *J Physics in Medicine and Biology* 54:1-21.
- Blasdel G (1992) Differential imaging of ocular dominance and orientation selectivity in monkey striate cortex. *J Neurosci* 12:3115-3138.
- Blasdel GG, Salama G (1986) Voltage-sensitive dyes reveal a modular organization in monkey striate cortex. *Nature* 321:579-585.
- Blessing EM, Solomon SG, Hashemi-Nezhad M, Morris BJ, Martin PR (2004) Chromatic and spatial properties of parvocellular cells in the lateral geniculate nucleus of the marmoset (*Callithrix jacchus*). *The Journal of Physiology* 557:229-245.
- Bonhoeffer T, Grinvald A (1991) Iso-orientation domains in cat visual cortex are arranged in pinwheel-like patterns. *Nature* 353:429-431.
- Bonhoeffer T, Grinvald A (1993) The layout of iso-orientation domains in area 18 of cat visual cortex: optical imaging reveals a pinwheel-like organization. *The Journal of Neuroscience* 13:4157-4180.
- Bonhoeffer T, Grinvald A (1996) Optical Imaging based on intrinsic signals: the methodology. *Brain mapping; the methods*:55-97.

- Boretius S, Schmelting B, Watanabe T, Merkler D, Tammer R, Czéh B, Michaelis T, Frahm J, Fuchs E (2006) Monitoring of EAE onset and progression in the common marmoset monkey by sequential high-resolution 3D MRI. *NMR in Biomedicine* 19:41-49.
- Bourne JA, Rosa MGP (2003) Preparation for the in vivo recording of neuronal responses in the visual cortex of anaesthetised marmosets (*Callithrix jacchus*). *Brain Research Protocols* 11:168-177.
- Bourne JA, Warner CE, Upton DJ, Rosa MGP (2007) Chemoarchitecture of the middle temporal visual area in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*): Laminar distribution of calcium-binding proteins (calbindin, parvalbumin) and nonphosphorylated neurofilament. *The Journal of Comparative Neurology* 500:832-849.
- Boyd JD, Matsubara JA (1996) Laminar and columnar patterns of geniculocortical projections in the cat: Relationship to cytochrome oxidase. *The Journal of Comparative Neurology* 365:659-682.
- Braitenberg V (1985) Charting the visual cortex. In: *Cerebral Cortex* (Peters A, Jones D, eds), pp 379-414. New York: Plenum Publishing Corporation.
- Braitenberg V (1992) How Ideas Survive Evidence to the Contrary: a Comment of Data Display and Modelling. In: *Information Processing in the Cortex: Experiments and Theory* (Aertsen A, ed), pp 447-450. Berlin, Germany: Springer.
- Braitenberg V, Braitenberg C (1979) Geometry of orientation columns in the visual cortex. *Biological Cybernetics* 33:179-186.
- Buzás P, Szmajda BA, Hashemi-Nezhad M, Dreher B, Martin PR (2008) Color signals in the primary visual cortex of marmosets. *Journal of Vision* 8.
- Canny J (1986) A Computational Approach to Edge Detection. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on PAMI-8*:679-698.
- Casagrande V, Yazar F, Jones K, Ding Y (2007) The Morphology of the Koniocellular Axon Pathway in the Macaque Monkey. *Cerebral Cortex* 17:2334-2345.
- Casagrande VA (1994) A third parallel visual pathway to primate area V1. *Trends in Neurosciences* 17:305-310.
- Chappert-Piquemal C, Fonta C, Malecaze F, Ccedil, OIS, Imbert M (2001) Ocular dominance columns in the adult New World Monkey *Callithrix jacchus*. *Visual Neuroscience* 18:407-412.
- Conway BR (2009) Color Vision, Cones, and Color-Coding in the Cortex. *The Neuroscientist* 15:274-290.

- Crair MC, Ruthazer ES, Gillespie DC, Stryker MP (1997) Ocular Dominance Peaks at Pinwheel Center Singularities of the Orientation Map in Cat Visual Cortex. *Journal of Neurophysiology* 77:3381-3385.
- Dow BM (2002) Orientation and Color Columns in Monkey Visual Cortex. *Cerebral Cortex* 12:1005-1015.
- Duffy KR, Murphy KM, Jones DG (1998) Analysis of the postnatal growth of visual cortex. *Visual Neuroscience* 15:831-839.
- Duvernoy HM, Delon S, Vannson JL (1981) Cortical blood vessels of the human brain. *Brain Research Bulletin* 7:519-579.
- Everdell NL, Styles IB, Calcagni A, Gibson J, Hebden J, Claridge E (2010) Multispectral imaging of the ocular fundus using light emitting diode illumination: AIP.
- Federer F, Ichida JM, Jeffs J, Schiessl I, McLoughlin N, Angelucci A (2009) Four Projection Streams from Primate V1 to the Cytochrome Oxidase Stripes of V2. *The Journal of Neuroscience* 29:15455-15471.
- Forte JD, Blessing EM, Buzás P, Martin PR (2006) Contribution of chromatic aberrations to color signals in the primate visual system. *Journal of Vision* 6.
- Forte JD, Hashemi-Nezhad M, Dobbie WJ, Dreher B, Martin PR (2005) Spatial coding and response redundancy in parallel visual pathways of the marmoset *Callithrix jacchus*. *Visual Neuroscience* 22:479-491.
- Fritsches KA, Rosa MG (1996) Visuotopic organisation of striate cortex in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *The Journal of Comparative Neurology* 372:264-282.
- Frostig RD, Lieke EE, Ts'o DY, Grinvald A (1990) Cortical Functional Architecture and Local Coupling Between Neuronal Activity and the Microcirculation Revealed by In vivo High-Resolution Optical Imaging of Intrinsic Signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:6082-6086.
- Fukuda M, Moon C-H, Wang P, Kim S-G (2006) Mapping Iso-Orientation Columns by Contrast Agent-Enhanced Functional Magnetic Resonance Imaging: Reproducibility, Specificity, and Evaluation by Optical Imaging of Intrinsic Signal. *The Journal of Neuroscience* 26:11821-11832.
- Gerald H J (1998) A perspective on color vision in platyrrhine monkeys. *Vision Research* 38:3307-3313.
- Godde B, Leonhardt R, Cords SM, Dinse HR (2002) Plasticity of orientation preference maps in the visual cortex of adult cats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:6352-6357.
- Goetz KG (1987) Do "d-blob" and "l-blob" hypercolumns tessellate the monkey visual cortex? *Biol Cybern* 56:107-109.

- Goodyear BG, Menon RS (2001) Brief visual stimulation allows mapping of ocular dominance in visual cortex using fMRI. *Human Brain Mapping* 14:210-217.
- Grinvald A, Lieke E, Frostig RD, Gilbert CD, Wiesel TN (1986) Functional architecture of cortex revealed by optical imaging of intrinsic signals. *Nature* 324:361-364.
- Guyomard J-L, Rosolen SG, Paques M, Delyfer M-N, Simonutti M, Tessier Y, Sahel JA, Legargasson J-F, Picaud S (2008) A Low-Cost and Simple Imaging Technique of the Anterior and Posterior Segments: Eye Fundus, Ciliary Bodies, Iridocorneal Angle. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49:5168-5174.
- Harrison RV, Harel N, Panesar J, Mount RJ (2002) Blood Capillary Distribution Correlates with Hemodynamic-based Functional Imaging in Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex* 12:225-233.
- Hashemi-Nezhad M, Blessing EM, Dreher B, Martin PR (2008) Segregation of short-wavelength sensitive ("blue") cone signals among neurons in the lateral geniculate nucleus and striate cortex of marmosets. *Vision Research* 48:2604-2614.
- Hendry SH, Yoshioka T (1994) A neurochemically distinct third channel in the macaque dorsal lateral geniculate nucleus. *Science (New York, NY)* 264:575-577.
- Hendry SHC, Reid RC (2000) The Koniocellular Pathway in Primate Vision. *Annual Review of Neuroscience* 23:127-153.
- Hevner R, Wong-Riley M (1989) Brain cytochrome oxidase: purification, antibody production, and immunohistochemical/histochemical correlations in the CNS. *The Journal of Neuroscience* 9:3884-3898.
- Horton JC (1984) Cytochrome Oxidase Patches: A New Cytoarchitectonic Feature of Monkey Visual Cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 304:199-253.
- Horton JC, Hubel DH (1981) Regular patchy distribution of cytochrome oxidase staining in primary visual cortex of macaque monkey. *Nature* 292:762-764.
- Horton JC, Hedley-Whyte ET (1984) Mapping of Cytochrome Oxidase Patches and Ocular Dominance Columns in Human Visual Cortex. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 304:255-272.
- Horton JC, Hocking DR (1996) Anatomical Demonstration of Ocular Dominance Columns in Striate Cortex of the Squirrel Monkey. *J Neurosci* 16:5510-5522.
- Horton JC, Adams DL (2005) The cortical column: a structure without a function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360:837-862.
- Hubel D (1986) Blobs and color vision. *Cell Biochemistry and Biophysics* 9:91-102.
- Hubel DH, Wiesel TN (1962) Receptive fields, binocular interaction, and functional architecture of cat striate cortex. *J Physiol (Lond)* 160:106-154.

- Hubel DH, Wiesel TN (1965) Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. *Journal of Neurophysiology* 28:1041-1059.
- Hubel DH, Wiesel TN (1968) Receptive fields and functional architecture of monkey striate cortex. *J Physiol (Lond)* 195:215-243.
- Hubel DH, Wiesel TN (1977) Ferrier Lecture: Functional Architecture of Macaque Monkey Visual Cortex. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 198:1-59.
- Hubel DH, Wiesel TN, Stryker MP (1978) Anatomical demonstration of orientation columns in macaque monkey. *The Journal of Comparative Neurology* 177:361-379.
- Humphrey AL, Albano JE, Norton TT (1977) Organization of ocular dominance in tree shrew striate cortex. *Brain Research* 134:225-236.
- Hunt DM, Williams AJ, Bowmaker JK, Mollon JD (1993) Structure and evolution of the polymorphic photopigment gene of the marmoset. *Vision Research* 33:147-154.
- Husson TR, Mallik AK, Zhang JX, Issa NP (2007) Functional Imaging of Primary Visual Cortex Using Flavoprotein Autofluorescence. *The Journal of Neuroscience* 27:8665-8675.
- Jacobs GH, Neitz J, Neitz M (1993) Genetic basis of polymorphism in the color vision of platyrrhine monkeys. *Vision Research* 33:269-274.
- Johnson EN, Van Hooser SD, Fitzpatrick D (2010) The Representation of S-Cone Signals in Primary Visual Cortex. *The Journal of Neuroscience* 30:10337-10350.
- Johnson JK, Casagrande VA (1995) Distribution of calcium-binding proteins within the parallel visual pathways of a primate (*Galago crassicaudatus*). *The Journal of Comparative Neurology* 356:238-260.
- Kaas JH, Huerta MF, Weber JT, Harting JK (1978) Patterns of retinal terminations and laminar organization of the lateral geniculate nucleus of primates. *The Journal of Comparative Neurology* 182:517-553.
- Kalatsky VA, Polley DB, Merzenich MM, Schreiner CE, Stryker MP (2005) Fine functional organization of auditory cortex revealed by Fourier optical imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:13325-13330.
- Karube F, Kisvárdy ZF (2011) Axon Topography of Layer IV Spiny Cells to Orientation Map in the Cat Primary Visual Cortex (Area 18). *Cerebral Cortex* 21:1443-1458.
- Kaskan PM, Lu HD, Dillenburger BC, Roe AW, Kaas JH (2007) Intrinsic-signal optical imaging reveals cryptic ocular dominance columns in primary visual cortex of New World owl monkeys. *Frontiers in Neuroscience*:10.

- Kawamura S, Hirai M, Takenaka O, Radlwimmer FB, Yokoyama S (2001) Genomic and spectral analyses of long to middle wavelength-sensitive visual pigments of common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Gene* 269:45-51.
- Keller AL, Schüz A, Logothetis NK, Weber B (2011) Vascularization of Cytochrome Oxidase-Rich Blobs in the Primary Visual Cortex of Squirrel and Macaque Monkeys. *The Journal of Neuroscience* 31:1246-1253.
- Kremers J, Weiss S (1997) Receptive field dimensions of lateral geniculate cells in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Vision Research* 37:2171-2181.
- Landisman CE, Ts'o DY (2002) Color Processing in Macaque Striate Cortex: Relationships to Ocular Dominance, Cytochrome Oxidase, and Orientation. *J Neurophysiol* 87:3126-3137.
- LeVay S, Connolly M, Houde J, Van Essen D (1985) The complete pattern of ocular dominance stripes in the striate cortex and visual field of the macaque monkey. *The Journal of Neuroscience* 5:486-501.
- Liu GB, Pettigrew JD (2003) Orientation mosaic in barn owl's visual Wulst revealed by optical imaging: comparison with cat and monkey striate and extra-striate areas. *Brain Research* 961:153-158.
- Livingstone M, Hubel D (1984) Anatomy and physiology of a color system in the primate visual cortex. *The Journal of Neuroscience* 4:309-356.
- Livingstone MS, Hubel DH (1982) Thalamic inputs to cytochrome oxidase-rich regions in monkey visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79:6098-6101.
- Logothetis NK, Wandell BA (2004) Interpreting the BOLD Signal. *Annual Review of Physiology* 66:735-769.
- Lu HD, Roe AW (2007) Optical Imaging of Contrast Response in Macaque Monkey V1 and V2. *Cerebral Cortex* 17:2675-2695.
- Lu HD, Roe AW (2008) Functional Organization of Color Domains in V1 and V2 of Macaque Monkey Revealed by Optical Imaging. *Cerebral Cortex* 18:516-533.
- Lui LL, Bourne JA, Rosa MGP (2006) Functional Response Properties of Neurons in the Dorsomedial Visual Area of New World Monkeys (*Callithrix jacchus*). *Cerebral Cortex* 16:162-177.
- Malach R, Tootell RBH, Malonek D (1994) Relationship between Orientation Domains, Cytochrome Oxidase Stripes, and Intrinsic Horizontal Connections in Squirrel Monkey Area V2. *Cerebral Cortex* 4:151-165.
- Maldonado PE, Gödecke I, Gray CM, Bonhoeffer T (1997) Orientation Selectivity in Pinwheel Centers in Cat Striate Cortex. *Science* 276:1551-1555.

- Mansfield K (2003) Marmoset Models Commonly Used in Biomedical Research. *Comparative Medicine* 53:383-392.
- Markstahler U, Bach M, Spatz WB (1998) Transient molecular visualization of ocular dominance columns (ODCs) in normal adult marmosets despite the desegregated termination of the retino-geniculo-cortical pathways. *The Journal of Comparative Neurology* 393:118-134.
- Martin PR (1998) Colour processing in the primate retina: recent progress. *The Journal of Physiology* 513:631-638.
- Martin PR (2004) Colour through the thalamus. *Clinical and Experimental Optometry* 87:249-257.
- Martin PR, Solomon SG (2011) Information processing in the primate visual system. *The Journal of Physiology* 589:29-31.
- Martin PR, White AJ, Goodchild AK, Wilder HD, Sefton AE (1997) Evidence that blue-on cells are part of the third geniculocortical pathway in primates. *The European journal of neuroscience* 9:1536-1541.
- Martin PR, Blessing EM, Buzás P, Szmajda BA, Forte JD (2011) Transmission of colour and acuity signals by parvocellular cells in marmoset monkeys. *The Journal of Physiology* 589:2795-2812.
- Mayhew JEW, Askew S, Zheng Y, Porrill J, Westby GWM, Redgrave P, Rector DM, Harper RM (1996) Cerebral Vasomotion: A 0.1-Hz Oscillation in Reflected Light Imaging of Neural Activity. *NeuroImage* 4:183-193.
- Mc Loughlin NP, Blasdel GG (1998) Wavelength-Dependent Differences between Optically Determined Functional Maps from Macaque Striate Cortex. *NeuroImage* 7:326-336.
- McLoughlin N, Schiessl I (2006) Orientation selectivity in the common marmoset (*Callithrix jacchus*): The periodicity of orientation columns in V1 and V2. *NeuroImage* 31:76-85.
- McLoughlin N, Cotton P, Schiessl I (2005) A continuous smooth map of space in the primary visual cortex of the common marmoset. *Perception* 34:967-974.
- Mountcastle VB (1957) Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *Journal of Neurophysiology* 20:408-434.
- Mountcastle VB (1979) An Organizing Principle for Cerebral Function: The Unit Module and the Distribution system. In: *Neuroscience, Fourth Study Program* (Schmitt FO, ed), pp 21-42. Cambridge, MA: MIT Press.
- Mrsic-Flogel T, Hübener M, Bonhoeffer T (2003) Brain Mapping: New Wave Optical Imaging. *Current Biology* 13:R778-R780.

- Muir DR, Da Costa NMA, Girardin CC, Naaman S, Omer DB, Ruesch E, Grinvald A, Douglas RJ (2011) Embedding of Cortical Representations by the Superficial Patch System. *Cerebral Cortex*.
- Murphy K, Jones D, Van Sluyters R (1995) Cytochrome-oxidase blobs in cat primary visual cortex. *The Journal of Neuroscience* 15:4196-4208.
- Nelken I, Bizley JK, Nodal FR, Ahmed B, King AJ, Schnupp JWH (2008) Responses of Auditory Cortex to Complex Stimuli: Functional Organization Revealed Using Intrinsic Optical Signals. *Journal of Neurophysiology* 99:1928-1941.
- Nowak LG, Barone P (2009) Contrast Adaptation Contributes to Contrast-Invariance of Orientation Tuning of Primate V1 Cells. *PLoS ONE* 4:e4781.
- Obermayer K, Blasdel G (1993) Geometry of orientation and ocular dominance columns in monkey striate cortex. *J Neurosci* 13:4114-4129.
- Obermayer K, Ritter H, Schulten K (1990) A principle for the formation of the spatial structure of cortical feature maps. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8345-8349.
- Ohki K, Chung S, Ch'ng YH, Kara P, Reid RC (2005) Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature* 433:597-603.
- Ohki K, Chung S, Kara P, Hubener M, Bonhoeffer T, Reid RC (2006) Highly ordered arrangement of single neurons in orientation pinwheels. *Nature* 442:925-928.
- Orbach H, Cohen L (1983) Optical monitoring of activity from many areas of the in vitro and in vivo salamander olfactory bulb: a new method for studying functional organization in the vertebrate central nervous system. *The Journal of Neuroscience* 3:2251-2262.
- Perry VH, Oehler R, Cowey A (1984) Retinal ganglion cells that project to the dorsal lateral geniculate nucleus in the macaque monkey. *Neuroscience* 12:1101-1123.
- Polimeni JR, Granquist-Fraser D, Wood RJ, Schwartz EL (2005) Physical limits to spatial resolution of optical recording: Clarifying the spatial structure of cortical hypercolumns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:4158-4163.
- Ratzlaff EH, Grinvald A (1991) A tandem-lens epifluorescence microscope: hundred-fold brightness advantage for wide-field imaging. *Journal of Neuroscience Methods* 36:127-137.
- Reichold J, Stampanoni M, Keller AL, Buck A, Jenny P, Weber B (2009) Vascular graph model to simulate the cerebral blood flow in realistic vascular networks. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1429-1443.
- Roe A, Ts'o D (1995) Visual topography in primate V2: multiple representation across functional stripes. *The Journal of Neuroscience* 15:3689-3715.

- Roe A, Pallas S, Hahm J, Sur M (1990) A map of visual space induced in primary auditory cortex. *Science* 250:818-820.
- Roe AW, Ts'o DY (1999) Specificity of Color Connectivity Between Primate V1 and V2. *Journal of Neurophysiology* 82:2719-2730.
- Roe AW, Fritsches K, Pettigrew JD (2005) Optical imaging of functional organization of V1 and V2 in marmoset visual cortex. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 287A:1213-1225.
- Rosa MGP, Fritsches KA, Elston GN (1997) The second visual area in the marmoset monkey: Visuotopic organisation, magnification factors, architectonical boundaries, and modularity. *The Journal of Comparative Neurology* 387:547-567.
- Sasaki E et al. (2009) Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature* 459:523-527.
- Schaeffel F, Hagel G, Eikermann J, Collett T (1994) Lower-field myopia and astigmatism in amphibians and chickens. *J Opt Soc Am A* 11:487-495.
- Schiessl I, McLoughlin N (2003) Optical imaging of the retinotopic organization of V1 in the common marmoset. *NeuroImage* 20:1857-1864.
- Schiessl I, Wang W, McLoughlin N (2008) Independent components of the haemodynamic response in intrinsic optical imaging. *NeuroImage* 39:634-646.
- Sharma J, Angelucci A, Sur M (2000) Induction of visual orientation modules in auditory cortex. *Nature* 404:841-847.
- Shoham D, Grinvald A (2001) The Cortical Representation of the Hand in Macaque and Human Area S-I: High Resolution Optical Imaging. *The Journal of Neuroscience* 21:6820-6835.
- Signer E, Anzenberger G, Jeffreys A (2000) Chimaeric and constitutive DNA fingerprints in the common marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>). *Primates* 41:49-61.
- Sincich LC, Horton JC (2005) The Circuitry of V1 and V2: Integration of Color, Form, and Motion. *Annual Review of Neuroscience* 28:303-326.
- Sincich LC, Jocson CM, Horton JC (2010) V1 Interpatch Projections to V2 Thick Stripes and Pale Stripes. *The Journal of Neuroscience* 30:6963-6974.
- Solomon SG (2002) Striate cortex in dichromatic and trichromatic marmosets: Neurochemical compartmentalization and geniculate input. *The Journal of Comparative Neurology* 450:366-381.
- Solomon SG, Lennie P (2007) The machinery of colour vision. *Nat Rev Neurosci* 8:276-286.

- Solomon SG, White AJR, Martin PR (2002) Extraclassical Receptive Field Properties of Parvocellular, Magnocellular, and Koniocellular Cells in the Primate Lateral Geniculate Nucleus. *The Journal of Neuroscience* 22:338-349.
- Spatz WB (1989) Loss of ocular dominance columns with maturity in the monkey, *Callithrix jacchus*. *Brain Research* 488:376-380.
- Swindale NV (1982) A Model for the Formation of Orientation Columns. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 215:211-230.
- Swindale NV (1991) Coverage and the design of striate cortex. *Biol Cybern* 65:415-424.
- Swindale NV (2000) How Many Maps are there in Visual Cortex? *Cerebral Cortex* 10:633-643.
- Swindale NV, Matsubara JA, Cynader MS (1987) Surface organization of orientation and direction selectivity in cat area 18. *J Neurosci* 7:1414-1427.
- Swindale NV, Shoham D, Grinvald A, Bonhoeffer T, Hubener M (2000) Visual cortex maps are optimized for uniform coverage. *Nat Neurosci* 3:822-826.
- Tailby C, Dobbie WJ, Solomon SG, Szmajda BA, Hashemi-Nezhad M, Forte JD, Martin PR (2010) Receptive field asymmetries produce color-dependent direction selectivity in primate lateral geniculate nucleus. *Journal of Vision* 10.
- Tanigawa H, Lu HD, Roe AW (2010) Functional organization for color and orientation in macaque V4. *Nat Neurosci* 13:1542-1548.
- Tian P, Teng IC, May LD, Kurz R, Lu K, Scadeng M, Hillman EMC, De Crespigny AJ, D'Arceuil HE, Mandeville JB, Marota JJA, Rosen BR, Liu TT, Boas DA, Buxton RB, Dale AM, Devor A (2010) Cortical depth-specific microvascular dilation underlies laminar differences in blood oxygenation level-dependent functional MRI signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:15246-15251.
- Tootell R, Hamilton S (1989) Functional anatomy of the second visual area (V2) in the macaque. *The Journal of Neuroscience* 9:2620-2644.
- Tootell R, Silverman M, Hamilton S, De Valois R, Switkes E (1988) Functional anatomy of macaque striate cortex. III. Color. *The Journal of Neuroscience* 8:1569-1593.
- Tootell RBH, Nelissen K, Vanduffel W, Orban GA (2004) Search for Color 'Center(s)' in Macaque Visual Cortex. *Cerebral Cortex* 14:353-363.
- Tovée MJ, Bowmaker JK, Mollon JD (1992) The relationship between cone pigments and behavioural sensitivity in a new world monkey (*Callithrix jacchus jacchus*). *Vision Research* 32:867-878.
- Troilo D, Rowland HC, Judge SJ (1993) Visual optics and retinal cone topography in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Vision Research* 33:1301-1310.

- Troilo D, Quinn N, Baker K (2007) Accommodation and induced myopia in marmosets. *Vision Research* 47:1228-1244.
- Ts'o DY, Roe AW, Gilbert CD (2001) A hierarchy of the functional organization for color, form and disparity in primate visual area V2. *Vision Research* 41:1333-1349.
- Ts'o DY, Zarella M, Burkitt G (2009) Whither the hypercolumn? *The Journal of Physiology* 587:2791-2805.
- Valverde Salzmann MF, Logothetis NK, Pohmann R (2011) High-resolution imaging of vessels in the isolated rat brain. ISMRM: Montreal, Quebec, Canada.
- Van Hooser SD, Heimel JAF, Chung S, Nelson SB, Toth LJ (2005) Orientation Selectivity without Orientation Maps in Visual Cortex of a Highly Visual Mammal. *The Journal of Neuroscience* 25:19-28.
- Vanzetta I, Grinvald A (2008) Coupling between neuronal activity and microcirculation: implications for functional brain imaging. *HFSP Journal* 2:79-98.
- Vanzetta I, Sloviter H, Omer DB, Grinvald A (2004) Columnar Resolution of Blood Volume and Oximetry Functional Maps in the Behaving Monkey: Implications for fMRI. *Neuron* 42:843-854.
- Victor JD, Blessing EM, Forte JD, Buzás P, Martin PR (2007) Response variability of marmoset parvocellular neurons. *The Journal of Physiology* 579:29-51.
- Weber B, Keller AL, Reichold J, Logothetis NK (2008) The Microvascular System of the Striate and Extrastriate Visual Cortex of the Macaque. *Cerebral Cortex* 18:2318-2330.
- Weinberg RJ (1997) Are Topographic Maps Fundamental to Sensory Processing? *Brain Research Bulletin* 44:113-116.
- Whelan G, James MF, Samson NA, Wood NI (1999) Anaesthesia of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using continuous intravenous infusion of alphaxalone/alphadalone. *Lab Anim* 33:24-29.
- Wiesel TN, Hubel DH, Lam DMK (1974) Autoradiographic demonstration of ocular-dominance columns in the monkey striate cortex by means of transneuronal transport. *Brain Research* 79:273-279.
- Williams AJ, Hunt DM, Bowmaker JK, Mollon JD (1992) The polymorphic photopigments of the marmoset: spectral tuning and genetic basis. *EMBO J* 11:2039-2045.
- Wong-Riley M (1979) Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Research* 171:11-28.

- Wong-Riley MT, Norton TT (1988) Histochemical localization of cytochrome oxidase activity in the visual system of the tree shrew: normal patterns and the effect of retinal impulse blockage. *J Comp Neurol* 278:633-634.
- Xiao Y, Wang Y, Felleman DJ (2003) A spatially organized representation of colour in macaque cortical area V2. *Nature* 421:535-539.
- Xiao Y, Casti A, Xiao J, Kaplan E (2007) Hue maps in primate striate cortex. *NeuroImage* 35:771-786.
- Xu X, Bosking WH, White LE, Fitzpatrick D, Casagrande VA (2005) Functional Organization of Visual Cortex in the Prosimian Bush Baby Revealed by Optical Imaging of Intrinsic Signals. *Journal of Neurophysiology* 94:2748-2762.
- Xu X, Bosking W, Sary G, Stefansic J, Shima D, Casagrande V (2004) Functional Organization of Visual Cortex in the Owl Monkey. *J Neurosci* 24:6237-6247.
- Yacoub E, Harel N, Ugurbil K (2008) High-field fMRI unveils orientation columns in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:10607-10612.
- Yeh T, Lee B, Kremers J, Cowing J, Hunt D, Martin P, Troy J (1995) Visual responses in the lateral geniculate nucleus of dichromatic and trichromatic marmosets (*Callithrix jacchus*). *The Journal of Neuroscience* 15:7892-7904.
- Yu H, Farley BJ, Jin DZ, Sur M (2005) The Coordinated Mapping of Visual Space and Response Features in Visual Cortex. *Neuron* 47:267-280.