

Das dorsale laterale Septum und seine Verarbeitung von hippokampalen Eingängen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Suncana van Hattem, geb. Novosel

aus Zagreb, Kroatien

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Heinz Walter Beck
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Steinhäuser

Tag der Mündlichen Prüfung: 01.03.2023

Aus dem Institut für experimentelle Epileptologie und Kognitionsforschung (IEECR)
Direktor: Prof. Dr. med. Heinz Beck

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	8
1.	Einleitung	10
1.1	Lernen und Belohnung	10
1.2	Hippokampus	13
1.3	Laterales Septum (LS)	16
1.3.1	Hippokampus-VTA Schleife	20
1.4	Ziele des Projektes	24
2.	Material und Methoden	25
2.1	Mäuse und Tierhaltung	25
2.2	Stereotaktische Virusinjektionen	25
2.2.1	Virale DNA-Vektoren	25
2.2.2	Virusinjektion	26
2.3	Präparation von Hirnschnittpräparaten für die elektrophysiologischen Messungen	28
2.4	Elektrophysiologische Versuche	28
2.4.1	„Whole-cell current-clamp“-Versuche	28
2.4.2	Bestimmung der passiven und aktiven Membraneigenschaften	30
2.4.3	Zelleigenschaften der SST ⁺ - und SST ⁻ -Neuronen	31
2.5	Optogenetische Stimulationsversuche	31
2.5.1	Stimulationsprotokolle	31
2.5.2	Prüfung des GABA _A -Rezeptor-Einflusses auf das CA3-dLS-Netzwerk	32
2.6	Morphologische Rekonstruktion der elektrophysiologisch untersuchten	

Neuronen	32
2.7 Immunhistochemische Färbungen	33
2.7.1 Perfusion der Mäuse	33
2.7.2 Immunohistochemische Färbungen	33
2.8 Datenanalyse und statistische Auswertung	34
3. Ergebnisse	36
3.1 Intrinsische physiologische Membraneigenschaften der Zellen im dLS	36
3.1.1 Zellpopulationen im dLS	36
3.1.2 Aktive und passive Membraneigenschaften der drei dLS-Zellpopulationen	37
3.1.3 Reaktion von HTB-Zellen auf höherfrequente Stimulationen	41
3.2 SST ⁺ - und SST ⁻ -Neuronen im dLS	44
3.3 Quantitative morphologische Eigenschaften der dLS-Neuronen	47
3.4 CA3-dLS-Verbindung	50
3.4.1 dLS-Input von CA3-Projektionsfasern	50
3.4.2 Abhängigkeit der EPSP-Amplitude im dLS von der zur Stimulation der CA3-Fasern verwendeten Laserintensität	50
3.4.3 Synaptische Kurzzeitplastizität im Theta-Bereich zwischen den CA3-dLS-Verbindungen	52
3.4.4 Einfluss des GABA _A -Rezeptor-Antagonisten Gabazine auf die CA3-dLS/HTB-Verbindung	55
4. Diskussion	60
4.1 Charakterisierung der Mehrheit der dLS-Neuronen als Burster	60
4.1.1 SST ⁺ -HTB-Neuronen des dLS	63
4.1.2 Morphologische Eigenschaften der HTB-dLS-Neuronen	65
4.1.3 Theta als führender Rhythmus der dLS-Neuronen	65

4.2	dLS als Filterstation zwischen Lernen und Belohnung	67
4.2.1	Theta als dominantes Stimulationsmuster der dCA3→dLS-Verbindung	68
4.2.2	Potenzieller Einfluss der GABA _A -Rezeptor-vermittelten Inhibition auf dCA3→dLS-Eingänge	70
4.3	Ausblick	71
5.	Zusammenfassung	73
6.	Abbildungsverzeichnis	74
7.	Tabellenverzeichnis	75
8.	Literaturverzeichnis	76

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit
ADP	Nachdepolarisationspotenzial
AHP	Nachhyperpolarisationspotenzial
AP	Aktionspotenzial
BI	Bursting-Index
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CC	Korpus callosum
ChR2	humanisierter lichtsensitiver Kationenkanal Channelrhodopsin-2
Cre	Zyklorkombinase
dLS	dorsales laterales Septum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dCA3	dorsales Cornu ammonis 3
EEG	Elektroenzephalogramm
EF-1 α	Elongation factor-1 alpha
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPSP	exzitatorische postsynaptische Potenziale
eYFP	enhanced yellow fluorescent protein
GABA	γ -Aminobuttersäure
GD	Gyrus dentatus
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
HTB	High-Threshold-Burster
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
loxP locus	locus of X-over P1
LS	laterales Septum

LTB	Low-Threshold-Burster
LTP	Langzeitpotenzierung
LV	lateraler Ventrikel
mAHP	mittleres Nachhyperpolarisationspotenzial
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	Boten-(engl. messenger) Ribonukleinsäure
MS	mediales Septum
Na ⁺	Natrium
NAc	Nucleus accumbens
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NC	Neokortex
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCr2Na	Dinatrium-phosphokreatin
rAAV	rekombinanter adeno-assoziiertes Virus
REM	Rapid-Eye-Movement
RF	regulär feuerende Neuronen
rLS	rostroventrales laterales Septum
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SPW-R	Sharp-Wave-Ripple-Komplexe
SST	Somatostatin
vLS	ventrales laterales Septum
vPal	ventrales Pallidum
vSub	ventrales Subikulum
VTA	Area tegmentalis ventralis
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Lernen und Belohnung

Das Lernen ist ein essenzieller, lebenslang stattfindender Prozess, der evolutiv gesehen elementar für die Entwicklung des Menschen ist. Das Erlernen von Fertigkeiten, die Erinnerung an bestimmte Orte oder an Ereignisse in der eigenen Biografie und damit das Sammeln von Erfahrungen sind für ein Individuum überlebenswichtig. Auf der Basis der Dauer der Informationsspeicherung wird zwischen Kurz- und Langzeitgedächtnis unterschieden. Das Kurzzeitgedächtnis speichert wenige Informationen, u. a. in Form von Wörtern, Zahlen oder Tönen (z. B. Telefonnummern) für nur einige Sekunden im Frontallappen (Atkinson und Shiffrin, 1971; Baddeley, 2012; Jonides et al., 2008). Dagegen kann im Langzeitgedächtnis Wissen dauerhaft gespeichert werden. Dabei lassen sich mit dem prozeduralen und deklarativen Gedächtnis zwei Langzeitgedächtnis-Systeme unterscheiden. Das prozedurale Gedächtnis – auch Verhaltens- bzw. implizites Gedächtnis – funktioniert oft unbewusst und ist für das Erlernen von Fertigkeiten und Gewohnheiten zuständig (z. B. Klavierspielen). Weiterhin umfasst es Lernmechanismen wie Habituation, Sensibilisierung sowie die klassische und operante Konditionierung (Birbaumer und Schmidt, 2010). Abhängig von der Aufgabe sind unterschiedliche Gehirnregionen beteiligt, u. a. das Cerebellum, der Hippokampus und der Neokortex spielen hier eine wichtige Rolle (Loprinzi und Edwards, 2018). Für die Thematik der vorliegenden Arbeit ist das explizite, deklarative Gedächtnis von Bedeutung. In diesem Teil des Gedächtnisses können Menschen bewusst Informationen über Gegenstände, Orte oder Personen abspeichern und auch wieder bewusst aufrufen. In dem Teilbereich des semantischen Gedächtnisses werden einzelne Fakten (z. B. Vokabeln) abgespeichert, im episodischen Gedächtnis beispielsweise kontextabhängige autobiografische Ereignisse (Schacter und Wagner, 2013). Für das deklarative Gedächtnis sind Hippokampus und Neokortex (insbesondere Temporal- und Frontalkortex) von besonderer Bedeutung. Das explizite Gedächtnis wird durch vier unterschiedliche Prozesse vermittelt. Zunächst erfolgt das Verschlüsseln (engl. encoding) neuer Informationen. Diese Informationen müssen längerfristig in einem Speicher verbleiben (engl. storage). Damit neue, noch nicht komplett gefestigte

Informationen auch stabil im Gedächtnis bleiben, müssen sie konsolidiert werden (engl. consolidation). Schließlich können diese abgespeicherten Informationen aktiv wiederaufgerufen werden (eng. retrieval).

Um ein Verhalten zu erlernen, als zielführend zu bewerten und entsprechend abzuspeichern, braucht es einen Verstärker, z. B. eine Belohnung. Diese positive Verstärkung erhöht die Wahrscheinlichkeit diese Informationen in ähnlichen Situationen (Assoziationen) wieder abzurufen. Die ersten Experimente zur Analyse des Zusammenhangs zwischen Belohnung und Lernen waren der Pavlovsche Hund und die Skinner-Box. In den Experimenten verstärkt die (potenzielle) Belohnung bestimmte Verhaltensweisen in Säugetieren im Sinne der klassischen und operanten Konditionierung (Pavlov, 1927). Positive Verstärker wie Belohnung sind für die Aufrechterhaltung grundlegender überlebenswichtiger Verhaltensweisen wie Essen, Trinken und Fortpflanzung von elementarer Bedeutung (Aharon et al., 2001; Dickson et al., 2011; Hurley et al., 2018). In der modernen Welt stellt Belohnung die Voraussetzung für den Konsum von Gütern und somit die Grundlage für den Fortbestand des Wirtschaftssystems dar (Erk et al., 2002; Weber et al., 2007). Positive Verstärker sind jedoch auch für pathologische Zustände wie die Entstehung und Aufrechterhaltung von Suchterkrankungen von großer Relevanz (Di Ciano und Everitt, 2004; Lu et al., 2003; Sartor und Aston-Jones, 2012).

Die elementare Säule von Belohnung im zentralen Nervensystem (ZNS) bildet das dopaminerge System, im Zusammenhang mit Lernen vornehmlich dopaminerge Projektionsneuronen aus dem Area tegmentalis ventralis (VTA). Dopamin fördert viele unterschiedliche Lernmechanismen des expliziten Gedächtnisses. Es ist an der synaptischen Langzeitpotenzierung (engl. long term potentiation, LTP), den kognitiven Reaktivierungsprozessen, der Darbietung bereits erlernter Gedächtnisinhalte, dem zielgerichtetem Handeln und kontextabhängigem Lernen, aber auch bei der Suchtentstehung beteiligt (Barco et al., 2002; Laurier et al., 1994; Li et al., 2003; McNamara et al., 2014; Schultz, 2010). Die Lernmechanismen werden sowohl über stimulatorische G-Protein gekoppelte D₁- als auch inhibitorische G-Protein gekoppelte D₂-Rezeptorgruppen generiert (Laurier et al., 1994). Wolfram Schultz und seine

Kollegen fanden heraus, dass Dopamin eine ganz besondere Aufgabe zukommt (Schultz et al., 1997). Durch Untersuchungen an Affen stellten sie fest, dass es nicht nur als Signal des Wohlbehagens, sondern ebenso als Vorhersagefehler-Signal dient, wobei die Aktivität dopaminergener Neuronen dann besonders stark war, wenn eine Diskrepanz zwischen der erwarteten und tatsächlichen Belohnung bestand (Schultz, 1997; 2010). Lernen bzw. Löschen von Informationen und Verhalten schreitet nach dem Vorhersagefehler also dann wesentlich fort, wenn ein Überraschungseffekt entsteht. Damit lieferten Schultz und Kollegen das biologische Korrelat zum Rescorla-Wagner-Modell. Diesem mathematischen Modell zufolge ist der Lernfortschritt (im Modell die Assoziationsstärke des konditionierten Reizes) umso stärker, je mehr sich die maximal mögliche und die gegenwärtige Assoziationsstärke voneinander unterscheidet (Rescorla und Wagner, 1972). Eine überraschende Diskrepanz zwischen der erwarteten und der erlebten Belohnung (sog. Vorhersagefehler) führt dem Modell zufolge zu einer signifikanten Verhaltensanpassung. Dieser Lernfortschritt wird Schultz (2016) zufolge durch die Aktivität dopaminergener Neuronen des VTA kodiert. Dopamin dient demzufolge als Assoziationsverstärker zwischen Reiz und der eigentlichen Belohnung. Der Vollständigkeit halber ist zu erwähnen, dass neben dem dopaminergen System weitere Dopamin-unabhängige Belohnungssysteme existieren (Giros et al., 1996).

Die vorliegende Arbeit thematisiert wichtige neuronale Strukturen, die das explizite episodische Gedächtnis mit dem dopaminergen Belohnungssystem verknüpfen: Deszendierende hippokampale Fasern verbinden den Hippokampus über eine Zwischenstation mit dopaminergen Neuronen des VTA.

Das VTA ist eine sehr heterogene Region mit nicht nur dopaminergen Neuronen (ca. 65 %), sondern auch Interneuronen mit dem Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) (ca. 33 %) und glutamatergen Neuronen. Das komplexe intrinsische Netzwerk projiziert in viele unterschiedliche Regionen. Dabei hängen die Ausgänge der dopaminergen VTA-Neuronen maßgeblich von deren Eingängen ab (Beier et al., 2015). Bedeutende Strukturen sind der Nucleus accumbens, der Motorkortex, das Striatum, das Pallidum, der entorhinale Kortex und der Hippokampus. Inputregionen sind mannigfaltig und betreffen u. a. auch den medialen prefrontalen Kortex, die Amygdala und den

Hypothalamus, wobei sich die Hälfte des Inputs der dopaminergen VTA-Neuronen in unmittelbarer anatomischer Nähe befindet (Beier, 2022; Mininni et al., 2018; Yetnikoff et al., 2014).

Innerhalb der Verbindung zwischen Hippokampus und VTA befindet sich das bisher kaum erforschte dorsale laterale Septum (dLS). Das dLS ist Ziel der meisten extrahippokampalen Projektionen der Pyramidenneuronen des dorsalen Cornu ammonis 3 (dCA3) und sendet viele Fasern zum VTA (Yetnikoff et al., 2014). Es wird vermutet, dass dieses Netzwerk eine Rolle bei der kontextabhängigen Steuerung zielgerichteten Verhaltens durch räumliche Stimuli einnimmt (Luo et al., 2011; McNamara et al., 2014). Luo et al. (2011) postulierten anhand von elektrophysiologischen, morphologischen und Verhaltensstudien, dass glutamaterge hippocampale Fasern inhibitorische Projektionsneuronen des dLS stimulieren, welche wiederum durch die Hemmung GABAerger Interneuronen dopaminerge Neuronen im VTA disinhibieren und damit zur indirekten Aktivierung dopaminergener Neuronen führen (Luo et al., 2011; Risold und Swanson, 1997b; Vega-Quiroga et al., 2017) (Abb. 2). Es ist bislang noch unbekannt, welche Funktion das dLS innerhalb dieses Netzwerks einnimmt und in welcher Weise die hippocampalen CA3-Eingänge im dLS verarbeitet werden.

1.2 Hippokampus

Der Hippokampus ist von zentraler Bedeutung für die Bildung und das Abrufen von Gedächtnisinhalten sowie die räumliche Orientierung. Die Funktion dieser Struktur wurde durch die Geschichte des Patienten Henry Gustav Molaison (1926–2008), kurz auch H.-M.-Patient genannt, deutlich. Der Patient litt über mehrere Jahre an einer Temporallappen-Epilepsie. Der Chirurg William Scoville entfernte daraufhin beide Hippokampi, was zwar zu einer deutlichen Besserung seiner Epilepsie, aber auch zu einer anterograden Amnesie führte. Daneben kam es zu einer partiellen retrograden Einschränkung 3 bis 4 Tage postoperativ. Das prozedurale Gedächtnis war von dem Eingriff nicht betroffen, während der Patient die Fähigkeit zur Neubildung von deklarativen Gedächtnisinhalten verlor. Der Patient konnte für den Rest seines Lebens keine neuen episodischen Informationen in seinem Langzeitgedächtnis abspeichern

(Scoville und Milner, 1957). In den 1970er-Jahren rückte der Hippokampus durch die Entdeckung der ‚Place-Cells‘ in Nagetieren durch O’Keefe und Dostrovsky (1971) vermehrt in den Fokus der Wissenschaft. Diese hippokampalen Neuronen sind besonders aktiv, wenn sich das Tier an einer bestimmten Stelle in seiner Umgebung befindet und kodieren somit die Position des Tieres. Basierend auf den ‚Place-Cells‘ entwickelten O’Keefe und Nadel (1978) ihre Theorie vom Hippokampus als kognitive Landkarte im Sinne eines semantischen Netzwerkes. In den Folgejahren wurde diese Hypothese durch weitere intensive Forschung am Hippokampus und die Entdeckung sogenannter ‚Head-direction-Cells‘ (Taube, 1995), ‚Grid-Cells‘ (Hafting et al., 2005) und ‚Border-Cells‘ (Barry et al., 2006) erweitert. Diese Ortsinformationen sind wichtig für autobiographische Erinnerungen, da sie als Kontext assoziativ mit anderen Informationen verknüpft und damit essenzieller Bestandteil des episodischen Gedächtnisses werden.

Als Teil des limbischen Systems befindet sich der Hippokampus im Temporallappen. Er besteht aus dem Hippokampus im engeren Sinne (Hippokampus proper oder Cornu ammonis), der bei Nagetieren in drei Unterregionen CA1–CA3 (CA für Cornu ammonis) eingeteilt wird sowie dem Gyrus dentatus (GD). Zur hippokampalen Formation gehören ebenso im weiteren Sinne das Subikulum, Presubikulum, Parasubikulum und der entorhinale Kortex (Amaral, 1993; Amaral und Lavenex, 2007; Stanfield und Cowan, 1979). Auffällig am neuronalen Netzwerk im Hippokampus ist der weitgehend gerichtete Informationsfluss der exzitatorischen Signale. Diese durchlaufen im Wesentlichen drei synaptische Übergänge, ehe sie den Hippokampus wieder in Richtung des entorhinalen Kortex verlassen.

Eine besondere Stellung im Hippokampus nimmt die CA3-Unterregion ein, deren Pyramidenzellen durch rekurrente Fasern mit benachbarten CA3-Neuronen, durch Schaffer-Kollateralen mit CA1-Neuronen sowie via Kommissuralfasern mit dem kontralateralen Hippokampus verbunden sind (Swanson et al., 1978). Durch diese ausgedehnten axonalen Verzweigungen zeigen CA3-Neuronen eine deutlich dichtere und stärkere intraregionale Konnektivität als Neuronen in anderen hippokampalen

Regionen auf. Die Verästelung der Axone einer einzelnen CA3-Pyramidenzelle deckt 2/3 des Volumens des Hippokampus ab (Lorente de Nó, 1934).

Aufgrund dieser besonderen anatomischen Gegebenheit mit vielen rekurrenten synaptischen Verbindungen zwischen den Pyramidenzellen, bildet die CA3-Region ein autoassoziatives Netzwerk das neue Informationseingänge anhand ähnlicher Strukturen in bereits abgespeicherten Informationen erkennt, zuordnet und aufruft (Buzsáki, 2006; Knierim und Zhang, 2012). Ein autoassoziatives Netzwerk ist für das Lernen neuer Informationen und das Erkennen eines bekannten Kontexts sowie die Integration dieser in bestehende Gedächtnisinhalte von Bedeutung und damit fundamental für das episodische Gedächtnis. Die Besonderheit des episodischen Gedächtnisses ist hierbei, dass es viele unterschiedliche Elemente miteinander verknüpfen und chronologisch ordnen muss (Duncan et al, 2011; Hasselmo und Schnell, 1994, Hasselmo et al., 1995; Lisman und Grace, 2005).

Des Weiteren ist die CA3-Region maßgeblich an der Entstehung der Sharp-Wave-Ripple-Komplexe (SPW-R) beteiligt. Diese hochfrequenten Oszillationen von 150 bis 250 Hz bestehen aus Sharp-Waves (negative Feldpotenziale im Stratum radiatum der CA1-Region mit großer Amplitude und 40–100 ms Dauer), die durch synchron aktive Afferenzen aus der CA3 evoziert werden sowie Ripples (kurze schnelle Oszillationen im Stratum pyramidale der CA1-Region). Sie treten insbesondere bei Inaktivität (z. B. Schlaf- oder wachen Ruhephasen) auf und sind maßgeblich an Prozessen der Gedächtniskonsolidierung beteiligt (Bliss und Lomo, 1973; Bragin et al., 1999; Buhry et al., 2011; Buzsáki et al., 1983; Buzsáki, 1986, 2015; Cheng und Frank, 2008; Diekelmann und Born, 2010; Lee et al., 2006; McClelland et al., 1995; O'Keefe, 1976; Singer und Frank, 2009). Darüber hinaus beeinflussen sie möglicherweise auch schnelle aktive Entscheidungsfindungen durch Integration neu erworbener und vorhandener Gedächtnisinhalte (Buzsáki, 2015; Yu und Frank, 2014). Da, wie bereits oben ausgeführt, die Pyramidenzellen der CA3-Region bedeutende Efferenzen im dLS ausbilden, können Informationen über das dLS subkortikal gelegene Strukturen, wie dem zum Belohnungssystem gehörendem VTA oder Kerngebiete des lateralen Hypothalamus erreichen (Carus-Cadavieco et al., 2017; Knowland und Lim, 2018). Diese anatomische Gegebenheit könnte bei der Integration von belohnungsassoziiertem Kontext für die Belohnungserwartung eine Rolle spielen. Mit ihren kollateralen

Verbindungen fungiert die CA3-Region als autoassoziatives System, das schnelle Assoziationen zwischen Objekt, Ort und Belohnung erlaubt (Rolls, 2013). Hier stellt sich die Frage, inwieweit das dLS diese Informationen verarbeitet und welche Rolle es als Verbindungsstation zum VTA einnimmt.

1.3 Laterales Septum (LS)

Das Septum befindet sich subkortikal im Telenzephalon. Beim Menschen liegt das Septum verum in der Nähe des Genu des Korpus callosum rostral der Kommissura anterior, in Nagetieren unmittelbar unterhalb des Korpus callosum zwischen dem ersten und zweiten Ventrikel (Andy und Stephan, 1968; Patestas und Gartner, 2011; Sarwar, 1989). Das Septum besteht aus einem medialen (MS) und lateralen (LS) Teil. Beide unterscheiden sich in ihren Verbindungen zu anderen Hirnregionen, z. B. zum Hippokampus, aber auch in ihren neurochemischen Charakteristika (Amaral und Kurz, 1985; Risold und Swanson, 1997a, 1997b; Woolf, 1991). Das MS schickt aufsteigende Fasern zum Hippokampus, während das LS vornehmlich absteigende Fasern vom Hippokampus erhält. In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf dem LS, weshalb auf diese Struktur im Folgenden ausführlicher eingegangen wird. Das LS ist eine heterogene Region mit unterschiedlichen Neuronentypen. Die meisten Neuronen sind GABAerge Projektionsneuronen. Viele Neuronen senden jedoch auch rekurrente Fasern zu den Dendriten anderer LS-Neuronen (Onténiente et al., 1987; Phelan et al., 1989). Vereinzelt wurde auch messenger Ribonukleinsäure (mRNA) für vesikuläre Glutamat-Transporter in LS-Neuronen nachgewiesen, ein Hinweis für einige glutamaterge Neuronen im LS (Lin et al., 2003). Das LS wurde von Risold und Swanson (1997b) beruhend auf der anatomischen Lage, der Ein- und Ausgänge und der Expression bestimmter mRNA und/oder Proteine in drei Subregionen eingeteilt: rostroventrales LS (rLS), ventrales LS (vLS) und dorsales LS (dLS) (Abb. 1, Tab. 1). Alonso und Frotscher (1989) charakterisierten rein qualitativ die Morphologie der Neuronen dieser Gebiete mittels Golgi-Färbung und Elektronenmikroskopie (Tab. 1).

Das rLS erhält insbesondere Input von der CA1-Region und dem Subikulum. Die Fasern der rLS-Neuronen projizieren vornehmlich in den anterioren Hypothalamus pars

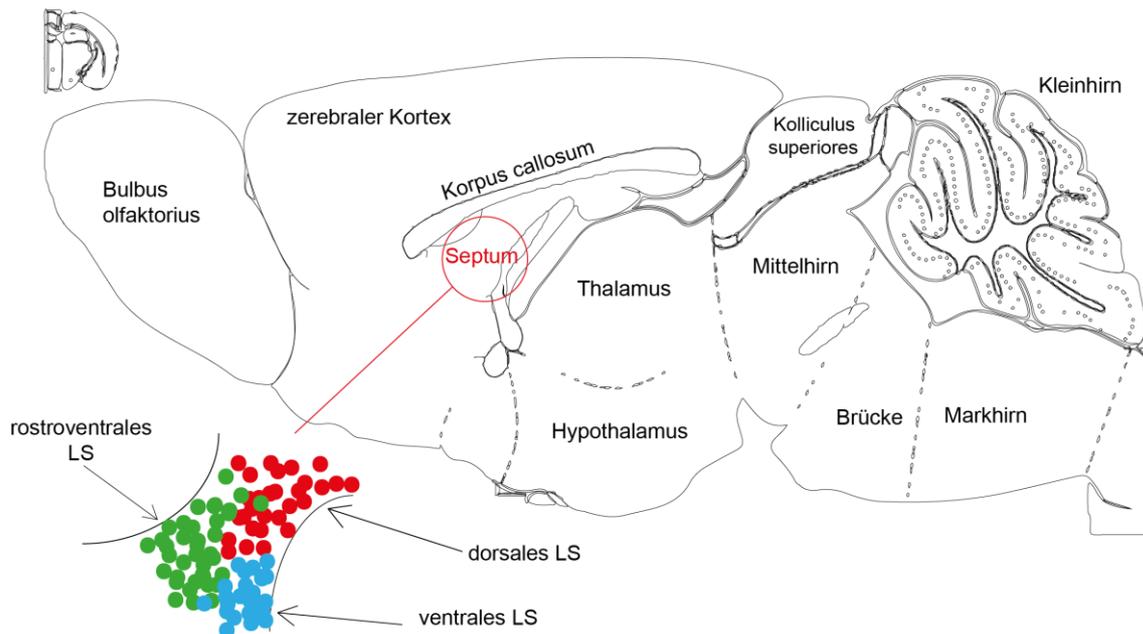


Abb. 1: Subregionen des lateralen Septums (LS) (eigene Darstellung)

Schematische Darstellung eines Mäusegehirns im Sagittalschnitt 0,24 mm von der Mittellinie entfernt mit Lokalisation der drei Untergruppen des LS. Oben links: Höhe des Sagittalschnittes in frontaler Ebene. Der rote Kreis markiert das Septum. Unten links ist das Septum vergrößert mit drei Subregionen nach Risold und Swanson (1997b) dargestellt: rostroventrales LS (rLS, grün), ventrales LS (vLS, blau) dorsales LS (dLS, rot).

posteriores sowie in den lateralen Hypothalamus. Funktionell spielt dieses Gebiet eine Rolle in der Modulation von Bewegung (Risold und Swanson, 1997b). Das vLS erhält wie das rLS Input von der CA1-Region und dem Subikulum, jedoch primär von deren ventralen Anteilen. Es ist in viszeromotorische und endokrinologische Prozesse involviert (Swanson et al., 1984, 1987). Die weiteren Charakteristika der rLS- und vLS-Gebiete sind in Tab. 1 gelistet. Das dLS ist die größte nichthippokampale Output-Region der dCA3. Es innerviert u. a. den lateralen Anteil des Nucleus supramammilaris, den lateralen Hypothalamus und das VTA (Risold und Swanson, 1997b). Morphologisch lassen sich zwei Zelltypen beschreiben. Von den Typ-I-Neuronen mit großen ovalen oder runden Somata gehen meist drei bis fünf sehr dicke Dendriten ab, die sich wenig verzweigen, jedoch viele Dornfortsätze mit kurzem Schaft aufweisen und asymmetrische Synapsen formen (Gray Typ I). Der am häufigsten vorkommende Zelltypus im LS sind die Typ-II-Neuronen. Deren Soma ist zumeist rund oder dreieckig mit bis zu fünf

Dendritenabgängen. Die Dornfortsätze mit oft langen Stielen zeigen eine große Variabilität in der Dichte entlang der Dendriten und sind vielfach schon im somanahen Bereich erkennbar. Viele kleine Verästelungen zweigen von den Dendriten erster Ordnung ab. Das Axon ist schwierig rekonstruierbar, scheint aber in Richtung des MS und des diagonalen Bands von Broca orientiert (Alonso und Frotscher, 1989). Die dLS-Neuronen synthetisieren mRNA für das Peptid Somatostatin (SST) (Risold und Swanson, 1997a).

Zusätzlich zur Diversität bezüglich der Ein- und Ausgänge sowie der Morphologie weisen dLS-Neuronen auch physiologische Unterschiede auf. Gallagher et al. (1995) charakterisierten im dLS durch elektrophysiologische Versuche drei Neuronentypen anhand ihrer aktiven Membraneigenschaften. Grob unterteilten sie die Neuronen in Burster und Nichtburster. Als Burster wurden Neuronen bezeichnet, die während längerer Depolarisation mindestens vier Aktionspotenziale (AP) mit einer Frequenz von >20 Hz erzeugen. Das sogenannte Bursting, also das Generieren mehrerer AP mit hoher Frequenz auf einen einzelnen Stimulus, spielt eine Rolle bei der Weiterleitung und Verarbeitung von Informationen, aber auch bei Krankheiten wie der Epilepsie (Lisman, 1997; Sanabria et al., 2001). Meist kommt es durch Interaktion zwischen intrinsischen und extrinsischen Mechanismen zum Bursting-Phänomen. Zu den intrinsischen Eigenschaften, die das Bursting fördern, gehören eine langsame Depolarisation der Neuronen (Masukawa und Prince, 1984), T-Typ Ca^{2+} -Kanäle (White et al., 1989; Yaari et al., 2007), Ca^{2+} -aktivierte Kaliumkanäle (Ji und Shepard, 2006), persistierende Na^{+} -Ströme (Chen et al., 2011) und N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA) (Abraham und Kairiss, 1988; Deister et al., 2009). Mögliche extrinsische Mechanismen sind Neuromodulatoren oder eine Verschiebung extrazellulärer Elektrolyt-Konzentrationen (z. B. K^{+}) (Jensen et al., 1994; Wang und McCormick, 1993).

Die von Gallagher et al. (1995) als Typ-III-Neuronen klassifizierten Burster machen ca. 15 % aller dLS-Neuronen aus, zeigen zumeist kein Nachhyperpolarisationspotenzial (engl. afterhyperpolarization potential, AHP), jedoch eine langsame Nachdepolarisation (ADP) im Anschluss an ein AP, was die Generierung von Bursts begünstigt. Vornehmlich generieren sie AP im Theta-Bereich (4–12 Hz). Zu den Nichtburstern gehören Typ-I- und Typ-II-Neuronen.

Tab. 1: Charakteristika der Subregionen des lateralen Septums (LS)

Die Charakterisierung der drei Subregionen erfolgte entsprechend der qualitativen Beschreibung der Neuronenmorphologie (Alonso und Frotscher, 1989), der afferenten und efferenten Projektionen (Risold und Swanson 1997b), der mRNA-Expression von für die Subregion charakteristischen Markern (Risold und Swanson, 1997a) sowie der funktionellen Einbindung der Subregion (Sheehan, 2004).

Rostroventrales LS
<p>Morphologie der Neuronen: Typ I: mittelgroßes eiförmiges Soma, mittlere Anzahl an Dornfortsätzen, Orientierung: vom dLS in Richtung MS, viele Synapsen mit Dornfortsätzen und Stielen Typ II: Soma rund oder dreieckig, bis 5 Dendritenabgänge vom Soma, mittlere Anzahl an Dornfortsätzen mit langen Stielen, große Variabilität der Dendriten, viele kleine Verästelungen der Dendriten 1. Ordnung, Axon in Richtung MS und diagonalem Band von Broca, häufigster Typ im rLS</p> <p>Eingänge aus: CA1, Subiculum Ausgänge zu: Area praeoptica lateralis, anteriorer Hypothalamus pars posteriores, lateraler Hypothalamus Marker (mRNA-Expression): Enkephalin, Neurotensin Funktionell beteiligt an: Bewegungsmodulation</p>
Ventrales LS
<p>Morphologie der Neuronen: unterschiedlich geformt, kleinste Somata der drei Gebiete mit kürzeren Dendriten, sehr variable Dendritenform, -anzahl und -dichte Eingänge aus: ventrale CA1, ventrales Subikulum Ausgänge zu: Nucleus praeopticus, periventriculäre Zone des Hypothalamus Marker (mRNA-Expression): Östrogen-Rezeptor Funktionell beteiligt an: viszeromotorischen/endokrinologischen Prozessen</p>
Dorsales LS
<p>Morphologie der Neuronen: Typ I: große ovale/runde Somata, drei bis fünf sehr dicke Dendriten 1. Ordnung, wenige Verzweigungen der Dendriten, sehr viele Dornfortsätze mit kurzem Schaft, alle Dendriten mit asymmetrischen Synapsen (Gray Typ I) Typ II: wie die Typ-II-Neuronen des rLS, häufigster Typ im dLS Eingänge aus: CA3 Ausgänge zu: Nucleus supramammilaris, lateraler Hypothalamus, VTA Marker (mRNA-Expression): Somatostatin Funktionell beteiligt an: belohnungs-assoziertem Lernen</p>

Typ-I-Neuronen mit einem großen AHP und einer fehlenden ADP machen ca. 20 % der Gesamtneuronen aus. Typ-II-Neuronen wurden primär als Nichtburster klassifiziert, die weder ein ausgeprägtes AHP noch ADP aufweisen und die sich durch ein gleichmäßiges Generieren von AP auszeichnen. Diese Gruppe von Neuronen konnte

aber in vitro unter dem Einfluss von Modulatoren wie beispielsweise Muscarin, einem Acetylcholin verwandten Stoff, bursten. Gallagher et al. (1995) ordneten ca. 60–70 % der dLS-Neuronen den Typ-II-Neuronen zu.

Pedemonte et al. (1998) untersuchten die Aktivität von dLS-Neuronen in vivo bezüglich ihrer Korrelation mit lokalen Feldpotenzialableitungen im Hippokampus. Hierbei zeigte sich, dass ca. 68 % der dLS-Neuronen AP zumeist als Bursts in Korrelation zum hippocampalen Thetarhythmus generierten, während ca. 32 % der Neuronen unabhängige Aktivität in Form einzelner AP aufwiesen. Die theta-korrelierte Burstaktivität von dLS-Neuronen, so Pedemonte et al. (1998), könnte in deren Zielgebieten einen starken und zuverlässigen Einfluss hippocampaler Aktivitätsmuster sicherstellen und gleichzeitig als Feedbackmechanismus dienen.

1.3.1 Hippokampus-VTA-Schleifen

Die Interaktion zwischen dem Hippokampus und dem VTA, und damit dem dopaminergen System, könnte einerseits für das Erinnern und die Integration neuer belohnungsassoziierter Informationen, andererseits auch für kontextabhängiges zielgerichtetes Handeln durch bereits bekannte Informationen von Bedeutung sein (Luo et al., 2011; McNamara et al., 2014). Dabei scheint der Informationsfluss vom Hippokampus zum VTA bei diesen beiden Funktionen unterschiedliche Wege zu nehmen.

In Bezug auf die Integration belohnungsassoziierter bislang unbekannter Informationen und deren Konsolidierung geht man davon aus, dass der Informationsfluss in Form einer Schleife verläuft, obwohl dopaminerge Neuronen vornehmlich keine geschlossenen Netzwerke bilden (Menegas et al., 2015). Zunächst werden im Hippokampus neue, noch nicht gespeicherte Informationen erkannt und gelangen vom Subikulum über den Nucleus accumbens (NAc) und das ventrale Pallidum (vPal) zum VTA. Dieses projiziert wiederum zurück zum Hippokampus und verstärkt durch Dopamin-Freisetzung z. B. LTP und Reaktivierungsprozesse (Lisman und Grace, 2005; McNamara et al., 2014). Dabei wird davon ausgegangen, dass das ventrale Subikulum (vSub) exzitatorische

glutamaterge Fasern zum NAc schickt, dieser wiederum hemmt das vPal, wodurch die tonische Inhibition der dopaminergen VTA-Neurone aufgehoben und Dopamin ausgeschüttet wird (Floresco et al., 2001, 2003; Legault und Wise, 2001) (Abb. 2). Daraufhin stimuliert das VTA D₁- und D₅-Rezeptor-abhängig wieder den Hippokampus, insbesondere die CA1-Region (Lisman und Grace, 2005; McNamara et al., 2014). Ergänzend ist hier anzumerken, dass die dopaminergen Eingänge im Hippokampus aus dem VTA jedoch rar sind und dopaminerge VTA-Neuronen, die von vPal-Neuronen innerviert werden, ebenso zum medialen präfrontalen Kortex und der Amygdala sowie auch dem NAc projizieren (Beier et al., 2015; 2019; Kempadoo et al., 2016; Menegas et al., 2015; Takeuchi et al., 2016).

Unabhängig vom Netzwerk bestehend aus vSub→NAc→vPal→VTA kann der Informationsfluss vom Hippokampus zum VTA auch einen bisher wenig erforschten Weg nehmen. Luo et al. (2011) zeigten, dass eine von dem bisher bekannten neuronalen Weg unabhängige Verbindung von der dCA3-Region über das dLS zum VTA existiert. Diese spielt im Gegensatz zum vSub→NAc→vPal→VTA-Weg weniger eine Rolle in der Konsolidierung neuer belohnungsassoziierter Informationen, sondern scheint primär für kontextinformiertes zielgerichtetes Handeln verantwortlich zu sein. Die Stimulation von dCA3-Neuronen aktiviert die GABAergen Neuronen im dLS, die wiederum nichtdopaminerge, vermutlich GABAerge Neuronen, im VTA inhibieren und dadurch deren tonische Inhibition auf dopaminerge VTA-Neuronen aufheben (Abb. 2). Diese dopaminergen VTA-Neuronen projizieren dann u. a. weiter zum medialen präfrontalen Kortex, der wichtig für die Integration und emotionale Bewertung von Gedächtnisinhalten ist (Beier et al., 2019). Anders als beim vSub→NAc→vPal→VTA findet hier die Disinhibition aber auf VTA-Ebene und nicht auf vPal-Ebene statt (Luo et al., 2011). Vor dem Hintergrund der Relevanz des Hippokampus für die Verarbeitung und Erkennung kontextabhängiger Informationen und der Bedeutung dopaminergere VTA-Neuronen für verstärkende Effekte bei Suchtverhalten untersuchten die Autoren die Auswirkung der Hemmung einzelner Komponenten dieser Verbindung auf den kontextabhängigen Kokain-Konsum in Ratten. Die regionspezifische Inhibition erfolgte dabei durch intrazerebrale Injektion des GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen und des GABA_A-Rezeptor-Agonisten Muscimol, entweder bilateral in die dCA3-Region oder ins dLS der einen und das VTA der anderen Hemisphäre. Beide Arten der Inhibition unterbanden

das erlernte Suchtverhalten signifikant, wodurch Luo et al. (2011) die Bedeutung der dCA3→dLS→VTA-Verbindung für die Verknüpfung von kontextabhängigen Informationen aus dem Hippokampus mit dem dopaminergen Belohnungssystem verifizierten. Detailliertes Wissen zur konkreten Funktionsweise des dLS und die Interaktion einzelner Komponenten dieser Verbindung würde somit einen Beitrag zum Verständnis kontextabhängigen Verhaltens leisten.

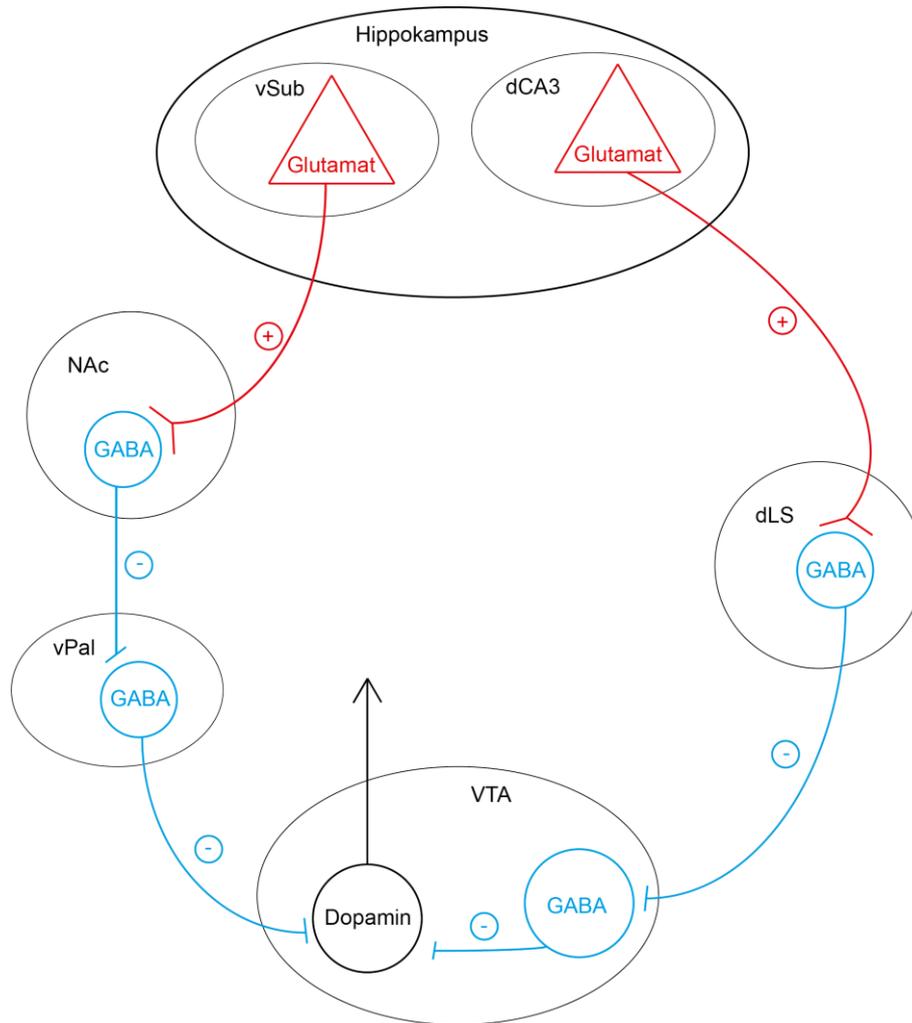


Abb. 2: Hippokampus-VTA-Verbindungen, links nach Floresco et al. (2001, 2003) und rechts nach Luo et al. (2011)

Schematische Darstellung der Verbindungen des Hippokampus mit dem VTA. Hippokampale Pyramidenzellen (rot, glutamaterg) erregen (+) GABAerge (blau) Projektionsneuronen im NAc bzw. dLS, die wiederum GABAerge Neuronen im vPal bzw. VTA inhibieren. Dies führt schließlich zur Disinhibition dopaminerger VTA-Neuronen und damit zu einer Erhöhung ihrer Aktivität.

1.4 Ziele des Projektes

Die Verbindung der hippocampalen dCA3-Region mit dem dopaminergen Belohnungssystem des VTA über das dLS könnte für das kontextinformierte zielgerichtete Handeln von großer Bedeutung sein (s. Kap. 1.3.1). Dabei wurde die dCA3-dLS-Verbindung bisher wenig erforscht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die intrinsischen Eigenschaften dLS-Neuronen untersucht werden, insbesondere hinsichtlich ihrer Funktion einer effizienten Hemmung GABAerger Neuronen im VTA. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob SST⁺-Neuronen hier eine Sonderstellung zukommt.

Dabei wurden erstmals spezifische dLS-Neuronen (SST⁺-Neuronen) mittels eines ‚Zyklorkombinase (Cre) / locus of X-over P 1 (loxP)‘-Systems markiert und mittels der ‚Whole-cell current-clamp‘-Methode elektrophysiologisch charakterisiert.

Folglich stellte sich die Frage, wie die dCA3-Eingänge durch die zuvor herausgearbeiteten intrinsischen Eigenschaften der dLS-Neuronen beeinflusst werden. Hier sollten sehr spezifisch die dCA3-Eingänge auf dLS-Neuronen untersucht werden, wofür optogenetische Methoden genutzt wurden. Ziel war es weiterhin zu erfahren, ob inhibitorische Mechanismen eine Rolle bei der Transmission von CA3-Impulsen auf dLS-Neuronen spielen.

Diese Arbeit leistet somit einen Beitrag, um Forschungslücken über das dLS zu füllen und ermöglicht weitergehende Untersuchungen zur Rolle des dLS für das kontextabhängige belohnungsassoziierte Handeln.

2. Material und Methoden

2.1 Mäuse und Tierhaltung

C57B6/N-Mäuse

Mäuse der Zuchtlinie C57B6/N wurden von der Firma Charles River aus Erkrath bezogen. Es wurden weibliche und männliche Tiere im Alter von 7–12 Wochen verwendet.

SST-Cre-Mäuse

Bei den SST-Cre-Mäusen (C-SST^{tm1Npa}, Novartis Pharma; MTD 36044) wurde das Transgen für Cre-Rekombinase in das endogene Somatostatin-Gen eingefügt, was zum Verlust der SST-Expression von diesem Allel führt. Hemizygote SST-Cre-Mäuse entwickeln sich jedoch normal und sind fruchtbar. Für die Experimente wurden weibliche und männliche hemizygote Tiere im Alter von 8–10 Wochen verwendet.

Alle Tierexperimente fanden in Übereinstimmung mit den Tierschutzrichtlinien der Universität Bonn nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (AZ 84-02.04.2014.A254) statt. Die Tiere wurden in konventionellen Käfigen für Labormäuse allein oder in Gruppen von bis zu vier Tieren mit einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Den Tieren standen Standardfutter (Altromin 1324, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage) und Wasser unbegrenzt zur Verfügung.

2.2 Stereotaktische Virusinjektion

2.2.1 Virale DNA-Vektoren

Zur Analyse der CA3-Eingänge im dLS wurden stereotaktische Injektionen eines rekombinanten adeno-assoziierten Virus (rAAV) in die dorsale CA3-Region von C57B6/N-Mäusen durchgeführt. Das rAAV diente als Vektor zur Transduktion eines Fusionsproteins aus dem humanisierten lichtsensitiven Kationenkanal

Channelrhodopsin-2 (ChR2) mit einer H134R-Mutation für eine schnellere lichtinduzierte Membrandepolarisation (Nagel et al., 2005) und einem grün-gelb fluoreszierenden Protein (enhanced yellow fluorescent protein, eYFP), um ChR2-exprimierende Zellen zu markieren. Die Expression erfolgte unter dem humanen Synapsin-Promotor. Das Plasmid (Addgene 26973) wurde von Karl Deisseroth (Stanford Universität, Kalifornien, USA) zur Verfügung gestellt. Die Virusherstellung und -aufreinigung erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Schoch (Universität Bonn).

Zur spezifischen Analyse der SST⁺-Neuronen im dLS wurden stereotaktische rAAV-Injektionen an SST-Cre-Tieren vorgenommen, wobei der rAAV als Vektor zur Transduktion eines rot fluoreszierenden Proteins (mCherry oder tdTomato) diente. Für eine spezifische Expression in SST⁺-Neuronen war die Fluoreszenzprotein-kodierende Desoxyribonukleinsäure (DNA) im Plasmid entgegengesetzt der Leserichtung angeordnet und an beiden Seiten mit zwei inkompatiblen loxP-Sequenzen versehen. Dadurch konnte eine Expression erst nach Modifikation der DNA durch die Cre-Rekombinase (also nur in SST⁺-Neuronen) unter dem humanen Elongation-factor-1 alpha (EF-1 α)-Promotor erfolgen. Das Plasmid für mCherry (Addgene 20299) wurde von Karl Deisseroth zur Verfügung gestellt. Die Virusherstellung erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Schwarz (Universität Bonn). Das Plasmid für tdTomato wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Schoch (Universität Bonn) zur Verfügung gestellt und die Virusherstellung erfolgte ebenfalls in dieser Arbeitsgruppe.

2.2.2 Virusinjektion

Die stereotaktische Injektion der AAV-Partikel erfolgte im Alter von 7–10 Wochen. Die Tiere wurden mit einer Lösung aus 0,05 mg/kg Fentanyl, 5,0 mg/kg Midazolam (beides Rotexmedica, Trittau) und 0,5 mg/kg Medetomidin (Domitor[®], Orion Pharma, Orionintie, Finnland) mittels intraperitonealer Injektion (0,1 ml/10 g Körpergewicht) anästhesiert. Nachdem kein Zwischenzehenreflex mehr auslösbar war, wurde das Operationsfeld rasiert und es wurden die Augen zum Schutz vor Austrocknung mit einer Augensalbe (Bepanthen[®], Bayer, Leverkusen, Deutschland) bedeckt. Die Tiere wurden in einen stereotaktischen Operationsrahmen (Modell 902, Kopf Instruments, Tujunga, USA) eingespannt und während der gesamten Operation auf einem regulierbaren

Temperaturkissen gelagert, um sie vor Auskühlung zu schützen. Die Schädelhaut wurde mit dem Lokalanästhetikum Lidocain (10 % Xylocain® Pumpspray, AstraZeneca, London, Großbritannien) betäubt und nach 60 s Einwirkzeit mit Povidon-Iod (BetaisodonaXylocain®, Mundipharma GmbH, Limburg (Lahn)) desinfiziert (Einwirkzeit 90 s). Nach Inzision der Schädelhaut wurden die Schädeluturen Bregma und Lambda identifiziert und der Schädel wurde so ausgerichtet, dass beide auf derselben Höhe waren. Die antero-posterioren und medio-lateralen Koordinaten wurden auf der Schädeloberfläche markiert (CA3: 2 mm posterior und 2,2 mm lateral, dLS: 0 mm posterior und 0,9 mm lateral; Angaben relativ zu Bregma) und die Trepanationen an diesen Markierungen erfolgten mittels eines feinen Dentalbohrers (Fine Science Tools, Foster City, USA). Die Injektion erfolgte mittels einer Injektionspumpe (Modell Micro4, World Precision Instruments, Sarasota, USA) und einer Präzisionspritze (Kanüle 34G) in die CA3-Region senkrecht unter der Trepanation in einer Tiefe von 2,2 mm bzw. in das dLS in einem Winkel von 25° (lateral → medial) und einer axialen Tiefe von 3 mm. Vor jeder Injektion wurde die Durchlässigkeit der Kanüle geprüft, das Injektionsvolumen betrug 500 nl in der CA3-Region (50 nl/min) und 600 nl im dLS (60 nl/min). Vor der Virusinjektion wurde 5 min gewartet, um eine vollständige Auffaltung des Gewebes zu garantieren, nach der Injektion wurde die Injektionsnadel für 5 min an der Stelle belassen, um ein Zurückfließen des Virus zu vermeiden. Schließlich wurde die Schädelhaut mit einem resorbierbaren Faden (Vicryl Plus 5-0, Johnson & Johnson, New Brunswick, USA) mit Einzelknopfnähten geschlossen und die Wunde mit einer antibiotischen Salbe (Refobacin® Creme, Allmiral Hermal GmbH, Reinbeck) versorgt. Nach dem Eingriff wurden die Anästhetika mit 1,2 mg/kg Naloxon (Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg), 0,5 mg/kg Flumazenil (Hikma, Fervenca, Terrugem SNT, Portugal) und 2,5 mg/kg Atipamezolhydrochlorid (Antisedan®, Orion Pharma, Espoo, Finnland) antagonisiert (0,1 ml/kg Körpergewicht). Des Weiteren erhielten die Tiere intrakutan das Analgetikum Ketoprofen (Gabrilen®, mibe GmbH, Brehna; 5 mg/kg, 0,1 ml/kg Körpergewicht).

Die Tiere wurden für 1 bis 2 h bis zum Abklingen der Anästhesie auf einem Heizkissen (ThermoLux®, Wärmeunterlage, Witte + Sutor GmbH, Murrhardt) gelagert.

Die elektrophysiologischen Versuche wurden 3–6 Wochen nach der Injektion durchgeführt.

2.3 Präparation von Hirnschnittpräparaten für die elektrophysiologischen Messungen

Zur Gewinnung der Gehirne wurden die Tiere für mindestens 30 s mit Isofluran (Forene, AbbVie, Ludwigshafen) in einer geschlossenen Kammer anästhesiert. Nachdem keine Schmerzreflexe mehr auslösbar waren, wurden die Tiere mittels Schere dekapitiert. Das Gehirn wurde zügig und möglichst ohne mechanischen Stress aus der Schädelgrube freipräpariert und in eine mit Carbogen begaste (95 % O₂, 5 % CO₂; Linde, Bonn) auf ca. 4 °C abgekühlte Sucrose-Lösung gelegt.

Die Sucrose-Lösung enthielt (in mM): 100 Sucrose, 60 NaCl, 26 NaHCO₃, 20 D-Glucose, 5 MgCl₂ · 6 H₂O, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 1 CaCl₂ · 2 H₂O.

Nach Entfernung von Cerebellum und Hirnstamm wurde das Gehirn mit der kaudalen Seite (Occipitalcortex) auf die Schneideplattform geklebt (Pattex Sekundenkleber, Henkel, Düsseldorf). Mit einem Vibratom (Microm HM 650 V, Thermo Fisher Scientific, Walldorf) wurden 300 µM dicke coronare Schnitte auf Höhe des dLS erstellt. Dabei befand sich das Gehirn in der gekühlten, mit Carbogen begasten Sucroselösung. Die Schnitte wurden in einer Aufbewahrungskammer in einem auf ca. 35°C erwärmten Wasserbad (Sonorex Super RK 102 H, Bandelin, Berlin) mit Carbogen begaster Sucroselösung für 30 min inkubiert und anschließend in einer anderen Aufbewahrungskammer bei Raumtemperatur in einer mit Carbogen begasten, artifiziellen zerebrospinalen Flüssigkeit (ACSF) für mindestens 30 min belassen, ehe sie für elektrophysiologische Versuche verwendet wurden.

Das ACSF bestand aus (in mM): 125 NaCl, 26 NaHCO₃, 15 D-Glucose, 3,5 KCl, 2 MgCl₂ · 6 H₂O, 2 CaCl₂ · 2 H₂O, 1,25 NaH₂PO₄.

2.4 Elektrophysiologische Versuche

2.4.1 ‚Whole-cell current-clamp‘-Versuche

Für die elektrophysiologischen Messungen wurde jeweils ein Hirnschnitt in eine Messkammer mit kontinuierlichem Durchfluss von ACSF (3 ml/min) überführt. Die Kammer war in ein Mikroskop integriert (Zeiss Axioskop FS) und temperiert (35 ± 1 °C, Temperaturkontroller III, Luigs und Neumann, Ratingen). Die Visualisierung der

Neuronen erfolgte mit nah-infraroter Beleuchtung, Differentialinterferenzkontrast (TILL Photonics, Gräfelfing), einem Wasserimmersionsobjektiv (Olympus 60 x/NA 0.9, Tokyo, Japan) und einer TILL-IMAGO Kamera (ebenfalls TILL Photonics, Gräfelfing). Der Nachweis der Expression von ChR2 bzw. tdTomato / mCherry erfolgte mittels Epifluoreszenz (Filter für ChR2-eYFP (in nm): Exzitation: 500/24; Dichroischer Spiegel: 520; Emission: 542/27; Filter für tdTomato / mCherry (in nm): Exzitation: 562/20, Dichroischer Filter: 593, Emission: 640/75). Für die ‚Whole-cell current-clamp‘-Versuche wurden Pipetten aus Borosilikatglas-Kapillaren (GB150F-8P, Science Products, Hofheim) mit einem horizontalen Pipettenpuller (Sutter Instruments, Model P-97, Novato, USA) gezogen. Der Elektrodenwiderstand in der Badlösung betrug 3–6,5 M Ω .

Die Pipetten-Innenlösung bestand aus (in mM): 140 K-Gluconate, 10 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 0,16 Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA), 0,5 MgCl₂, 5 Dinatrium-phosphokreatin (PCr2Na).

Der pH-Wert wurde mit KOH (1 mol/l) auf 7,27–7,33 adjustiert. Die Osmolalität wurde mit Sucrose auf 288–293 mOsmol/kg eingestellt. Vor den Messungen wurde die Innenlösung mit einem Zentrifugal-Filter filtriert. Das kalkulierte Übergangspotenzial für die Lösungen betrug 17 mV und wurde bei der Analyse mathematisch berücksichtigt.

Die somatischen ‚Whole-cell current-clamp‘-Ableitungen wurden mit einem BVC-700A Verstärker (Dagan Corporation, Minneapolis, Minnesota, USA) durchgeführt. Die ‚Whole-cell‘-Konfiguration wurde im ‚Voltage-clamp‘-Modus hergestellt. Nach Umschaltung auf den ‚Current-clamp‘-Modus, wurde die Brückenbalance kontrolliert und kompensiert.

Der Serienwiderstand betrug 5–25 M Ω , abweichende Werte führten zum Abbruch der Messung.

Die Signale wurden gefiltert (10 kHz Tiefpass) und mit einem Analog-Digital-Wandler (Digidata 1440 (Molecular Devices, CA, USA) digitalisiert (100 kHz). Kontrolle des Membranpotenzials, Speicherung der Signale und ein Teil der Analyse erfolgten mittels pClamp Software (Version 10.2, Molecular Devices), zusätzlich wurde zur Analyse das Programm IgorPro (Wavemetrics, Lake Oswego, Oregon, USA) herangezogen. Neuronen mit einem Membranpotenzial positiver -60 mV wurden von der Analyse ausgeschlossen.

2.4.2 Bestimmung der passiven und aktiven Membraneigenschaften

Zur Bestimmung der passiven und aktiven Eigenschaften der dLS-Neuronen wurden unterschiedliche Protokolle im ‚Whole-cell current-clamp‘-Modus verwendet.

Für die passiven wurden 250 ms lange Strominjektionen von -100 bis 20 pA im Intervall von 30 pA appliziert. Das Ruhemembranpotenzial (mV) wurde über einen Zeitraum von 100 ms ohne Strominjektion gemittelt. Der Membranwiderstand ($M\Omega$) wurde mithilfe des Ohm'schen Gesetzes aus den Quotienten des gemessenen Spannungssprungs und dem zugehörigen applizierten Strom aus den hyperpolarisierenden Strominjektionen berechnet. Die Membranzeitkonstante τ (ms; Geschwindigkeit, bei der es zu einer Potenzialänderung von $1/e$, entspricht ca. 37 % des Ausgangswertes, kommt) wurde anhand der zuvor mit Clampfit 10.2 (Molecular Devices, Union City, Californien, USA) exponentiell angepassten hyperpolarisierenden Zellantwort bei -70 pA Strominjektion ermittelt. Die Membrankapazität (pF) wurde rechnerisch aus dem Quotienten der Membranzeitkonstante und des Membranwiderstandes ermittelt.

Für die Bestimmung der aktiven Zelleigenschaften wurden unterschiedliche Protokolle verwendet. Zunächst erfolgte eine kurze Strominjektion von 8 ms Länge mit einer Stromstärke von 100 bis max. 500 pA im Intervall von 10 pA. Die Neuronen wurde so lange mit steigender Stromamplitude stimuliert, bis ein AP generiert wurde. Dieses Protokoll diente zur Bestimmung des ADP ($mV \cdot ms$). Zur Quantifizierung wurde das ADP über die Zeit ab der schnellen Nachhyperpolarisation bis zur Rückkehr der Spannung zum Haltepotenzial integriert und die passive Komponente (ermittelt anhand der Messung ohne ausgelösten AP) subtrahiert. Weiterhin erfolgten 1 s lange Strominjektionen mit einer Stärke von -100, -50, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 und 500 pA. Hierbei wurde jeweils das erste AP bei einer Strominjektion mit ≥ 3 AP analysiert. Für die weitere Bestimmung wurden jene AP nicht berücksichtigt, die Bestandteil eines Bursts waren. Folgende Parameter wurden untersucht:

- das Schwellenpotenzial (mV)
- die AP-Amplitude über dem Schwellenpotenzial (mV)
- AP-Dauer auf Höhe der halben Amplitude (ms)

- das Nachhyperpolarisationspotenzial von mittlerer Geschwindigkeit (mAHP; mV) definiert als Differenz zwischen Schwellenpotenzial und negativstem Wert unterhalb des Schwellenpotenzials nach dem AP

Darüber hinaus wurden die AP-Frequenzen der drei Zellpopulationen während der 1 s langen Strompulsen in Abhängigkeit von der injizierten Stromstärke analysiert.

Zusätzlich wurden die Neuronen mit fünf je 5 ms langen Strominjektionen (0,5–2,5 x der Stärke der Strominjektion, bei dem das Schwellenpotenzial bei einzelnen kurzen Strominjektionen von 8 ms überschritten wurde) mit einer Frequenz von 5, 10, 20, 30 und 50 Hz stimuliert.

2.4.3 Zelleigenschaften der SST⁺- und SST⁻-Neuronen

Zur Bestimmung der physiologischen Eigenschaften von SST⁺-Zellen im dLS wurden die Tiere 3–6 Wochen nach der AAV-Injektion ‚Whole-cell current-clamp‘-Messungen unterzogen. SST⁺- und SST⁻-Neuronen wurden anhand der mCherry/tdTomato-Fluoreszenz vor den Messversuchen identifiziert. Beide Zelltypen wurden mittels der oben beschriebenen Stimulationsprotokolle (s. Kap. 2.4.2) untersucht.

2.5 Optogenetische Stimulationsversuche

2.5.1 Stimulationsprotokolle

Die Lichtstimulation der ChR2-exprimierenden CA3-Fasern im dLS erfolgte mit einem Diodenlaser (Wellenlänge 473 nm, max. Lichtleistung 100 mW; LuxX[®] 473-100, Omicron Laserprodukte GmbH), dessen Licht mit einer multimodalen Lichtfaser (0.22 NA, 550 µm Durchmesser, BFL22-550, Thorlabs, Newton, NJ, USA) zum Hirnschnitt geführt wurde. Das Ende der Lichtfaser wurde in einem Abstand von ca. 300 µm von den elektrophysiologisch zu untersuchenden Zellen auf Höhe des Corpus callosum positioniert. Die Laserintensität wurde mit einer speziellen Software (Omicron Laserprodukt GmbH) eingestellt.

Die zeitliche Steuerung erfolgte mittels pClamp Software (Version 10.2, Molecular Devices) parallel zu den physiologischen Messungen.

2.5.2 Prüfung des GABA_A-Rezeptor-Einflusses auf das CA3-dLS-Netzwerk

Zur Prüfung eines möglichen Einflusses des GABA_A-Rezeptors auf die CA3-Eingänge im dLS wurde der GABA_A-Rezeptor-Blocker Gabazine (SR 95531 hydrobromide, 10 μ M in ACSF, Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien) genutzt. Die Applikation erfolgte über die Badkammerperfusion.

2.6 Morphologische Rekonstruktion der elektrophysiologisch untersuchten Neuronen

Für die morphologische Rekonstruktion von elektrophysiologisch untersuchten Neuronen wurde für die Messungen Pipetteninnenlösung mit zusätzlich 0,3 % Biocytin genutzt. Die Hirnschnitte wurden nach den Messversuchen für 1 h bei Raumtemperatur in 0,1 M PBS mit 4 % Paraformaldehyd (Sigma, Steinheim) fixiert. Danach wurde der Gehirnschnitt dreimal 5 min mit 0,1 M PBS gewaschen und für weitere 2 h mit Streptavidin-Alexa Fluor 555 (Life Technologies, Carlsbad, USA, 1:500 in PBS and 0,5 % Triton X 100) zum Nachweis von Biocytin inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift (dreimal 5 min mit 0,1 M PBS) wurden die Gehirnschnitte mit Aqua-Poly/Mount (Polyscience Inc., Warrington, USA) auf Objektträger aufgezogen und mit Deckgläsern bedeckt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit einem konfokalen Laserscanmikroskop (Eclipse Ti, Nikon, Chiyoda, Japan mit der Steuerungssoftware NIS-Elements 4.00, 20-faches Objektiv) und die Rekonstruktion und Analyse mittels z-Stacks (Abstand Schrittweite: 3 μ m) mit dem Bildbearbeitungsprogramm Fiji (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA). Es wurden die Somagröße, die Anzahl der Dendriten und deren Verzweigungsmuster analysiert. Zur quantitativen Analyse der dendritischen Verzweigungen wurde eine Sholl-Analyse durchgeführt. Dabei wurden ausgehend vom Zentrum des Somas konzentrische Kreise mit einem Radius von 10 μ m gezogen (Abb. 8 B). Danach wurden die Anzahl der Schnittpunkte der Dendriten mit dem Kreis im Abstand zum Somazentrum sowie der dekadische Logarithmus aus dem Quotienten dieser Schnittpunkte mit der zugehörigen Kreisfläche ermittelt. Bestimmt wurde die kritische Distanz, also der Radius, bei dem die meisten Dendriten vorlagen, die maximale Anzahl an Dendriten und der Ramifizierungsindex nach Schoenen, der als

Maß für die Dendritifizierungsstärke dient. Ferner wurde der Regressionsindex nach Sholl berechnet, der auch ein Richtwert für die Dichte der Dendriten in Abhängigkeit der Entfernung vom Soma ist. Das Axon wurde morphologisch als Neurit ohne Verzweigungen und ohne Spines mit $< 1 \mu\text{m}$ Dicke definiert und dessen zweidimensional abgebildete Länge wurde gemessen.

2.7 Immunhistochemische Färbungen

2.7.1 Perfusion der Mäuse

Vor den immunhistochemischen Färbungen erfolgte eine transkardiale Perfusion der Tiere 3–6 Wochen nach der stereotaktischen intrakraniellen Virusinjektion. Hierfür erhielten die Tiere intraperitoneal eine Mischung aus 100 mg/kg Ketamin (bela-pharm, Vechta) und 15 mg/kg Xylazin (Rompun®, Bayer, Leverkusen). Nachdem kein Zwischenzehenreflex mehr auslösbar war, wurden die Extremitäten der Tiere fixiert. Nach Eröffnung des Peritoneums wurde das Diaphragma kaudal von den Rippen freipräpariert. Anschließend wurde zügig das rechte Atrium eröffnet, der linke Ventrikel punktiert und mit 5 ml 0,1 M PBS und anschließend mit 15 ml Paraformaldehyd (4 % in 0,1 M PBS, Geschwindigkeit 15–20 ml/min, entsprechend dem Herzzeitvolumen von Mäusen) perfundiert. Dann wurden die Tiere dekapitiert und das Gehirn wurde über Nacht in 0,1 M PBS mit 4 % Paraformaldehyd nachfixiert. Von den fixierten Gehirnen wurden 50 μm dicke Schnitte auf Höhe des dLS sowie der CA3-Region mittels Vibratom (Microm HM 650 V, Thermo Fisher Scientific, Walldorf) hergestellt, in eine Multititerplatte (24-Well, VWR International, Radnor, USA) überführt und lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

2.7.2 Immunohistochemische Färbungen

Zur Untersuchung der ChR2-eYFP exprimierenden CA3-Fasern im dLS sowie der CA3-Injektionsstelle erfolgte eine anti-eYFP-Färbung. Wurden die Schnitte keiner Nissl-Färbung unterzogen, wurden sie in 0,1 M PBS-Triton (0,25 %, Triton™ X-100, Sigma-

Aldrich®, St. Louis, USA) und 5 % Eselserum für 45 min inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde der Primärantikörper anti-GFP (1:1000, Wirt: Ziege, ab5449, abcam, Cambridge, Großbritannien) gelöst in 0,1 M PBS-Triton (0,05 %) und 1 %igem Eselserum für 24 h auf die Schnitte gegeben und bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst dreimal für je 15 min mit PBS gewaschen, anschließend mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (anti-Ziege-IgG; 1:500, Wirt: Esel, konjugiert mit Alexa Fluor® 488, 705-545-147, Jackson ImmunoResearch) in 0,1 M PBS-Triton 0,1 % mit 5 %igem Eselserum für 2 h inkubiert und danach erneut dreimal für je 15 min mit PBS gewaschen. Folgte auf die anti-eYFP-Färbung eine Nissl-Färbung, wurden die Schnitte zunächst zweimal für je 10 min in 0,1 M PBS-Triton (0,25 %) gewaschen und anschließend für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur im Blockserum inkubiert. Das Blockserum bestand aus 0,05 % Fischhautgelatine (fish skin gelatin, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) in 0,1 M PBS-Triton (0,25 %). Die Inkubation mit dem Primärantikörper anti-eYFP (1:1000, Wirt: Maus sc-166458, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) gelöst im Blockserum erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Rüttelinkubator. Am Folgetag wurden die Schnitte dreimal für je 10 min mit PBS gewaschen und anschließend mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (anti-Maus-IgG 1:500, Wirt: Esel, Alexa Fluor® 88, Jackson ImmunoResearch, gelöst in PBS) erneut über Nacht bei 4 °C auf dem Rüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Sekundärantikörper dreimal für je 10 min mit PBS ausgewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in 0,1 M PBS-Triton (0,1 %) permeabilisiert und erneut zweimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Die Nissl-Farblösung (1:500, NeuroTrace™ Fluorescent Nissl Stain, 433/455, N21479, Thermo Fisher Scientific, Walldorf) wurde für 20 min auf die Schnitte gegeben und danach für 10 min mit 0,1 M PBS-Triton (0,1 %) ausgewaschen. Abschließend wurden die Schnitte zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und mit Aqua-Poly/Mount auf dem Objektträger mit einem Deckglas befestigt.

2.8 Datenanalyse und statistische Auswertung

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Für die statistische Auswertung wurden der t-Test nach Student (gepaart bzw. ungepaart),

one- und two-way ANOVA gegebenenfalls mit Tukey's post-Test sowie der Durbin-Skillings-Mack-Test und Wilcoxon-Test verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Prism® (Graphpad Software, San Diego, Californien, USA), und/oder Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, Redmond, Washington, USA) sowie XLSTAT (Addinsoft, Paris, Frankreich).

3. Ergebnisse

3.1 Intrinsische physiologische Membraneigenschaften der Zellen im dLS

3.1.1 Zellpopulationen im dLS

Es ist bereits bekannt, dass dLS-Neuronen sowohl morphologisch, immunohistochemisch als auch elektrophysiologisch eine Heterogenität aufweisen. Zunächst wurde versucht, die Neuronen anhand ihrer physiologischen Eigenschaften zu charakterisieren. Hierfür wurde das Membranpotenzial der Neuronen im dLS im ‚Whole-cell current-clamp‘-Modus gemessen. Es wurden Stromimpulse mit einer Länge von 1000 ms und einer Amplitude von -100, -50, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450 und 500 pA zur Hyper- bzw. Depolarisierung verwendet. Hierbei fiel auf, dass 86,0 % der untersuchten Neuronen aufeinanderfolgende APs auf einem depolarisierten Plateaupotenzial generierten, bevor eine markante Hyperpolarisation auftrat. Nach dieser Hyperpolarisation folgten APs auf einem deutlich niedrigeren Repolarisationsniveau mit relativ regulärem Abstand. Dieses sogenannte ‚Bursting‘ wurde zur Klassifikation der Neuronen herangezogen. Es diente bereits in früheren Arbeiten zur Kategorisierung der Zellen (Gallagher et al., 1995).

Als ‚Burster‘ wurden Zellen definiert, die mindestens zwei aufeinanderfolgende APs erzeugten, bevor ein markantes AHP auftrat. Das Bursting wurde anhand der Differenz aufeinanderfolgender AHPs ($\Delta AHP_n = AHP_{n+1} - AHP_n$) bei Messungen mit ≥ 3 AP ähnlich der Methode von Chen et al. (2011) bestimmt, wobei die AHP-Amplitude als negativster Punkt zwischen zwei APs definiert wurde. Lag das negativste ΔAHP , dessen Betrag als Bursting-Index (BI) bezeichnet wird, unterhalb der festgelegten Marke von -2,5 mV, wurde die Zelle als Burster klassifiziert.

Insgesamt ließen sich unter allen gemessenen dLS-Neuronen (n=128) drei unterschiedliche Populationen ausmachen (Abb. 3; 4). Die größte Population bildeten mit 80,5 % (n=103) High-Threshold-Burster (HTB). Diese Zellen zeigten bei niedrigeren Strominjektionen ein reguläres Feuerverhalten, bei höheren Strominjektionen von $214,0 \pm 9$ pA ein Bursting-Verhalten; die geringste Strominjektion, die zur Generierung eines APs führte (Rheobase), löste dagegen noch kein Bursten aus (Abb. 3 B, E; 4). Es

folgten mit 14,1 % (n=18) die regulär feuernenden Neuronen (RF), die bei keiner der verwendeten Strominjektionen ein Bursting-Verhalten zeigten (Abb. 3 A, D; 4) und schließlich die Low-Threshold-Burster (LTB) (5,5 %, n=7), bei denen das Bursting-Verhalten bereits bei der ersten Strominjektion, die zur AP-Generierung führte ($57,0 \pm 11$ pA), auftrat (Abb. 3 C, F; 4). Der BI unterschied sich signifikant zwischen Burstern und Nichtburstern, aber nicht zwischen HTB und LTB (one-way ANOVA, $F_{(2, 125)}=22,08$, $p<0,0001$ für HTB vs. RF und LTB vs. RF nach Tukey's post-Test; $p=0,6701$ für HTB vs. LTB; Signifikanzniveau: $p<0,001$) (Abb. 4 B). Im Gegensatz dazu zeigte sich kein wesentlicher Unterschied in der Rheobase der drei Neuronengruppen (one-way ANOVA, $F_{(2, 125)}=1,134$, $p=0,3249$; Signifikanzniveau: $p<0,05$) (Abb. 4 D). Erwartungsgemäß unterschied sich die Stromstärke zwischen HTB- ($214,0 \pm 9$ pA) und LTB-Neuronen ($57,14 \pm 11,5$ pA), die zur Generierung des ersten Bursts notwendig war, signifikant (ungepaarter t-Test, $t_{(109)}=4,443$, $p<0,001$) (Abb. 4 C). Diese initiale Klassifikation diente als Basis, um weitere physiologische Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten der drei Zellpopulationen herauszuarbeiten.

3.1.2 Aktive und passive Membraneigenschaften der drei dLS-Zellpopulationen

Das ADP beeinflusst das Bursting von Neuronen, da größenabhängig das Schwellenpotential für ein weiteres darauffolgendes AP erreicht werden kann (Metz et al., 2005). Daher wurde im Folgenden überprüft, ob das ADP der drei identifizierten Zelltypen relevante Unterschiede zeigt. Hierfür erfolgten wiederholte kurze Strominjektionen von 8 ms Dauer, deren Amplitude bei jeder Wiederholung sukzessive um 10 pA erhöht wurde. HTB und LTB wiesen ein signifikant größeres ADP auf als RF-Neuronen, während sich das ADP zwischen LTB und HTB statistisch mittels one-way ANOVA auf einem Signifikanzniveau von $p<0,05$ nicht unterschied (one-way ANOVA, $F_{(2, 125)} = 4,308$, mit Tukey's post-Test: $p=0,0279$ für HTB vs. RF und $p=0,0405$ für LTB vs. RF; $p=0,5152$ für HTB vs. LTB; n=103; 7; 18) (Tab. 2).

In hippokampalen Pyramidenzellen folgt auf ein AP oder einen Burst ein AHP, das für die Regulation der Exzitation und Frequenzadaptation relevant zu sein scheint (Gu et al., 2005).

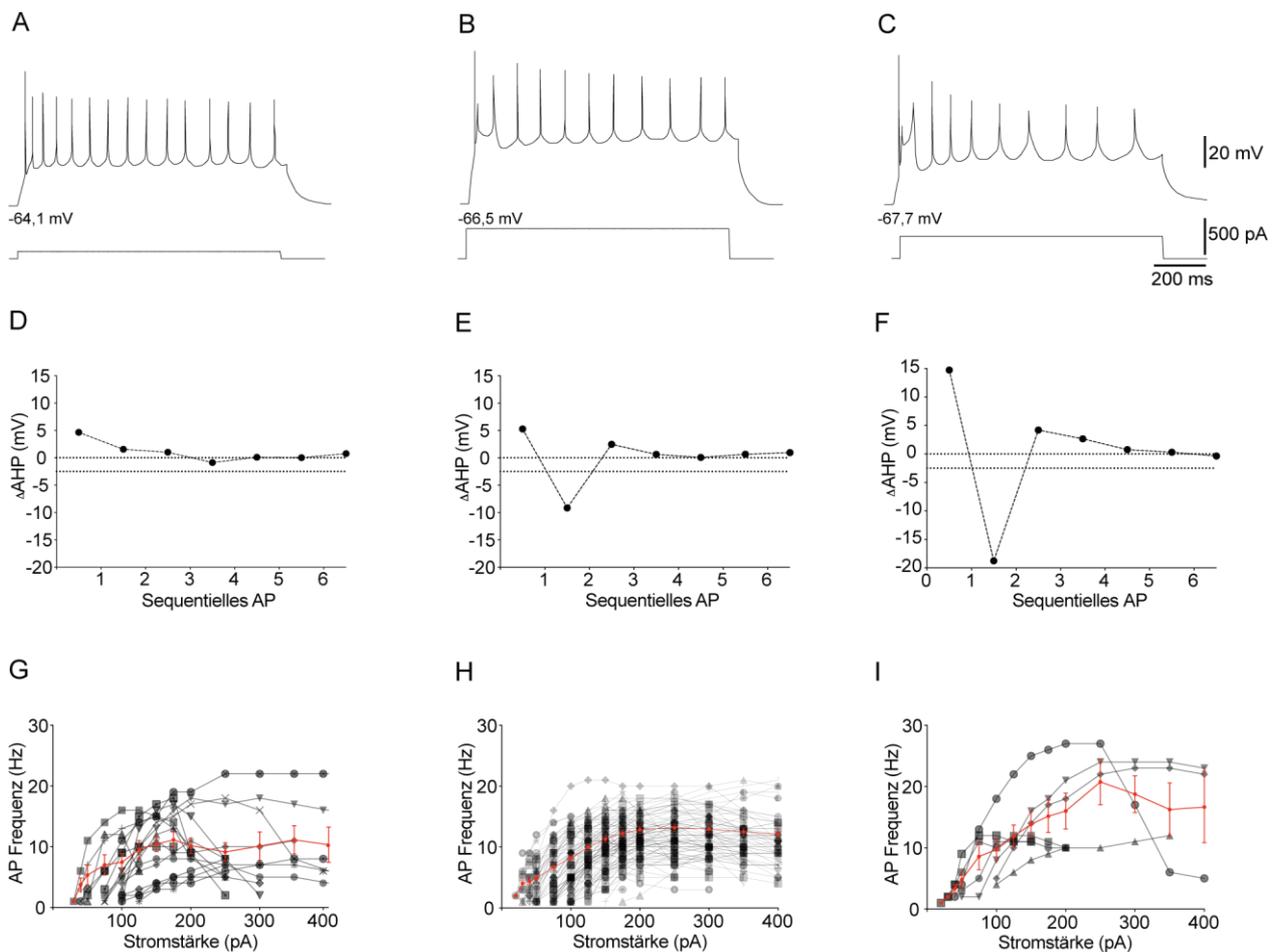


Abb. 3. Spektrum des Feuerverhaltens der Zellen im dLS

A, B, C: Die Zellen wurden mit 1 s langen Strominjektionen stimuliert. Über jedem Strompuls ist das gemessene Signal abgebildet. Unten links zu Beginn der Spannungsmessung ist das jeweilige Ruhemembranpotenzial angegeben. A: RF, B: HTB und C: LTB. D, E, F: Differenz der AHPs aus den darüber gezeigten Messungen (Δ AHP). Die untere gestrichelte Linie markiert den Δ AHP-Wert von -2,5 mV, der als Grenzwert zur Unterscheidung zwischen Burstern (Neuronen B und C) und Nichtburstern (A) definiert wurde. G, H, I: Grafische Darstellung der AP-Frequenz in Abhängigkeit von der injizierten Stromstärke bei 1 s langen Stimulationen von RF (G, n=18), HTB (H, n=103) und LTB (I, n= 7). Roter Graph: Mittelwerte \pm SEM.

Im Folgenden wurden die AHPs von mittlerer Geschwindigkeit (mAHPs) der dLS-Neuronen miteinander verglichen. AHPs werden anhand ihres zeitlichen Auftretens nach einem AP in schnelle sowie langsame AHPs unterteilt, wobei die mAHPs (50–100 ms nach einem AP) ebenso zu den langsamen gehören. Sie entstehen maßgeblich durch Kalzium-aktivierte Kaliumkanäle (Matthews et al., 2009). Für die Bestimmung des mAHP wurden keine APs berücksichtigt, die Bestandteil eines Bursts waren.

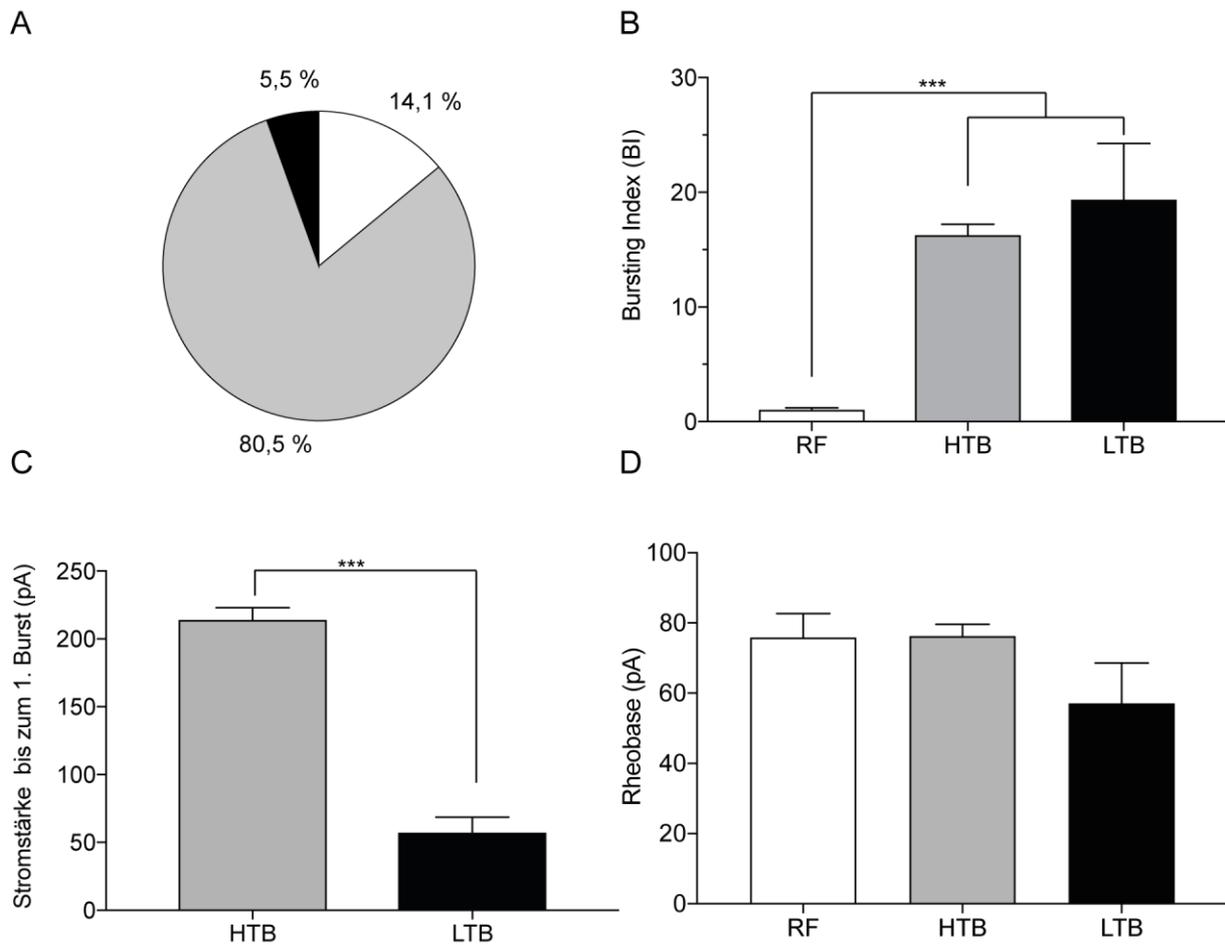


Abb. 4. Klassifizierung der Neuronen im dLS anhand des Bursting-Verhaltens

A: Anteil von RF, HTB und LTB an der Gesamtzahl der gemessenen dLS-Neuronen B: Darstellung der Mittelwerte (\pm SEM) des BI von RF (n=18), HTB (n=103) und LTB (n=7). Signifikante Unterschiede der BI bestanden zwischen RF und HTB sowie RF und LTB (one-way ANOVA mit Tukey's post-Test, *** markiert $p < 0,001$). C: Schwellenamplitude der Strominjektion zur Evozierung eines Bursts bei HTB (n=103) und LTB (n=7). *** markiert $p < 0,001$ mit ungepaartem t-Test. D: Die Rheobase bis zum ersten AP von HTB (n=103), LTB (n=7) und RF (n=18) zeigte im Vergleich keine signifikanten Unterschiede (one-way ANOVA, $p > 0,05$).

In 90,6 % der gemessenen dLS-Neuronen konnte ein mAHP nach dem AP detektiert werden (HTB: 94/103; RF: 16/18; LTB: 6/7). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den mAHP-Amplituden der drei Zelltypen (HTB: n=94; LTB: n=6; RF: n=16; one-way ANOVA, $F_{(2, 125)}=1,318$, $p=0,2714$; Signifikanzniveau: $p < 0,05$) (Tab. 2). Des Weiteren wurde das erste AP bei einer 1 s langen Strominjektion mit ≥ 3 AP analysiert. Mittels one-way ANOVA konnten keine signifikanten Unterschiede des

Schwellenpotenzials ($F_{(2,125)} = 1,908$, $p=0,1526$), der AP-Amplitude über dem Schwellenpotenzial ($F_{(2, 125)} = 0,2589$, $p=0,7723$) und der AP-Dauer auf Höhe der halben Amplitude ($F_{(2, 125)} = 0,5587$, $p=0,5733$) für die drei Neuronengruppen auf einem Signifikanzniveau von $p<0,05$ festgestellt werden (Tab. 2).

Ein weiteres Kriterium, das häufig zur physiologischen Charakterisierung von Neuronen herangezogen wird, ist die Frequenz von APs während länger andauernder Depolarisationen. Dazu wurden die AP-Frequenzen der drei Zellpopulationen während den Strompulsen (1 s) in Abhängigkeit von der injizierten Stromstärke analysiert (s. Abb. 3 G, H, I). Wird in diesen Messungen die maximale Frequenz der APs verglichen, so ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Neuronen auszumachen (HTB: $14,8 \pm 0,7$ Hz, $n=103$; LTB: $17,3 \pm 2,7$ Hz, $n=7$; RF: $13,6 \pm 1,3$ Hz, $n=18$; one-way ANOVA, $F_{(2, 125)}=0,7806$, $p=0,4604$; Signifikanzniveau: $p<0,05$).

Es wurden weiterhin passive Membraneigenschaften bestimmt, wofür die Neuronen mit 250 ms lange Strominjektionen von -100 bis 20 pA im Intervall von 30 pA stimuliert wurden. Weder das Ruhemembranpotenzial (one-way ANOVA, $F_{(2, 125)}=1,808$, $p=0,1683$), der Membranwiderstand (one-way ANOVA, $F_{(2, 125)} = 2,197$, $p=0,1154$) noch die Membrankapazität (one-way ANOVA, $F_{(2, 125)} = 2,586$, $p=0,0793$) zeigten signifikante Unterschiede auf einem Signifikanzniveau $p<0,05$. Lediglich die Membranzeitkonstante war signifikant unterschiedlich zwischen HTB- und RF-Neuronen (one-way ANOVA mit Tukey's post-Test, $F_{(2, 125)} = 2,905$, $p=0,0457$ für HTB vs, RF; Signifikanzniveau: $p<0,05$) (Tab. 2).

Tab. 2: Passive und aktive Membraneigenschaften der LTB-, HTB- und RF-Neuronen im dLS

		LTB (n=7)	HTB (n=103)	RF (n=18)
Passiv	Ruhemembranpotenzial (mV)	-64,2 ± 1,1	-65,6 ± 0,3	-64,2 ± 0,7
	Membranwiderstand (MΩ)	198,3 ± 45,1	182,8 ± 10,8	247,8 ± 45,3
	Membranzeitkonstante (ms)	33,9 ± 4,1	34,8 ± 1,2 *	27,7 ± 2,4
	Membrankapazität (pF)	245,8 ± 64,7	261,4 ± 15,5	173,8 ± 26,8
Aktiv	Schwellenpotenzial (mV)	-36,3 ± 2,1	-37,5 ± 0,4	-39,3 ± 1,2
	AP-Amplitude über dem Schwellenpotenzial (mV)	70,4 ± 6,9	73,8 ± 1,2	73,1 ± 2,6
	AP-Dauer auf Höhe der halben AP-Amplitude (ms)	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,04	1,6 ± 0,1
	Aktionspotenzial-Nachdepolarisation / ADP (mV*ms)	490 ± 145,4 *	346,8 ± 34,5 *	125,5 ± 40,3
	Nachhyperpolarisationspotenzial von mittlerer Geschwindigkeit mAHP (mV)	-4,2 ± 1,1 (n=6)	-4,7 ± 0,4 (n=94)	-6,1 ± 0,8 (n=16)

Aufgelistet sind die Mittelwerte ± SEM. Nicht alle Neuronen zeigten ein mAHP (LTB: 6/8; HTB: 94/103; RF: 16/18). * markiert eine statistisch signifikante Differenz (one-way ANOVA, gefolgt von Tukey's post-Test für $p < 0,05$).

3.1.3 Reaktion von HTB-Zellen auf höherfrequente Stimulationen

Der größte nichthippokampale CA3-Ausgang ist die Projektion zum dLS (Swanson et al., 1981). Das neuronale Netzwerk der hippokampalen CA3-Region generiert hochfrequente netzwerkspezifische SPW-R mit Oszillationsfrequenzen bis zu 200 Hz, die für die Übertragung von Gedächtnisinhalten vom Hippokampus zum Neokortex von Bedeutung sind (Buzsáki, 1986; Oliva et al., 2016; Ego-Stengel und Wilson, 2010). Da dLS-Neuronen bei länger anhaltender Depolarisation nur mit ca. 15 Hz feuern (Abb. 3 G-I), sollte geprüft werden, ob höhere AP-Frequenzen durch frequenz-modulierte Stimulationen erreicht werden können. Dies wurde in 18 HTB-Zellen, dem

dominierenden Zelltyp des dLS, im Anschluss an die o. g. Stimulationsprotokolle untersucht. Die Zellen wurden mit fünf depolarisierenden 5 ms langen Strominjektionen (1–2,5-fache Stromamplitude, bei der das Schwellenpotenzial bei der einzelnen kurzen Strominjektion von 8 ms überschritten wurde) stimuliert (s. Abb. 5). Sowohl der Einfluss des Interstimulus-Intervalls (Frequenzen von 5, 10, 20, 30 und 50 Hz) als auch der Stimulus-Amplitude wurden untersucht. In 16 von 18 Neuronen wurden APs auf jeden Stimulus generiert. Dabei war die AP-Wahrscheinlichkeit unabhängig von der Puls-Nummer und Frequenz (Abb. 5 F, G; two-way ANOVA, $n=8$ für 1–1,49-fache Stromstärke, $F_{(16,140)} = 0,9013$ mit $p=0,5690$ und $n=12$ für 1,5–2,5-fache Stromstärke, $F_{(16,220)} = 0,5391$ mit $p=0,9242$; Signifikanzniveau: $p<0,05$). Die Wahrscheinlichkeit der AP-Generierung in diesen Neuronen war bei jedem Stimulus von der Stimulus-Amplitude abhängig (Abb. 5 F, G; two-way ANOVA, 5 Hz: $F_{(1,90)} = 14,97$, 10 Hz: $F_{(1,90)} = 24,87$, 20 Hz: $F_{(1,90)} = 29,67$, 30 Hz: $F_{(1,90)} = 23,00$, 50 Hz: $F_{(1,90)} = 17,09$; Signifikanzniveau: $p<0,05$).

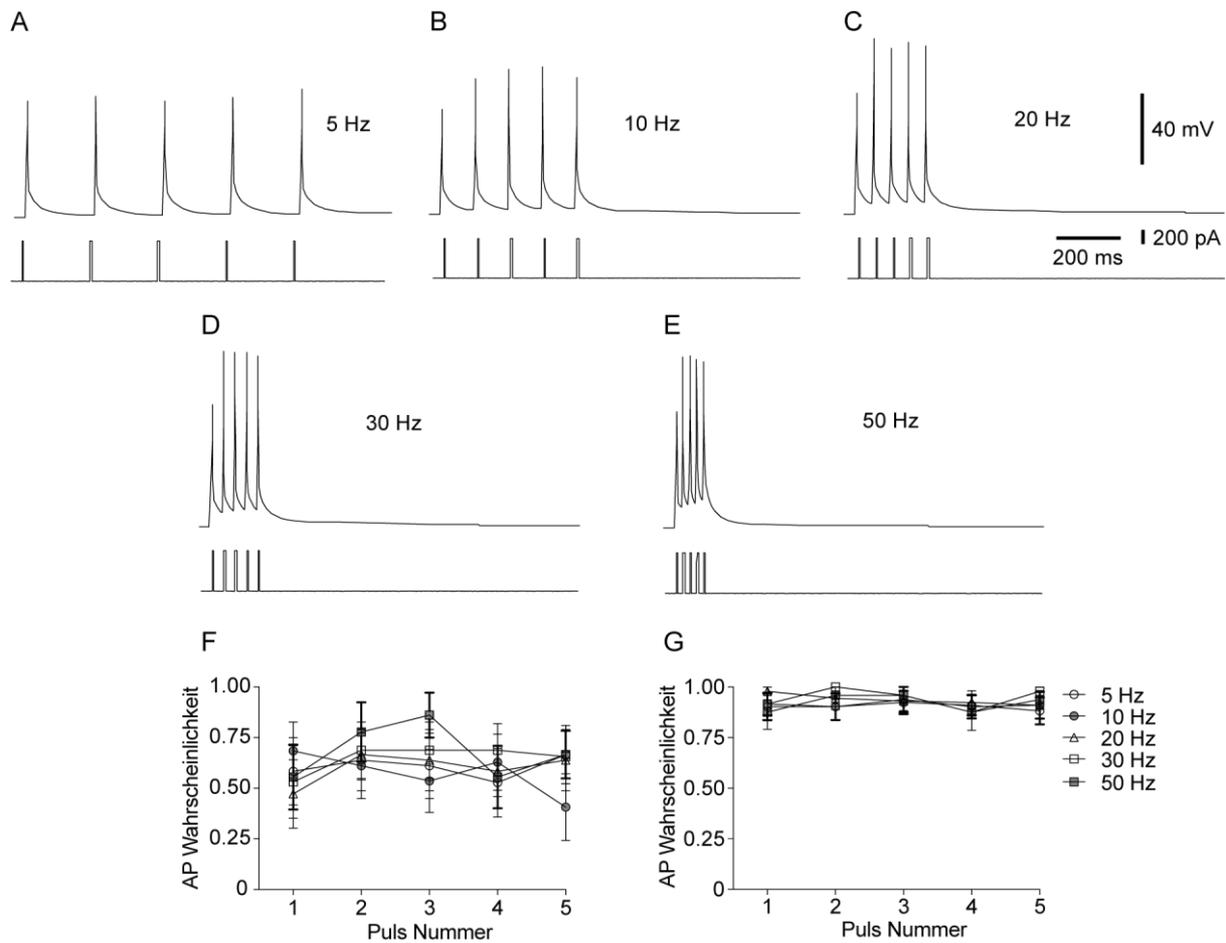


Abb. 5. Verhalten von HTB des dLS nach Anregung mit Stromimpulsen bis zu 50 Hz
 A–E: Beispiel eines zuvor als HTB klassifizierten Neurons, stimuliert mit fünf je 5 ms langen Stromimpulsen (doppelte initiale Schwellenstromstärke). Die Stromimpulse wurden mit einer Frequenz von 5 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D) und 50 Hz (E) appliziert. Das Ruhemembranpotenzial der Zelle betrug -63,9 mV. F, G: Wahrscheinlichkeit der AP-Generierung der in A–E dargestellten Messungen. Die Stromstärke betrug in (F) das 1–1,49-fache und in (G) das 1,5–2,5-fache der Schwellenstromstärke. Die Graphen bilden die Mittelwerte \pm SEM der AP-Wahrscheinlichkeiten bei unterschiedlichen Frequenzen (5, 10, 20, 30, 50 Hz) in Abhängigkeit von der Puls-Nummer ab. F: $n=8$, G: $n=12$. Insgesamt konnten in 16 von 18 stimulierten Zellen APs generiert werden. Dabei war die AP-Wahrscheinlichkeit unabhängig von der Puls-Nummer und Frequenz (two-way ANOVA $F_{(16, 140)} = 0,9013$, $p=0,5690$ für die 1–1,49-fache Stromstärke und $F_{(16, 220)} = 0,5391$, $p=0,9242$ für 1,5–2,5-fache Stromstärke; Signifikanzniveau: $p<0,05$). Durch die Steigerung der Stromstärke stieg die Wahrscheinlichkeit der AP-Generierung bei jedem der fünf Pulse (two-way ANOVA; $p<0,05$).

3.2 SST⁺- und SST⁻-Neuronen im dLS

Das dLS enthält zahlreiche SST-exprimierende GABAerge Neuronen (Risold und Swanson, 1997a). In der vorliegenden Untersuchung sollte geprüft werden, ob die SST-Expression mit den unterschiedlichen physiologisch charakterisierten Gruppen korreliert. Versuche mit einem geflochtenen rAAV-Vektor mit mCherry oder tdTomato in SST-Cre-Tieren belegten die Präsenz zahlreicher SST-synthetisierender Neuronen im dLS (Abb. 6). Zur Analyse des physiologischen Verhaltens der dLS-Zellen wurden 3–6 Wochen nach der Injektion des rAAV-Vektors die passiven und aktiven Eigenschaften der fluoreszenten SST⁺- und der nichtfluoreszenten SST⁻-Zellen analysiert und verglichen. Von den acht untersuchten fluoreszenten SST⁺-Zellen wurden sieben als HTB und eine als RF klassifiziert; unter den sechs nichtfluoreszenten SST⁻-Zellen waren fünf HTB und eine RF. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass SST⁺- oder SST⁻-Zellen unterschiedlichen physiologischen Neuronenklassen (z. B. HTB oder RF) angehören (Abb. 7). Beim Vergleich der passiven und aktiven physiologischen Eigenschaften der HTB-Neuronen, wurden keine signifikanten Unterschiede mittels ungepaarten t-Test auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ zwischen SST⁺- oder SST⁻-Zellen sichtbar (Ruhemembranpotenzial: $t_{(10)}=1,703$, $p=0,1194$; Membranwiderstand: $t_{(10)}=1,074$, $p=0,308$; Membranzeitkonstante: $t_{(10)}=0,5152$, $p=0,6176$; Membrankapazität: $t_{(10)}=1,08$, $p=0,3055$; Schwellenpotenzial: $t_{(10)}=2,057$, $p=0,0667$; AP-Amplitude über dem Schwellenpotenzial: $t_{(10)}=1,992$, $p=0,0835$; AP-Dauer auf Höhe der halben AP-Amplitude: $t_{(10)}=1,396$, $p=0,1928$; mAHP: $t_{(10)}=0,5828$, $p=0,5729$; ADP: $t_{(9)}=0,3918$, $p=0,7043$; BI: $t_{(10)}=0,9506$, $p=0,3642$) (Tab. 3). Auch die durchschnittliche Feuerfrequenz der beiden Populationen zeigte statistisch keine relevanten Unterschiede (SST⁺: $12 \pm 1,3$ Hz, SST⁻: $16,4 \pm 2,3$, ungepaarter t-Test, $t_{(24)}=1,779$, $p=0,0879$; Signifikanzniveau: $p < 0,05$) (Abb. 7 D).

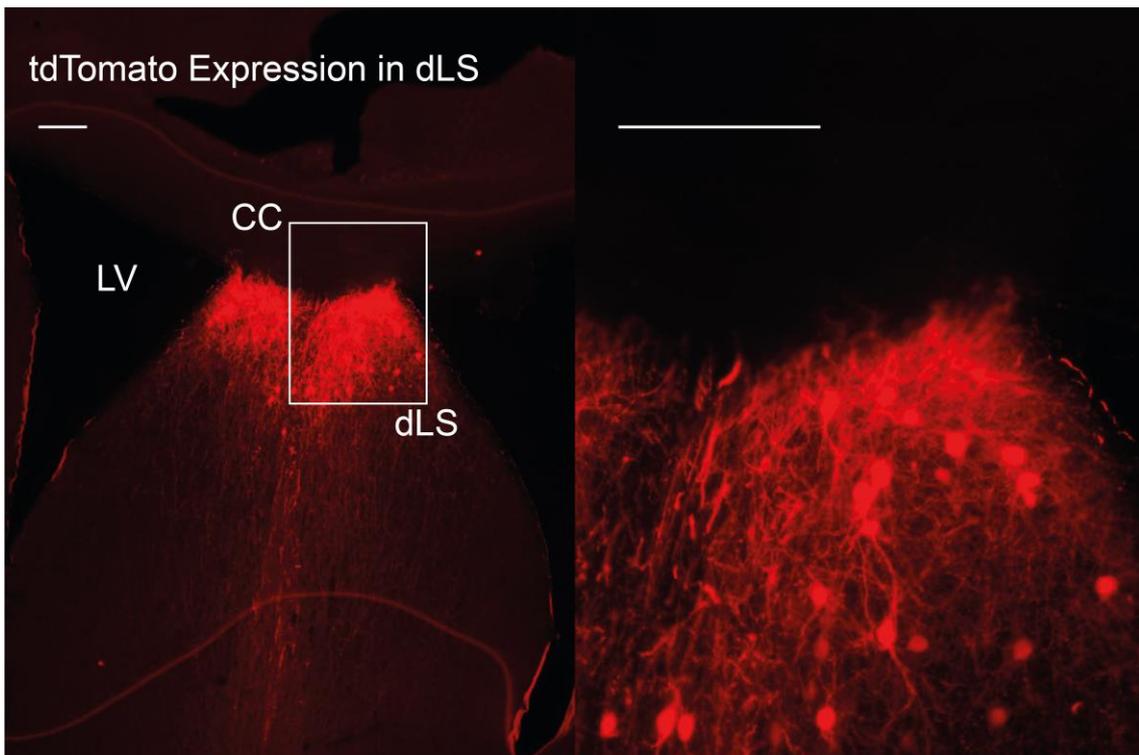


Abb. 6. Nachweis von SST⁺-Neuronen im dLS

Nach der Injektion eines konditionierten Cre-abhängigen rAAV-Vektors mit tdTomato in SST-Cre Tieren ließen sich SST⁺-Neuronen (rot) im dLS nachweisen. Links: Übersichtsaufnahme. Das Quadrat markiert die Nahaufnahme, die rechts zu sehen ist. LV=lateraler Ventrikel, CC=Korpus callosum. Maßstableiste: 200 μ m für beide Vergrößerungen. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Mikroskop durchgeführt.

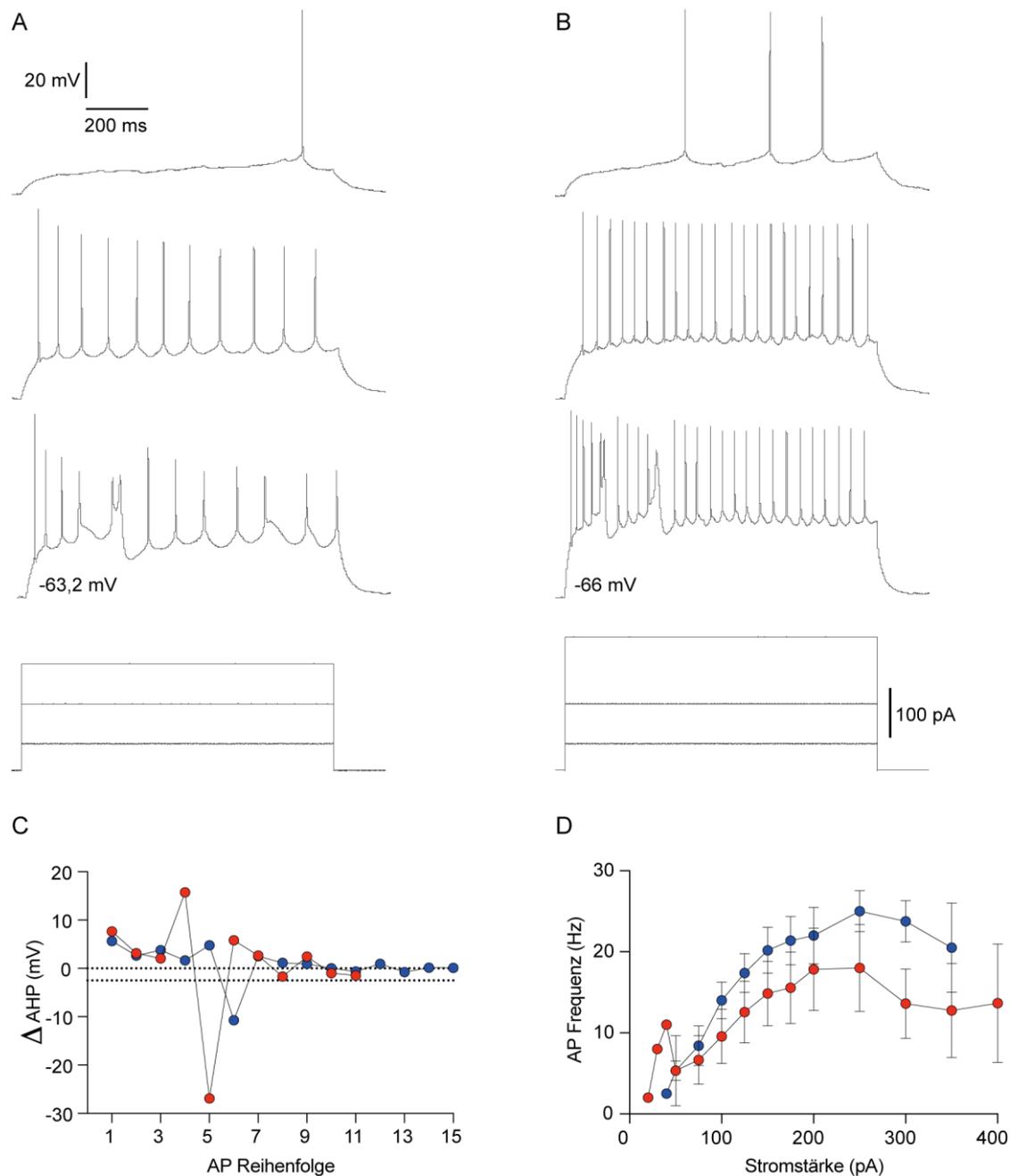


Abb. 7. SST⁺- und SST⁻-HTB im dLS

A, B: Beispiele für die Generierung von APs einer fluoreszenten SST⁺-(A) und einer nichtfluoreszenten SST⁻-Zelle (B) im dLS. Die Neuronen wurden mit 1 s langen Strominjektionen stimuliert (unterste Signale). Neben der untersten Spannungsableitung steht das jeweilige Ruhemembranpotenzial. C: Differenzen des Nachhyperpolarisationspotenzials (ΔAHP) aus A und B, die die gestrichelte Linie von -2,5 mV (Grenzwert zwischen Burster und Nichtburster) überschreiten und das Neuron als HTB identifizieren. Rot: SST⁺-Neuron, Blau: SST⁻-Neuron. D: Vergleich der Mittelwerte \pm SEM der AP-Frequenzen von SST⁺- und SST⁻-Neuronen (rot, n=7) und SST⁻-Neuronen (blau, n=5) evoziert durch 1 s lange Strominjektionen. Ein signifikanter Unterschied in den Feuerfrequenzen bestand nicht (ungepaarter t-Test; $p > 0,05$).

Tab. 3: Passive und aktive Membraneigenschaften der HTB-SST⁺- und SST⁻-Neuronen im dLS

		SST ⁺ (n=7)	SST ⁻ (n=5)
Passiv	Ruhemembranpotenzial (mV)	-61,6 ± 2,0	-65,8 ± 0,7
	Membranwiderstand (MΩ)	202,7 ± 44,2	279,8 ± 58,3
	Membranzeitkonstante (ms)	34,5 ± 1,9	32,7 ± 3,2
	Membrankapazität (pF)	245,8 ± 64,7	261,4 ± 15,5
Aktiv	Schwellenpotenzial (mV)	-38,0 ± 0,9	-41,0 ± 1,1
	AP-Amplitude über dem Schwellenpotenzial (mV)	79,1 ± 6,7	68,6 ± 12,3
	AP-Dauer auf Höhe der halben AP-Amplitude (ms)	1,4 ± 0,2	1,0 ± 0,1
	Aktionspotenzial-Nachdepolarisation ADP (mV*ms)	213,2 ± 85,1 (n=6)	174,6 ± 32,4
	Nachhyperpolarisationspotenzial von mittlerer Geschwindigkeit mAHP (mV)	-5,3 ± 0,5	-5,9 ± 1,0
	Bursting-Index (BI)	-16,6 ± 3,9	-21,7 ± 3,3

Passive und aktive Membraneigenschaften von SST⁺- und SST⁻-HTB-Neuronen im dLS. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. Man beachte, dass nur 6/7 der SST⁺-Neuronen ein ADP aufwiesen. Keiner der Parameter zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen SST⁺- und SST⁻-HTB Neuronen (ungepaarter t-Test, p>0,05).

3.3 Quantitative morphologische Eigenschaften der dLS-Neuronen

Für die quantitative Analyse der Morphologie der dLS-Zellen wurde der Pipetten-Innenlösung bei den ‚Whole-cell current-clamp‘-Messungen 0,3 % Biocytin zugefügt und die Neuronen wurden nach den ‚Patch-clamp‘-Versuchen mit Streptavidin Alexa Fluor 555 gegengefärbt. Zu den sieben rekonstruierten Neuronen gehörten sechs HTB und ein LTB. Bei nur einer LTB-Zelle wurde der weitere Schwerpunkt auf HTB-Neuronen gesetzt. Alle Neuronen waren multipolar mit 3–7 Dendriten, die initial vom Soma abzweigen. Wie schon bei Alonso und Frotscher (1989) zeigten alle rekonstruierten Neuronen dendritische Spines (Abb. 8 A), jedoch erst ab der zweiten bis dritten

Verzweigung ab dem Soma (Dendriten 3. und 4. Ordnung). Die Somagröße der sechs HTB betrug durchschnittlich $225,4 \pm 33,6 \mu\text{m}^2$. Das Axon konnte lediglich sicher bei 4/6 identifiziert werden. Die abgebildete durchschnittliche Länge betrug $133,3 \pm 52,4 \mu\text{m}$.

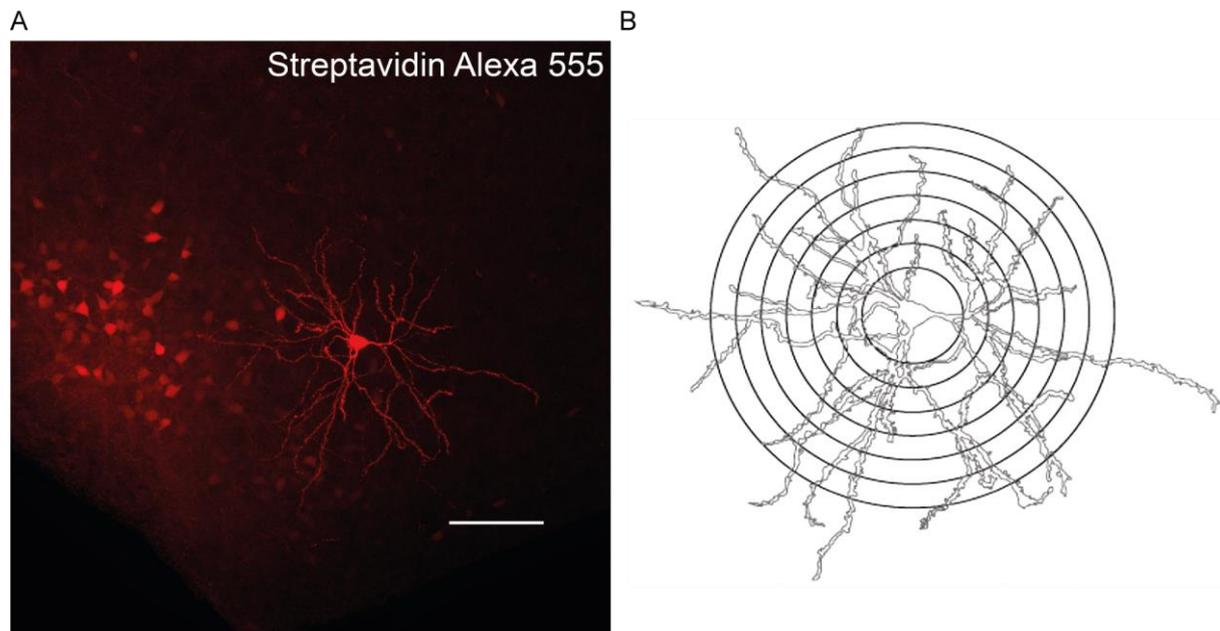


Abb. 8. Morphologie der HTB

A: Rekonstruktion eines mit 0,3 % Biocytin gefüllten und mit Streptavidin Alexa Fluor 555 inkubierten HTB im dorsalen Lateralen Septum (dLS). Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Mikroskop durchgeführt. Maßstabsleiste: $100 \mu\text{m}$. Die Dendriten des Neurons zeigen eine umfangreiche Verzweigung. B: Modell-Rekonstruktion des Neurons aus A. Eine Sholl-Analyse zur Quantifizierung der Dendritifizierung wurde anhand der konzentrisch gezogenen Kreise (Radiusintervall $10 \mu\text{m}$) um das Zentrum des Somas durchgeführt.

Die durch die Sholl-Analyse ermittelte kritische Distanz befand sich $67 \pm 5,6 \mu\text{m}$ vom Soma entfernt. Durchschnittlich wurden hier $20,8 \pm 2,3$ Dendriten gezählt. Dabei nahm die Anzahl der Schnittpunkte bis $200 \mu\text{m}$ von der Somamitte entfernt genauso rapide wieder ab, wie sie vom Zentrum bis zur kritischen Distanz zugenommen hatte. Danach bestanden nur noch wenige Schnittpunkte mit 2–3 bis $350 \mu\text{m}$ vom Soma entfernt (Abb. 9 A). Der Ramifizierungsindex nach Schoenen betrug dabei $4,2 \pm 0,4$. Korrespondierend nahm der Logarithmus des Quotienten der Schnittpunkte eines konzentrischen Kreises durch dessen zugehöriger Fläche bis $350 \mu\text{m}$ vom Soma ab (Abb. 9 B). Die Analyse der Anzahl der Dendriten der verschiedenen Ordnungen sowie deren Länge zeigte, dass

Dendriten der 2. und 3. Ordnung die meisten Verzweigungen besaßen und sich hier auch die kritische Distanz befand. Ebenso konnten erst ab dieser Verzweigungshöhe Spines ausgemacht werden. Dieser Befund lässt vermuten, dass hier der Hauptteil der exzitatorischen Afferenzen die Neuronen erreicht.

Mehr als bis zu fünf Verzweigungspunkte besaß keines der rekonstruierten Neuronen (Abb. 9 C). Die Länge bis zur nächsten Verzweigung betrug durchschnittliche $82,5 \pm 9,7$ μm (Abb. 9 D).

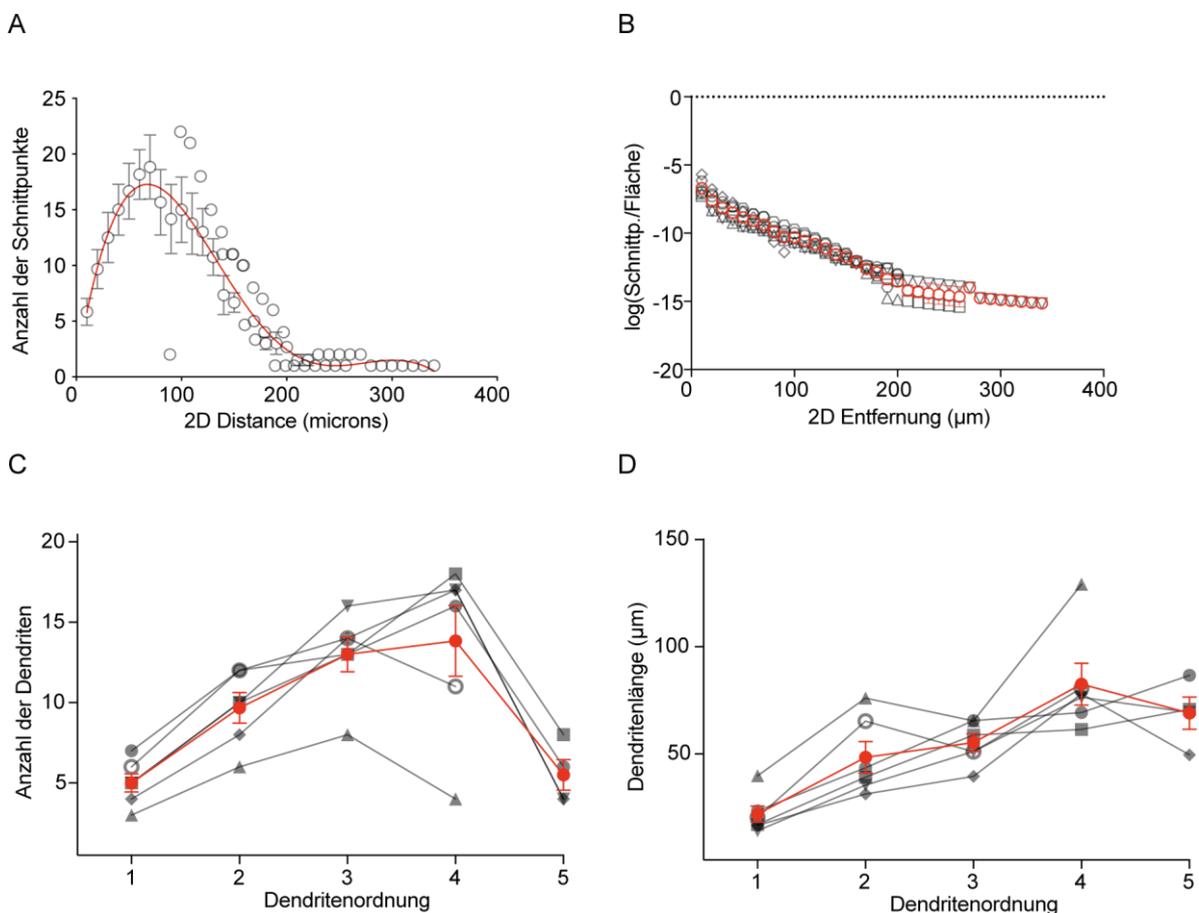


Abb. 9. Dendritenmorphologie der HTB-Neuronen im dLS

A–D: Quantitative Analyse der zuvor als HTB identifizierten Neuronen ($n=6$). A: Sholl-Analyse: Mittelwerte \pm SEM der Anzahl der Schnittpunkte mit steigendem Radius. Rot: Polynomiale Kurvenanpassung. B–D: Rot: Mittelwerte \pm SEM B: Semi-log Methode der Sholl-Analyse: Quotient aus Anzahl der Schnittpunkte der konzentrischen Kreise und der zugehörigen Kreisfläche. Die Dichte der Dendriten sank mit steigender Entfernung vom Soma. C: Anzahl der Dendriten der verschiedenen Ordnungen. D: Dendritenlänge in Abhängigkeit von der Dendritenordnung.

3.4 CA3-dLS-Verbindung

3.4.1 dLS-Input von CA3-Projektionsfasern

Nach der Charakterisierung der intrinsischen physiologischen Eigenschaften der dLS-Zellen, wurden die synaptischen CA3-Eingänge sowie das CA3-dLS-Netzwerk mittels Optogenetik analysiert. Mittels eines rAAV-Vektors wurde ChR2-eYFP in Neuronen der CA3-Region der rechten Hemisphäre exprimiert. Drei Wochen nach rAAV-Injektion konnte ChR2-eYFP auch in Axonen von CA3-Neuronen bilateral innerhalb des dLS detektiert werden (Abb. 10). Die Fasern der CA3-Neuronen projizieren dabei zunächst strikt unilateral bis sie sich im Zielgebiet des dLS in beide Hemisphären aufzweigen. Die Möglichkeit der Lokalisation des ChR2 ermöglichte in den folgenden Experimenten eine schnelle und selektive lichtinduzierte Membrandepolarisation von CA3-Fasern im dLS.

3.4.2 Abhängigkeit der EPSP-Amplitude im dLS von der zur Stimulation der CA3-Fasern verwendeten Laserintensität

Vor der Analyse der synaptischen Eingänge der CA3-Fasern wurden die aktiven und passiven Membraneigenschaften bestimmt, um die Zellen anhand des Bursting-Verhaltens zu kategorisieren. Alle folgenden Ergebnisse stammen von HTB. Insgesamt wurde der Einfluss der synaptischen Eingänge der CA3-Fasern auf 44 dLS-Neuronen untersucht. Vier Neuronen waren keine HTB und wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die ChR2-exprimierenden Fasern wurden mit einzelnen, 10 ms langen Lichtpulsen (Wellenlänge 473 nm) mit steigender Laserintensität stimuliert bis ein EPSP zu erkennen war. Die notwendige Laserintensität betrug zwischen 1,5 und 100 mW. Der strikt monoexponentielle Anstieg des EPSP deutet auf eine synchrone Aktivierung der dLS-Neuronen hin. IPSPs wurden nie detektiert (Abb. 11 A). Die EPSP-Amplitude hing von der verwendeten Laserstärke ab (Abb. 11 A und B). Dabei kam es zur Saturierung der weiteren EPSP-Zunahme bei dem 2,2-fachen der initialen Laserintensität.

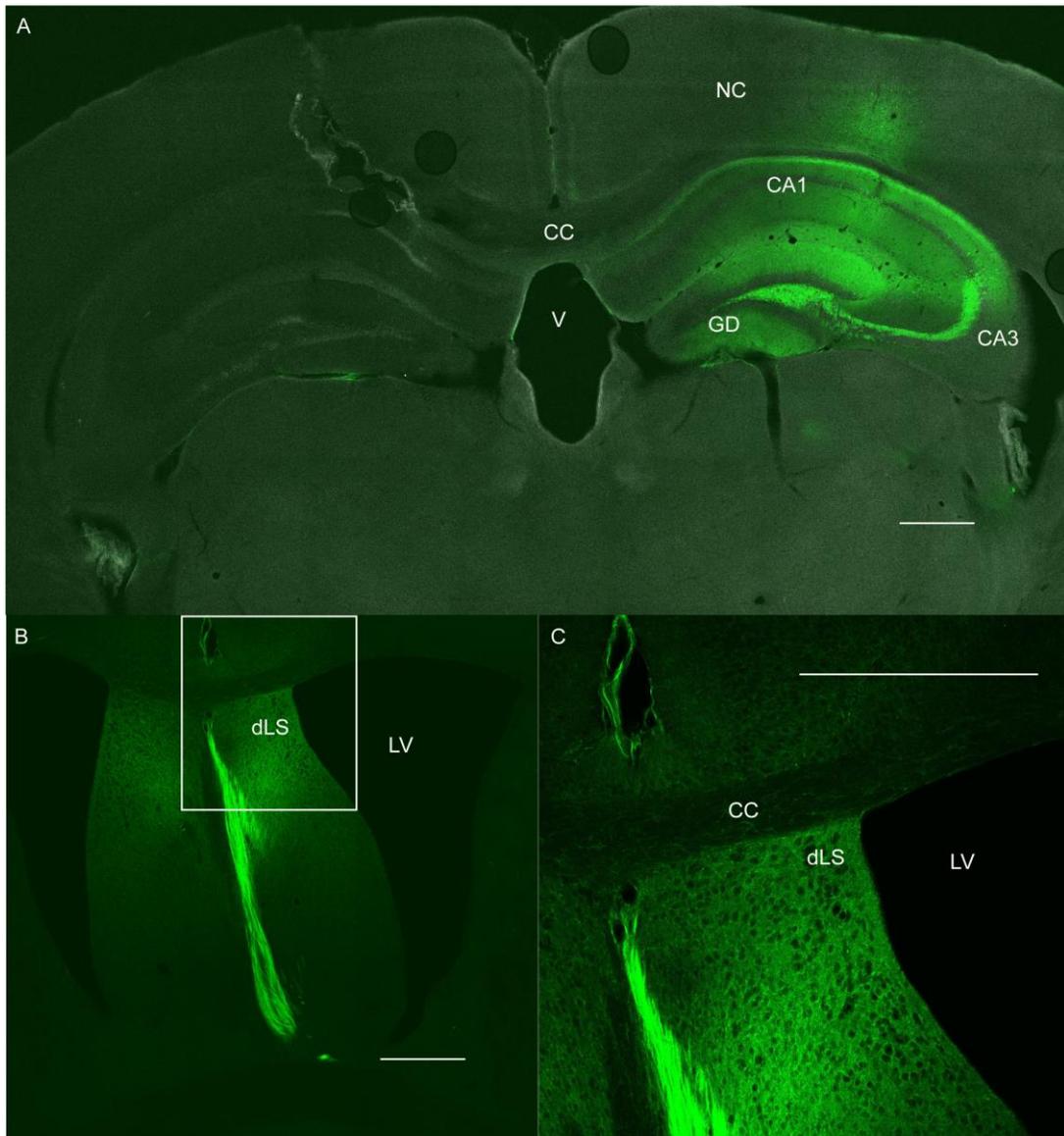


Abb. 10. Input der CA3-Projektionsfasern zum dLS

3–6 Wochen nach stereotaktischer Injektion eines rAAV zur Transduktion eines Fusionsproteins aus Chr2-eYFP in die rechte CA3-Region wurden die Tiere perfundiert und koronare Hirnschnitte des Gehirns hergestellt. Es folgte die Signalverstärkung mit einem anti-eYFP Antikörper und die Analyse mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie. A: Zusammengesetzte Aufnahme des Hippokampus 2.0 mm caudal vom Bregma. Chr2-eYFP wird nach Injektion in CA3-Neuronen exprimiert. B, C: Darstellung des Septums 1.0 mm rostral vom Bregma. Deutlich erkennbar sind die Axone der CA3-Neuronen, die als mediales Faserbündel im Septum aufsteigen und sich schließlich im dLS aufzweigen. Das Quadrat in B markiert das vergrößerte Areal dargestellt in C. Maßstableiste: stets 500 μm . CC = Korpus callosum, V = 3. Ventrikel, GD = Gyrus dentatus, CA1 = Cornus ammonis 1, CA3 = Cornus ammonis 3, LV = Seitenventrikel, NC = Neokortex.

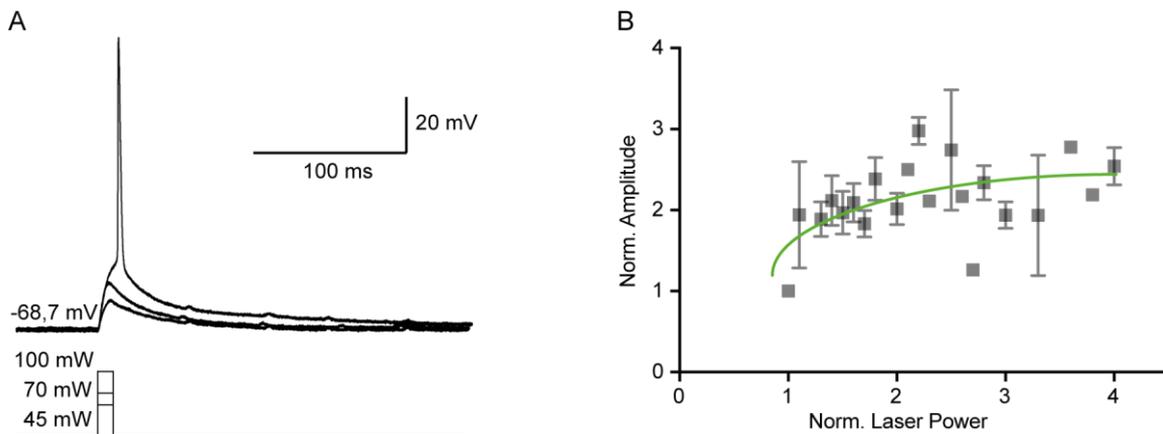


Abb. 11. Abhängigkeit der Amplitude von EPSPs von der zur Stimulation verwendeten Laserleistung der CA3-Eingänge

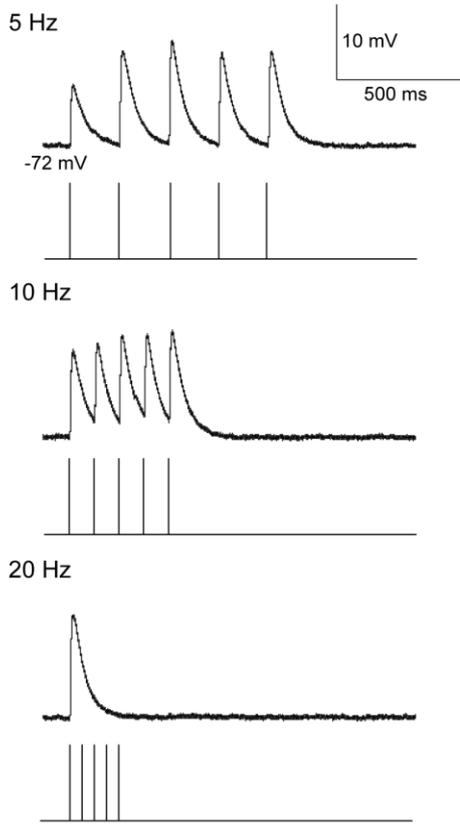
A: Zunahme der EPSP/AP-Amplitude in Abhängigkeit der Laserintensität. Das Beispiel zeigt lichtevozierte EPSP und AP in einem Neuron des dLS durch die Stimulation von CA3-Fasern mit 10 ms langen Lichtpulsen (473 nm) unterschiedlicher Intensität (mW). Das Ruhemembranpotenzial des Neurons betrug -68,7 mV. B: Mittelwerte \pm SEM der EPSP-Amplituden von 40 HTB-dLS-Neuronen (Messungen wie in A). Die grüne Linie zeigt eine exponentielle Anpassung der Abhängigkeit der EPSP-Amplitude von der Laserintensität. Überschwellige Stimulationen wurden nicht analysiert. Die Normalisierung erfolgte auf die geringste Laserleistung, die zur Generierung eines EPSP nötig war. Es zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der Amplitude von der Laserleistung. Die maximale Amplitude wird dabei bei der 2,2-fachen der initialen Laserleistung erreicht.

3.4.3 Synaptische Kurzzeitplastizität im Theta-Bereich zwischen den CA3-dLS-Verbindungen

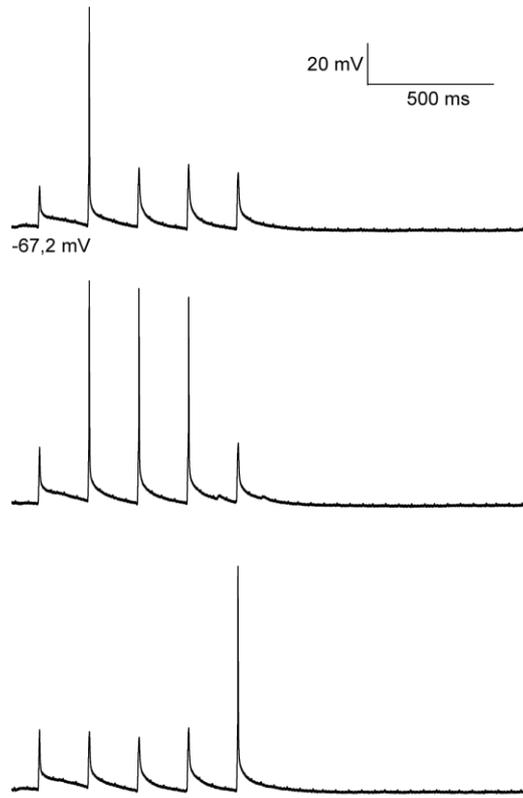
Zur Charakterisierung der Dynamik von EPSPs in dLS-HTB-Neuronen wurden die Fasern der CA3-Neuronen mit Mustern von je fünf Pulsen (10 ms) und einer Frequenz von 5, 10, 20 und 30 Hz und unterschiedlicher Laserintensität (1,5–100 mW) stimuliert (Abb. 12 A). Auch hier wurden die dLS-Neuronen zuvor anhand ihres Bursting-Verhaltens (Bestimmung der aktiven und passiven Membraneigenschaften) charakterisiert. Die Messdaten wurden auf Phänomene der Kurzzeitplastizität wie synaptische Fazilitierung oder Depression hin untersucht. Zur Analyse wurde initial die prozentuale Änderung der EPSP-Amplituden bei den einzelnen Stimuli untersucht. Dabei wurde die Amplitude des ersten EPSP mit dem Durchschnitt der Amplituden der

drei letzten EPSPs verglichen (Abb. 12 E). Bei Stimulationen mit 5 und 10 Hz zeigte sich eine deutliche Zunahme der EPSP-Amplituden mit $34,0 \pm 5,9$ % bei 5 Hz- und $17,2 \pm 4,6$ % bei den 10 Hz-Stimulationen (stets $n=40$). Bei Frequenzen von 20 und 30 Hz hingegen trat das größte EPSP immer nach dem ersten Puls auf, weitere Pulse lösten geringere oder keine EPSPs aus. Von den 40 mit 20 Hz stimulierten dLS-Neuronen folgte in 18/40 Zellen nach dem ersten EPSP kein weiteres. Bei den restlichen 22 Neuronen zeigte sich mit $-80,5 \pm 5,9$ % ein ausgeprägter Amplitudenverlust. Vergleicht man die Amplitudendynamik bei den 5, 10 und 20 Hz Messungen zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen (Abb. 12 C, F; Durbin-Skillings-Mack Test, Beobachteter Wert: $X=42,467$, Kritischer Wert: $X(0,05, 2)=5,991$, $p<0,05$). In den Messungen mit 30 Hz wiesen lediglich drei der 38 stimulierten Neuronen weitere EPSPs nach dem ersten auf. Zwar ist die Anzahl von drei wenig repräsentativ, dennoch zeigt sich ein zunehmender Amplitudenverlust im Vergleich zu 20 Hz Stimulation mit $-88 \pm 5,9$ %. Diese Ergebnisse zeigen eine ausgeprägte Frequenzabhängigkeit synaptischer Kurzzeitplastizität. In 30 von 40 Messungen konnte mindestens ein AP mit einem der fünf Pulse generiert werden (Abb. 12 B). Es wurde daher die Wahrscheinlichkeit für die Generierung eines AP auf die fünf Pulse errechnet (Abb. 12 D). Hierfür wurden nur Messreihen ausgewählt, bei denen mindestens ein und maximal vier AP generiert wurden (Abb. 12 B), um unterschwellige und sättigende Stimulationen von der Analyse auszuschließen. Ein Vergleich der AP-Wahrscheinlichkeiten bei den unterschiedlichen Frequenzen korrespondierte mit den Ergebnissen der EPSP-Dynamik. Auch hier wurde mit dem ersten Puls bei Frequenzen von 20 und 30 Hz ein AP generiert, danach nahm die Häufigkeit immens ab. Dabei war die Wahrscheinlichkeit sowohl von der Frequenz als auch von der Stimulusnummer abhängig (two-way ANOVA, $F(12, 480) = 19,26$ für die Interaktion, $F(4, 480) = 16,07$ für die Stimulusnummer und $F(3, 480) = 83,08$ für die Frequenz; nach Tukey's post-Test $p<0,001$) (Abb. 12 D).

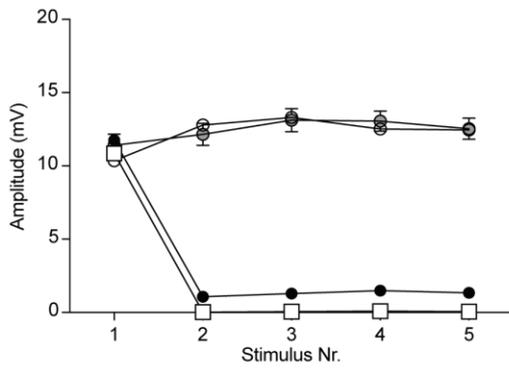
A



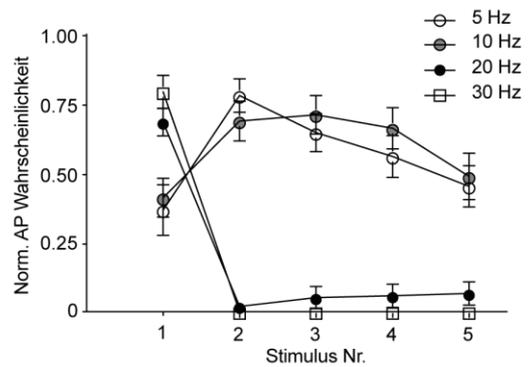
B



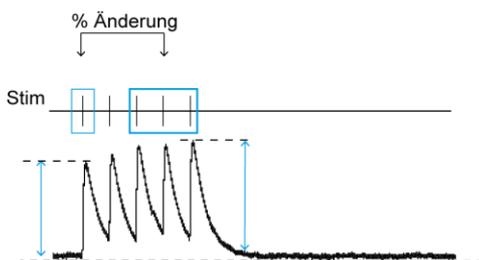
C



D



E



F

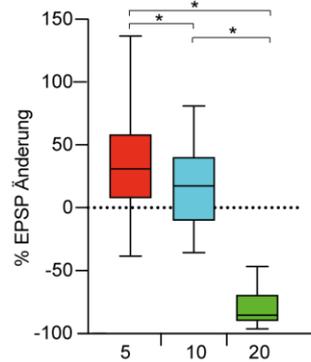


Abb. 12. Übertragung synaptischer Eingänge von der CA3-Region auf das dLS

A: Beispiele der synaptischen Antworten eines dLS Neurons durch die Stimulierung der CA3-Fasern im dLS mit 5, 10 und 20 Hz bei einer Laserintensität von 70 mW. B: Beispiel eines dLS-Neurons mit 10 Hz Stimulierung der CA3-Fasern zur Veranschaulichung der Aktionspotenzial- (AP) Generierung bei einer Laserintensität von 75 mW. Links unten neben der obersten Signalkurven (A, B) ist das Ruhemembranpotenzial angegeben. C: Frequenzabhängige Dynamik der Amplituden von exzitatorischen postsynaptischen Potenzialen (EPSP) nach lichtevozierter Stimulation von Channel-Rhodopsin-2- (ChR2) transzifizierten CA3-Axonon mit fünf je 10 ms lang dauernden Pulsen mit 5, 10, 20 und 30 Hz. Die Graphen bilden die Mittelwerte \pm SEM (5–20 Hz: n=40, 30 Hz: n=39) ab. D: Mittelwerte \pm SEM (5 Hz: n=25; 10 Hz: n=27; 20 Hz: n=27; 30 Hz: n=25) der AP-Wahrscheinlichkeit auf einen der fünf Pulse. Die AP-Wahrscheinlichkeit war signifikant sowohl von der Frequenz als auch von der Stimulusnummer abhängig. (two-way ANOVA; $p < 0,001$; Tukey's post-Test). Die Ergebnisse aus D korrespondieren mit denen aus C. E: Beispiel einer 10-Hz-Stimulation. Stim. zeigt die einzelnen Stimuli an. Die blauen Rechtecke markieren den ersten und die letzten drei Stimuli. Die blauen Pfeile zeigen die Amplituden an. Die Darstellung dient zum besseren Verständnis von F. F: Änderung der EPSP-Amplitude in % während der Stimulation gemäß der Methode veranschaulicht in E. Der Mittelwert der letzten drei Amplituden wurde mit der Amplitude des ersten EPSP verglichen. Negative Werte bedeuteten eine Amplitudenabnahme, also Depression, während positive auf Fazilitierung hindeuteten. Die Box-Plots zeigen den Median, den Interquartilsabstand, Minimum und Maximum der Amplitudenänderung bei Stimulationen mit 5 Hz (rot), 10 Hz (blau) und 20 Hz (grün). * bedeutet $p < 0,05$ (Durbin-Skillings-Mack-Test, beobachteter Wert: $X=42,467$, Kritischer Wert: $X(0,05, 2)=5,991$).

3.4.4 Einfluss des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Gabazine auf die CA3-dLS/HTB-Verbindung

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine GABA_A-Rezeptor-vermittelte Inhibition eine Rolle bei der Verarbeitung der hippokampalen Eingänge einnimmt und ob sie zur frequenzabhängigen Dynamik der exzitatorischen synaptischen Transmission beiträgt. Hierzu wurden wieder die ChR2-exprimierenden CA3-Axone mittels kurzer (10 ms) Lichtpulse (473 nm) erregt und die resultierenden postsynaptischen Potenziale gemessen. Diese Messungen wurden dann in Anwesenheit des selektiven GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Gabazine (10 μ M) wiederholt und der Effekt von Gabazine auf die Kinetik und Amplitude der postsynaptischen Potenziale quantifiziert. Insgesamt wurde nach Laserstimulation optogenetisch die Kinetik der CA3-Eingänge auf acht HTB vor und nach Gabazine-Applikation untersucht (Abb. 13 A). Bei den 10 ms langen Einzelpuls-Stimulationen kam es durch die Gabazine-Gabe weder zu einer signifikanten

Erhöhung der EPSP-Amplitude (Kontrolle: $6,0 \pm 1,4$ mV; Gabazine: $6,8 \pm 1,5$ mV; gepaarter t-Test, $t_{(7)}=0,8$, $n=8$, $p=0,4308$; Signifikanzniveau: $p<0,05$), noch zu einer veränderten Spanne zwischen De- zu Repolarisation auf halber Höhe der Amplitude nach einem Laserpuls von 10 ms (Kontrolle: $33,9 \pm 4,1$ ms; Gabazine: $39,7 \pm 4,5$ ms; gepaarter t-Test, $t_{(7)}=1,3$, $n=8$, $p=0,2476$; Signifikanzniveau: $p<0,05$) (Abb. 13 B und C). Jedoch kam es zu einer signifikanten Depolarisation des Ruhemembranpotenzials von -67 mV ± 1 mV vor Gabazineapplikation auf $-65 \pm 0,8$ mV danach (gepaarter t-Test, $t_{(7)}=4,579$, $p=0,0025$; $n=8$; Signifikanzniveau: $p<0,01$) (Abb. 13 D, F). Eine Depolarisation des Ruhemembranpotenzials nach Hemmung der GABA_A-Rezeptoren deutet auf eine mögliche tonische Inhibition hin. Zur weiteren Validierung dessen, wurde untersucht inwieweit sich durch Hemmung der GABA_A-Rezeptoren die Membranzeitkonstante während der EPSP-Repolarisation verändert. Die Messungen wurden hierfür gegebenenfalls skaliert und die Membranzeitkonstante mittels exponentiellem Fit vom Amplitudenmaximum bis zum Ruhemembranpotenzial ermittelt (Abb. 13 E). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Repolarisationszeit unter Gabazine in den acht Zellen von vor $58,1 \pm 7,6$ ms auf durchschnittlich $51,3 \pm 5,8$ ms nach Gabazineapplikation (gepaarter t-Test, $t_{(7)}=2,076$, $p=0,0766$; $n=8$, Signifikanzniveau: $p<0,05$) (Abb. 13 G).

Bezüglich der Untersuchung des Einflusses von Gabazine auf die Dynamik der synaptischen Transmission erfolgten Faserstimulationen mit fünf Pulsen (je 10 ms) mit einer Frequenz von 5, 10 und 20 Hz in acht Neuronen (Abb. 14 A, B, C). Die Analyse der Kurzzeitplastizität zeigte beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der Gabazine-Gruppe sowohl bei 5- als auch 10-Hz-Stimulationen keinen signifikanten Einfluss von Gabazine auf die prozentuale EPSP-Änderung ($n=8$, Wilcoxon-Test; 5 Hz: $p=0,3125$; 10 Hz: $p=0,6406$) (Abb. 14 F). Da bei den 20 Hz-Stimulationen in nur zwei Neuronen auf das erste EPSP weitere EPSPs folgten, wurde auf die weitere Analyse verzichtet.

Zur Bestimmung der Wahrscheinlichkeit der AP-Generierung wurden 5-Puls-Stimulationsexperimente (je 10 ms, 5 und 10 Hz) vor und nach Gabazine-Gabe durchgeführt. Ausgewertet wurden sechs der acht Neuronen, die überschwellig stimuliert werden konnten. Sowohl bei 5 Hz als auch bei 10 Hz stieg die Wahrscheinlichkeit der AP-Generierung nach Gabazine-Applikation nach jedem Puls

signifikant an (gepaarter t-Test, 5 Hz: $t_{(4)}=7,5$, $p=0,0017$; 10 Hz: $t_{(4)}=13,2$, $p=0,0002$; Signifikanzniveau: $p<0,05$) (Abb. 14 D und E).

Bei den Einzelpuls-Stimulationen und der EPSP-Dynamik war zwar kein Einfluss der GABA_A-vermittelten Inhibition erkennbar, jedoch bei überschwelligen Stimulationen im Theta-Bereich von 5–10 Hz.

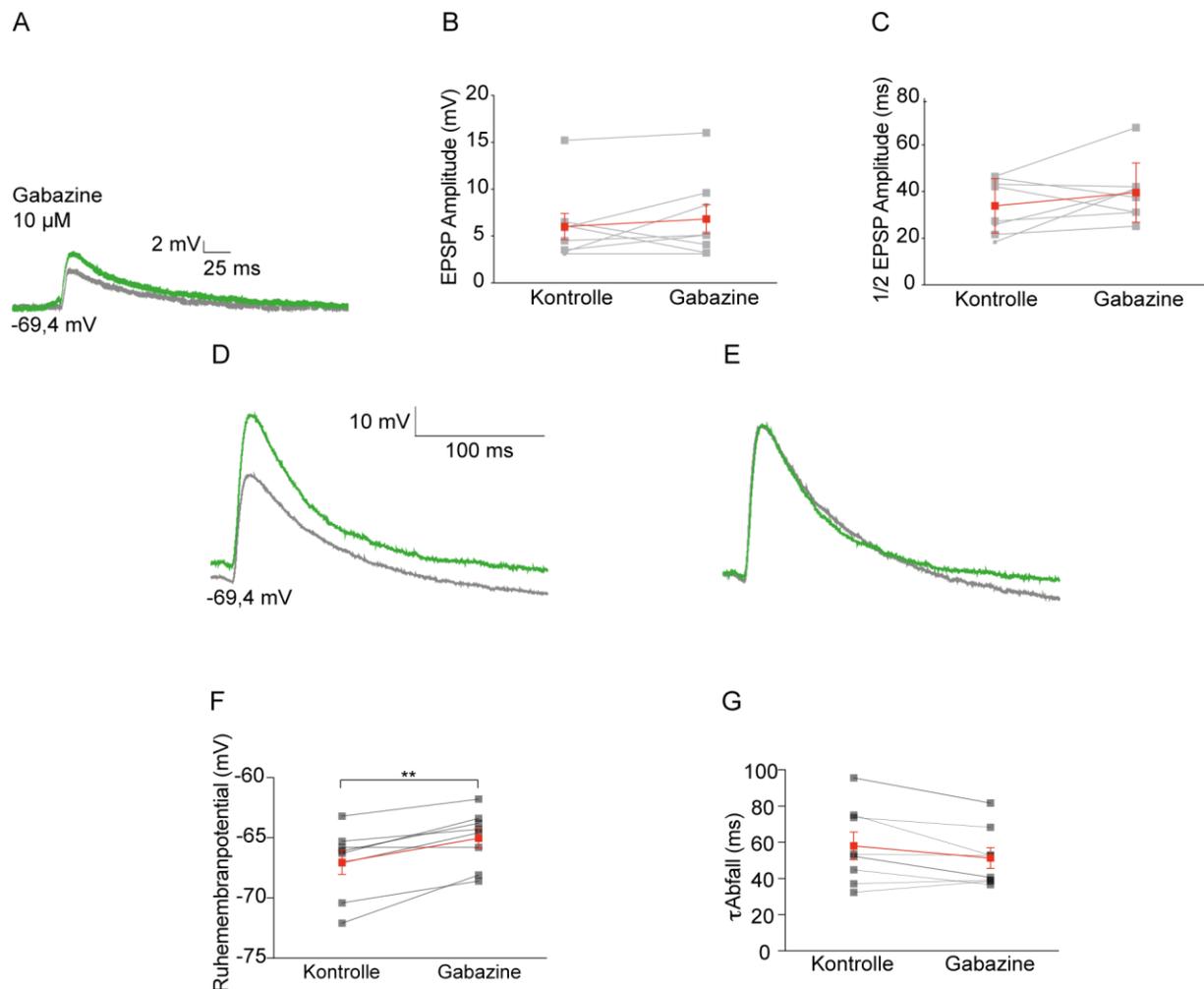


Abb. 13. Einfluss der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Inhibition im CA3-dLS-Netzwerk auf HTB-Neuronen

Während der optogenetischen Versuche wurde die GABA_A-Rezeptor-vermittelte Inhibition mittels des Rezeptorblockers Gabazine aufgehoben. A: Die CA3-Fasern wurden im dLS zunächst mit 10 ms langen Einzelpulsen vor und nach Gabazineapplikation stimuliert und die EPSP-Amplituden in dLS-HTB-Neuronen untersucht. Grau: Kontroll-EPSP, Grün: EPSP nach Gabazineapplikation. B, C: Der Vergleich der Kinetik zeigte keine signifikanten Unterschiede bei den EPSP-Amplituden (B) und der Spanne zwischen De- zu Repolarisation auf halber Höhe der Amplitude bei den Einzelpuls-Stimulationen (C) (gepaarter t-Test; Amplitude: $t_{(7)}=1,2$, $n=8$, $p=0,2875$; Spanne zwischen De- zu Repolarisation auf halber Höhe der Amplitude: $t_{(7)}=1,3$, $n=8$, $p=0,2476$; $p>0,05$). Das Ruhemembranpotential stieg hingegen signifikant in allen Neuronen nach Gabazineapplikation an (gepaarter t-Test; $n=8$; ** markiert $p<0,01$) (D, F). Ein signifikanter Unterschied der Membranzeitkonstante nach Hemmung der IPSPs war nicht festzustellen (gepaarter t-Test; $n=8$; $p>0,05$) (E, G). Das Ruhemembranpotential des dargestellten Neurons betrug -69,4 mV. Grau: Kontrolle EPSP, Grün: EPSP nach Gabazineapplikation. Rot: Mittelwerte \pm SEM.

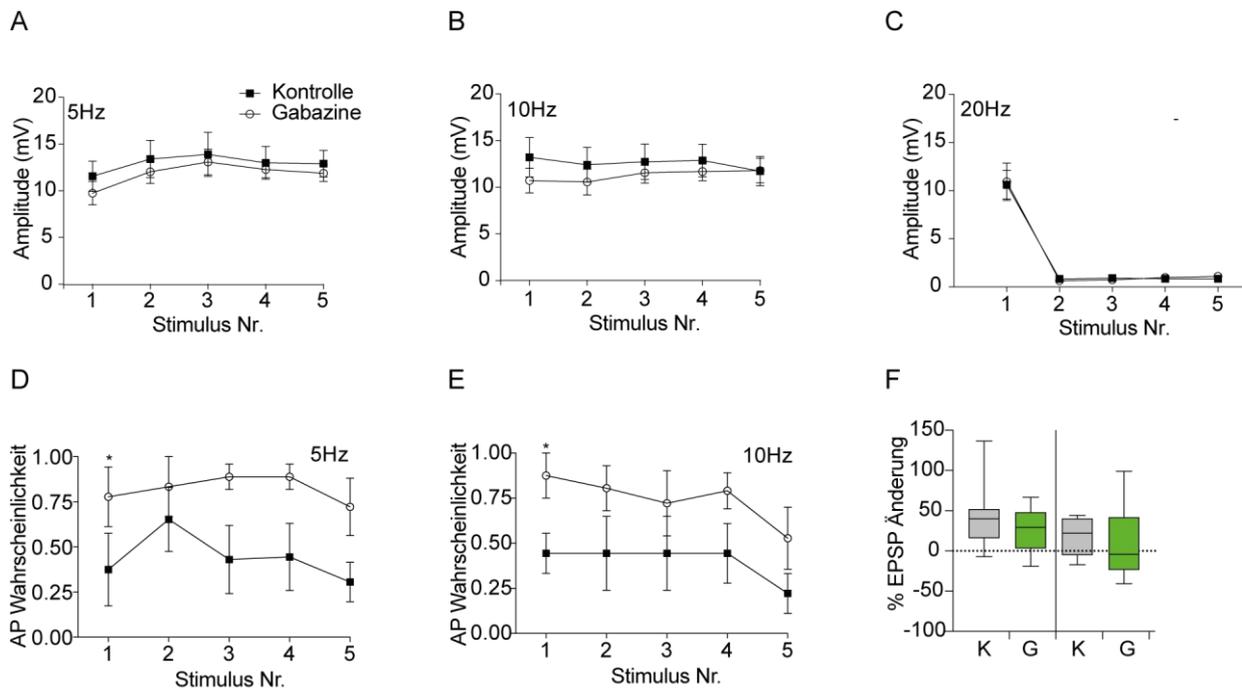


Abb. 14. Einfluss der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Inhibition auf Phänomene der Kurzzeitplastizität auf HTB-Neuronen im CA3-dLS-Netzwerk

A, B, C: Bezüglich der Untersuchung auf Phänomene der Kurzzeitplastizität erfolgten Faserstimulationen mit fünf Pulsen von je 10 ms Länge mit einer Frequenz von 5, 10 und 20 Hz in acht Neuronen. Dargestellt sind stets die Mittelwerte \pm SEM. Die Amplituden zeigen einen ähnlichen Verlauf in der Kontroll- und Gabazinegruppe bei 5 (A), 10 (B) und 20 Hz (C). D, E: Dagegen erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit der AP-Generierung bei einer 5-Puls-Stimulation (5 (D) und 10 Hz (E)) nach Gabazine-Gabe für jeden der fünf Pulse ($n=6$, gepaarter t-Test; $p<0,05$). * markiert einen signifikanten Unterschied. F: Vergleich der prozentualen Änderungen der EPSP-Amplituden zwischen der Kontrollgruppe (K, grau) mit der Gabazinegruppe (G, grün) bei 5 und 10 Hz. Der Mittelwert der letzten drei Amplituden wurde mit dem ersten EPSP verglichen (Methode: s. Abb. 12 E). Darstellung von Box-Plots mit dem Median, Interquartilsabstand sowie Minima und Maxima. Es zeigte sich keine signifikante Änderung in Bezug auf Phänomene der synaptischen Kurzzeitplastizität durch GABA_A-Rezeptor-vermittelte Inhibition (Wilcoxon-Test; 5 Hz: $p=0,3125$; 10 Hz: $p=0,6406$).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die dLS-Neuronen sowohl elektrophysiologisch (,Whole-cell current-clamp'-Methode) als auch morphologisch charakterisiert sowie die physiologischen Eigenschaften von SST-Neuronen im dLS (Cre/loxP-System) untersucht. Weiterhin wurden die dCA3-Eingänge selektiv auf HTB-dLS-Neuronen analysiert, um ein tiefergehendes Verständnis des dCA3→dLS→VTA-Netzwerks zu erhalten.

4.1 Charakterisierung der Mehrheit der dLS-Neuronen als Burster

Es wurde zunächst versucht, mittels ,Whole-cell current-clamp'-Messungen anhand von passiven und aktiven Membraneigenschaften, einen Einblick in die Physiologie der dLS-Neuronen zu erhalten sowie diese zu klassifizieren. Bei der Untersuchung der aktiven Membraneigenschaften fiel auf, dass die Mehrheit der dLS-Neuronen Burstentladungen zeigen. Eine physiologische Klassifikation der dLS-Neuronen anhand der Bursting-Fähigkeit wurde bereits von Gallagher et al. (1995) durchgeführt. Bei der Kategorisierung der Zellen anhand ihres Bursting-Verhaltens definierten die Autoren Burster als Zellen, die mindestens vier APs mit einer Frequenz von > 20 Hz generieren. Dabei wurden in der Arbeit Bursts beschrieben, die bei leichter, jedoch ständiger Depolarisation aufgetreten sind und die Stimulation ging über mehrere Sekunden. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch Zellen als Burster bezeichnet, die mindestens zwei APs aufeinanderfolgend generierten, bevor sie eine markante Hyperpolarisation zeigten. Die Zuordnung der Zellen zu Burstern bzw. Nichtburstern erfolgte anhand der Differenz der Δ AHP in Messungen mit ≥ 3 AP ähnlich der Methode von Chen et al. (2011) (s. Kap. 3.1.1). In der Literatur existieren unterschiedliche Bursting-Definitionen (Ranck, 1973; Sanabria et al., 2001; Simonnet und Brecht, 2019). Gemeinsame Charakteristika sind jedoch eine kurze Generierung mehrerer schnell aufeinanderfolgender APs, häufig auf einer plateauartigen Depolarisation, gefolgt von einer Pause und/oder Repolarisationsphase. Die Entscheidung fiel hier auf diese Definition, da bei den initialen explorativen Messungen zwischen einzelnen AP-Gruppen eine ausgeprägte

Hyperpolarisation auffiel. Analog zur Arbeit von Gallagher et al. (1995) wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchung im dLS Neuronen mit der Fähigkeit zum Bursten sowie regulär feuernende Neuronen mit gleichmäßigen AP-Abstand beobachtet. Auch bei Gallagher et al. (1995) wurden drei Zellgruppen mit unterschiedlichen Bursting-Fähigkeiten beobachtet. Trotz abweichender Definition wurde ein relativ ähnliches Verhältnis der Zelltypen ermittelt. Neuronen, die bereits bei der Rheobase bursten (LTB, Gallagher et al.: Typ-III-Neuronen) waren am seltensten (Gallagher et al.: 15 %, hier: 5,5 %), gefolgt von Neuronen ohne Bursting-Fähigkeit (RF, 14,1 %; bei Gallagher et al.: Typ-I-Neuronen, 20%). In beiden Arbeiten dominierten Neuronen, die bursten (HTB, 80,5 %; Gallagher et al.: Typ-II-Neuronen, 60–70 %). Bei Gallagher et al. (1995) konnten diese Zellen jedoch nur im Beisein von Muscarin, einem Agonisten an muskarinergen Acetylcholinrezeptoren, oder trans-ACPD ((±)-1-Aminocyclopentane-*trans*-1,3-dicarboxylic Säure), einem Agonisten der Gruppe I und II metabotropen Glutamatrezeptoren, bursten. Ein Bursten ohne die Aktivierung von metabotropen Rezeptoren, wie in der hier vorliegenden Arbeit, konnten Gallagher et al. nicht beobachten. Eine Ursache könnte in der Nutzung der scharfen Mikroelektroden liegen. Bereits in zuvor publizierten Arbeiten wurde gezeigt, dass im Vergleich zu ‚Whole-cell patch-clamp‘-Messungen deutlich mehr Strom notwendig war, um in bestimmten Neuronen das gleiche Feuermuster zu erhalten (Aiken et al., 2003). Häufig liegt dies an den Membranschäden, die scharfe Elektroden verursachen und mit damit einhergehenden Leckströmen. Einschränkend ist zu erwähnen, dass andere Studien veranschaulichten konnten, dass sich mit scharfen Mikroelektroden die eigentlichen Feuermuster nicht verändern (Li et al., 2004).

Eine weitere Übereinstimmung der hier vorliegenden Arbeit und den Ergebnissen von Gallagher et al. besteht darin, dass das ADP in burstenden Neuronen signifikant größer war als in RF- bzw. Typ-I-Neuronen. Darüber hinaus hatten bei Gallagher et al. Typ-I-Neuronen größere Nachhyperpolarisationpotenziale im Vergleich zu den anderen beiden Zellgruppen, während es in dieser Arbeit keine relevanten statistischen Unterschiede in den mAHPs gab (Kap. 3.1.2).

Die Burstentladung ist ein ubiquitär vorkommendes Phänomen im ZNS. Sowohl extrinsische als auch intrinsische Eigenschaften führen zu diesem Vorgang. Die Wirkmechanismen sind mannigfaltig. Generell lassen sich jedoch einige wesentliche

Feststellungen zusammenfassen. Zum einen erhöht die Burstentladung die Wahrscheinlichkeit der Informationsübertragung, insbesondere an instabile Synapsen (Huerta und Lisman, 1995; Lisman, 1997). Burstende Neuronen zeigen dabei einen viel stärkeren Einfluss auf ihre Zielneuronen als regulär feuernde Zellen (Shermann, 2001). In einem Stimulationsverlauf kodieren einzelne APs und Bursts parallel für unterschiedliche Informationen (Malinow et al., 1994; Oswald et al., 2004; Stevens und Wang, 1995). Gleichzeitige sensorische und motorische Eingänge rufen dendritische Spikes hervor (durch supralineare Integration) (Xu et al., 2012). Diese dendritischen Spikes können AP-Bursts hervorrufen, die dann wiederum als Code für gefühlte Berührung (sensorisch) bei gleichzeitiger Bewegung (motorisch) dienen (Kock et al., 2021; Larkum et al., 1999). Auch fördern Burstentladungen die Komprimierung, Filterung und Präzisierung von Informationen (Lisman, 1997). ‚Place-Fields‘ lassen sich präziser definieren, wenn Neuronen bursten (Otto et al., 1991). Wie bereits in der Einleitung dargelegt stellten Luo et al. (2011) fest, dass der dCA3→dLS→VTA-Pfad eine Rolle bei kontextabhängigem zielgerichtetem Handeln spielt. Dies setzt voraus, dass zuverlässig Informationen über den räumlichen Kontext des Tieres vom Hippokampus zum VTA weitergeleitet werden, um eine Assoziation mit einer möglichen Belohnungen herzustellen. Bei Luo et al. (2011) waren dies Informationen über bestimmte örtliche Begebenheiten, die auf die Verfügbarkeit von Suchtmitteln hinwiesen. Um kontextrelevante Informationen von der dCA3 weiterzuleiten, sind Filtermechanismen in den Zielregionen unabdingbar. Cattaneo et al. (1981) zeigten, dass im primären visuellen Kortex die Präsentation von visuellen Stimuli sowohl die Rate an einzelnen APs, aber auch an Bursts erhöhte. Burstentladungen schienen dabei insbesondere bei der Orientierung eines Gegenstandes im Raum von großer Relevanz zu sein während einzelne APs hierbei keine Rolle spielten und eher eine Form von Rauschen darstellen. Die Fähigkeit einzelner APs, die eventuell beim spontanen Feuern einen Störfaktor darstellen, zu filtern ohne Bursts zu kompromittieren, stellt eine sinnvolle Filterfunktion dar (Lisman, 1997). Auch im dLS könnte dies das Feuerverhalten der Neuronen erklären und den burstenden Interneuronen eine Filterfunktion zusprechen. Burstentladung wäre hier auch ein Ansatz, um die Übertragungssicherheit von Informationen zu gewährleisten.

Einschränkend ist zu erwähnen, dass in den Versuchen der vorliegenden Arbeit durch die optogenetischen Stimulationen keine Bursts generiert werden konnten, sondern lediglich durch die elektrischen Stimulationen. Dies spricht dafür, dass es sich bei den dLS-Neuronen eher um eine intrinsische Eigenschaft der Neuronen handelt (ein quasi fest installierter Filter) als um eine Netzwerkeigenschaft.

In den vorliegenden Messungen generierten sowohl HTB als auch LTB während einer Stimulation vornehmlich initial eine plateauartige Burstentladung, um dann nach einem signifikanten AHP akkomodierend reguläre APs zu erzeugen (Abb. 3 B, C). Ein initiales Burstentladen wurde sowohl bei einigen Pyramidenneuronen im Subikulum und in der Schicht V des Neokortex als auch bei einigen Interneuronen nachgewiesen (Dunn et al., 2019; Markram et al., 2004; Wang et al., 2004). Der initiale Burst entsteht vor allem während einer starken Depolarisation der Dendriten. Die reine Stimulation des Somas führt dagegen u. a. in den Pyramidenzellen der Schicht V des Neokortex zu regulären APs. Ursache hierfür ist meist eine Interaktion aus dendritischen Ca^{2+} - und somatischen Na^{+} -Strömen (Schwindt und Crill, 1999). Es zeigte sich somit in dieser Arbeit, dass das dLS eine weitere Region darstellt, die burstende Projektionsneuronen besitzt, die stets, jedoch nicht ausschließlich, zu Beginn einer Stimulation bursten. Welche Funktion das initiale Burstentladen erfüllt ist bisher ungewiss.

4.1.1 SST⁺-HTB-Neuronen des dLS

Neben einer physiologischen Klassifikation, erfolgte in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Charakterisierung der Neuronen des dLS unter Berücksichtigung ihres hauptsächlich molekularen Markers. Risold und Swanson (1997b) klassifizierten anhand der anatomischen Lage, der Ein- und Ausgänge sowie mittels in-situ Hybridisierung drei Regionen im LS und identifizierten SST⁺-Neuronen als Hauptneuronen im dLS. SST⁺-Neuronen sind relativ heterogen, unterscheiden sich je nach Gebiet und Funktion in ihren molekularen, elektrophysiologischen sowie anatomischen Eigenschaften (Fishell und Rudy, 2011; Gibson et al., 1999; Hu et al., 2013; Markram et al., 2004). Sie sind u. a. im Hippokampus sowie im Neokortex wichtige Interneuronen mit hoher Spontanaktivität speziell im Theta-Bereich von 4–10

Hz (Fanselow et al., 2008; Urban-Ciecko et al., 2015). Durch die vorliegenden Untersuchungen konnte das Ergebnis von Risold und Swanson (1997b), dass das dLS vorwiegend durch viele SST-exprimierende Neuronen charakterisiert wird, in transgenen SST-Cre-Mäusen reproduziert werden. Eine Cre-abhängige Expression von tdTomato- bzw. mCherry-Genen nach AAV-Injektion ins Septum dieser Mäuse führte ausschließlich im dLS zur Expression der beiden Marker. Das Experiment belegt die Existenz eines ausgedehnten Netzwerkes von SST⁺-Neuronen im dLS (Abb. 6). Bei der physiologischen Charakterisierung der SST⁺- und SST⁻-Neuronen mittels der ‚Whole-cell current-clamp‘-Methode zeigte sich, dass die Mehrheit der SST⁺-Neuronen HTB waren. Weiterhin zeigten die SST⁺- und SST⁻-Neuronen im dLS keine Unterschiede bezüglich der Burstentladungen und der passiven und aktiven elektrophysiologischen Eigenschaften auf. Die Mehrheit der SST⁺- und SST⁻-Neuronen waren HTB, die sich in den aktiven und passiven Membraneigenschaften nicht unterschieden. Dennoch bleibt offen, ob die Zellen unterschiedliche Ein- und Ausgänge aufweisen und so in unterschiedlichen Netzwerken eine Rolle einnehmen. Auch ließen sich Rezeptoren für SST in den dLS-Zielgebieten bisher nicht nachweisen. Sowohl im Ncl. supramammilaris, lateralen Hypothalamus sowie dem VTA sind SST⁺-Interneuronen vorzufinden, jedoch konnten entsprechende Rezeptoren, bis auf im dLS selbst, bisher nicht nachgewiesen werden (Gonzalo Ruiz et al., 1999; Nagaeva et al., 2020; Reubi und Maurer, 1985). Interessanterweise sinkt die SST-Produktion in erwachsenen Nagern (Forloni et al., 1990). Möglicherweise unterscheidet sich die Funktion der Zellen daher nur in den frühen Phasen der Ontogenese. Darüber hinaus wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchung ein SST⁺-Neuron mit RF-Charakteristika identifiziert. Dieser Befund lässt den Schluss zu, dass nicht alle SST⁺-Neuronen per se HTB sind. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass nicht auszuschließen ist, dass einige der als SST⁻-Neuronen klassifizierten Zellen SST exprimieren, da möglicherweise nicht alle Neuronen mittels rAAV infiziert wurden. Ebenso ist zu beachten, dass Neuronen auch fälschlicherweise als SST⁺ identifiziert wurden. Eine solche falsch positive Markierung mittels rAAV-Vektor konnte bei der hier verwendeten SST-Cre-Mauslinie bereits in der hippocampalen CA3 nachgewiesen werden (Müller-Komorowska et al., 2020). Diese falsche Markierung betrifft jedoch nur wenige Zellen (Hu et al., 2013). Eine gleichzeitige Markierung der Neuronen nach den Messungen mittels einer

Antikörperfärbung hätte hier ergänzend zur Verifizierung und Präzisierung führen können.

4.1.2 Morphologische Eigenschaften der HTB-dLS-Neuronen

Die HTB-Neuronen wurden mittels einer Kombination aus elektrophysiologischen und morphologischen Experimenten genauer charakterisiert. Die Somagröße der Zellen betrug $225,4 \pm 33,6 \mu\text{m}^2$. Weiterhin zeigten die HTB-Zellen morphologisch eine immense Dendritifizierung mit initial 3–7 Dendritenabgängen und einer kritischen Distanz, also die höchsten Verzweigungsdichte, $67 \pm 5,6 \mu\text{m}$ vom Soma entfernt. Hier befanden sich die Dendriten der dritten Ordnung. Ebenso konnten erst ab dieser Ordnungshöhe dendritische Spines ausgemacht werden. Die meisten exzitatorischen Synapsen sind auf dendritischen Spines lokalisiert (Berry und Nedivi, 2017), wo sich vermutlich auch hier der meiste dCA3-Input befindet. Diese Gegebenheit gewährleistet durch eine relativ kurze kritische Distanz im Vergleich zur Gesamtlänge der Dendriten eine reliable, schnelle und effektive Informationsübertragung und trägt damit zu einer starken funktionellen Konnektivität der dCA3-dLS-Verbindung bei. Da alle untersuchten Neuronen initiale Burstentladungen generierten und diese durch eine starke Depolarisation von Dendriten, durch Interaktion dendritischer Ca^{2+} - und somatischer Na^+ -Ströme (Schwindt und Crill, 1999), verursacht werden, liegt die Vermutung nahe, dass nahe der aktivierten Spines auch die erwarteten Ca^{2+} -Ströme generiert werden. Die Morphologie der RF- und LTB-Neuronen und eventuelle Unterschiede dieser Zellpopulationen im Vergleich zu den HTB-Neuronen bleiben offen, da es nicht gelang, diese Neuronen in ausreichender Anzahl zu rekonstruieren. Weitere systematische Untersuchungen wären notwendig, um die Morphologie der SST⁺/SST⁻-Neuronen in Kombination mit deren elektrophysiologischen Eigenschaften zu erkunden.

4.1.3 Theta als führender Rhythmus der dLS-Neuronen

Eine auch klinisch weit verbreitete Möglichkeit Gehirnaktivität zu messen, ist das Elektroenzephalogramm (EEG). Die dabei registrierten rhythmischen oszillierenden

Feldpotenziale werden anhand ihrer Frequenz eingeteilt und sind sowohl in Nagetieren als auch in Menschen mit bestimmten Verhaltensmustern assoziiert. Die dominierende oszillatorische Aktivität des Hippokampus sind Theta-Wellen mit einer Frequenz von ca. 4–10 Hz. Sie entstehen durch die synchronisierte Aktivität von inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen vornehmlich in Verbindung mit cholinergen Eingängen des medialen Septums/diagonalen Bands von Broca (Dannenberg et al., 2015; Petsche et al., 1962). Theta-Wellen im Hippokampus von Mäusen treten während des Erforschens der Umgebungen (z.B. Lokomotion, Schnüffeln und dergleichen) auf, aber auch während des paradoxen REM- (engl. Rapid Eye Movement) Schlafs (Jouvet, 1969; Vanderwolf, 1969). Sie sind fundamental für das Kodieren und die Integration neuer Informationen in bestehende Gedächtniskonstrukte bzw. bei der Kopplung von semantischen und episodischen Gedächtnisinhalten (Berry und Thompson, 1978; Buzsáki, 2002; Buzsáki, 2005; Lega et al., 2012; Pickenhain und Klingberg, 1967). In Menschen ist die klinische Definition von Theta 4–8 Hz, während Alpha mit 8–12 Hz definiert wird. In Nagetieren hingegen haben Frequenzen von 4–10, z. T. bis 12 Hz die gleiche physiologische Bedeutung und gelten kombiniert als Theta (Goyal et al., 2020). Bereits 1998 machten Pedemonte et al. zwei unterschiedliche Populationen im dLS aus: zum einen ca. 68 % der Neuronen, die in Korrelation mit hippokampalen Theta-Rhythmen aktiv waren und zum anderen die restlichen 32 %, deren physiologische Aktivität unabhängig von hippokampalen Theta-Feldpotenzialen war. Dabei zeigten diejenigen Neuronen, die in Korrelation mit hippokampalen Theta-Wellen aktiv waren, eine Bursting-Aktivität, während die anderen meistens isolierte APs generierten. Luo et al. (2011) verifizierten durch die elektrische Stimulation der dCA3 und Ableitungen im VTA, dass die Mehrheit der VTA-Neuronen auf Stimulationen der dCA3-Neuronen in Theta-Frequenzbereich reagierte. Dabei beobachteten sie zwei unterschiedliche Antworten. Die Stimulation erhöhte zum einen die Feuerrate von potenziell dopaminergen Neuronen, während die Feuerrate der vermeintlich GABAergen Interneuronen sank. Die Hemmung des dLS mittels GABA unterband diese Signalweitergabe und lässt somit vermuten, dass die hippokampale Theta-Aktivität das VTA via dLS erreicht. Somit scheint das dLS nicht nur mit der hippokampalen Theta-Aktivität verbunden, sondern auch bei der Weitergabe dieser Rhythmen an subkortikal gelegene Regionen wie dem VTA beteiligt zu sein. In unseren Untersuchungen zeigten

alle Neuronen ein grundlegendes Feuerverhalten auf längere Depolarisationen im Theta-Bereich, wobei kein Unterschied zwischen RF, LTB und HTB bestand (s. Kap. 3.1.2, Abb. 3 G, H und I). Die Mehrheit dieser Neuronen generierte Bursts. Vermutlich sind dabei die Neuronen mit der Fähigkeit der Burstentladung, also HTB und LTB, diejenigen, die in Abhängigkeit der Theta-Wellen im Hippokampus aktiv sind. Diese würden dann dafür sorgen, dass hippokampale Aktivitätsmuster reliabel in den Zielgebieten ankommen, also auch im VTA. Umgekehrt würde dies bedeuten, dass die RF-Zellen unabhängig von der hippokampalen Theta-Aktivität sind. Hier ergeben sich mehrere Fragen. Zum einen ist unklar, ob ein Unterschied zwischen der Übertragung mittels HTB oder LTB existiert. Auch bleibt offen, welche Funktion den RF-Neuronen zukommt. Weitere Untersuchungen wären hier notwendig. Ebenso sollte das Vorkommen der dCA3-Eingänge auf RF-Neuronen näher untersucht werden, da es sich in der vorliegenden Arbeit bei zwei der auf dCA3-Eingänge analysierten dLS-Neuronen um RF-Neuronen handelte. Durch die vorliegende Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Neuronen im dLS nach längeren Depolarisationen APs im Theta-Bereich generieren und die Mehrheit dieser Neuronen zur Burstentladung fähig waren. Zudem waren die untersuchten Neuronen in der Lage, exzitatorische Signale im Theta-Bereich aus der dCA3 reliabel zu verarbeiten. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass vor allem LTB und HTB an der Weitergabe der hippokampalen Thetaaktivität beteiligt sind. Dieser Befund ist insbesondere für die Betrachtung der potenziellen Rolle des dLS bei der Informationsweitergabe von der dCA3 an das VTA sowie bei der kontextabhängigen Steuerung zielgerichteten Verhaltens durch räumliche Stimuli relevant. Die Generierung von APs im Theta-Bereich in dLS-Neuronen spricht für eine Beteiligung des dLS an der Verknüpfung von kontextabhängigen Informationen aus dem Hippokampus mit dem dopaminergen Belohnungssystem des VTA.

4.2 dLS als Filterstation zwischen Lernen und Belohnung

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die dCA3-dLS-Verbindung mittels der optogenetischen Methode untersucht. Dabei wurde die Mehrzahl der Messungen von HTB-Neuronen abgeleitet. Im Folgenden beschränkt sich die Diskussion daher auf die Eingänge der dCA3-Pyramidenzellen auf die HTB, die im dLS den dominanten

Neuronentyp darstellen. Der Einfluss der dCA3-Pyramidenzellen auf RF und LTB konnte aufgrund der geringen Anzahl (von allen untersuchten 44 Neuronen waren drei RF und eines LTB) dieser Zellen nicht ausreichend analysiert werden, allerdings wurde in allen untersuchten RF- und LTB-Zellen synaptischer Input von dCA3-Neuronen beobachtet.

4.2.1 Theta als dominantes Stimulationsmuster der dCA3→dLS-Verbindung

In den vorliegenden Versuchen erhielt das dLS massiven Input von der dCA3-Region (s. Kap. 3.4.1). Die Analyse der dCA3-Eingänge mittels Fasersimulation der dCA3-Pyramidenzellen im dLS ergab eine von der Laserintensität abhängige EPSP-Amplitude in den dLS-Neuronen (s. Kap. 3.4.2). In den Experimenten wurde eine Laserleistung von 1,5–100 mW verwendet. Bei einigen Neuronen führten schon wenige mW zu einem AP, während andere bei voller Laserleistung (100 mW) nur ein kleines EPSP generierten. Die Ursache für dieses unterschiedliche Verhalten ist möglicherweise die individuell unterschiedliche dCA3→dLS-Verbindung, woraus ein unterschiedlicher Input resultiert. Aber auch methodische Ursachen sind denkbar. Möglicherweise wurden durch den koronaren Schnitt Fasern derart angeschnitten, dass keine ausreichende Stimulation möglich war. Bei einem konstanten Abstand der Laserquelle wurden potenziell Fasern, die sich weiter weg von der Lichtquelle befanden, nicht ausreichend stimuliert. Eine weitere mögliche Ursache ist die variable ChR2-eYFP-Expression in den Pyramidenzellen, die ein bestimmtes dLS-Neuron innervieren. Denkbar wäre, dass einige der dCA3-Pyramidenzellen nicht mit dem AAV infiziert wurden und daher bei fehlender ChR2-eYFP-Expression nicht durch Licht aktivierbar waren. Eine geringere Stimulation durch dCA3-Fasern ließe sich auch durch ein Absterben von CA3-Fasern bei einem verlängerten Intervall zwischen Präparation und Messung erklären.

Für eine detaillierte Analyse der dCA3-Eingänge wurden die EPSP/AP in HTB-dLS-Neuronen nach einer 5-Puls-Stimulation der CA3-Fasern (Einzelpuls 10 ms, Frequenz 5, 10, 20 oder 30 Hz) mit unterschiedlicher Laserintensität abgeleitet. Dabei wurde eine Stimulation im Theta-Bereich (5 und 10 Hz) reliabel übertragen, während höherfrequente Stimulationen erstaunlicherweise nur beim ersten Puls verlässlich EPSP/AP generieren konnten; die weiteren Pulse führten zu keinen oder nur geringen EPSP/AP. Die EPSP-Amplituden und die AP-Wahrscheinlichkeit zeigten bei den

Stimulationen im Theta-Bereich eine synaptische Fazilitierung, wobei bei den 5-Hz-Stimulationen die Zunahme der EPSP-Amplituden mit 34,0 % deutlich größer war als bei 10-Hz-Stimulationen mit 17,2 %. Die konsekutive Zunahme der EPSP-Amplituden spricht für den Vorgang der Fazilitierung. Bei der synaptischen Fazilitierung kommt es durch die Erhöhung der präsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration zu einer verstärkten und schnelleren Vesikelausschüttung und folglich bei aufeinanderfolgenden Stimuli zu steigenden EPSP-Amplituden (Wu und Saggau, 1994; Zucker und Regehr, 2002). Der komplexe Mechanismus der synaptischen Depression beinhaltet prä-, aber auch postsynaptische Phänomene (Wong et al. 2003; Xu et al., 2007). Anders als die synaptische Fazilitierung äußert sich die Depression in einer sinkenden EPSP-Amplitude bei aufeinanderfolgenden Stimuli. Die durch Fazilitierung erleichterte Informationsübertragung stellt eine Form der synaptischen Kurzzeitplastizität dar und führt damit zu einer verlässlicheren synaptischen Übertragung der hippocampalen Aktivität auf dLS-Neuronen und möglicherweise konsekutiv auf das VTA.

Fraglich bleibt, warum höherfrequente Stimulationen vom dLS nicht verarbeitet bzw. weitergeleitet wurden. Intrinsische Ursachen lassen sich ausschließen, da die Zellen des dLS durch höherfrequente direkte Depolarisation (≤ 50 Hz) repetitiv erregbar waren (Abb. 5). Möglicherweise fungiert das dLS als physiologischer Filter ähnlich einem Tiefpassfilter und leitet nur Informationen im Theta-Bereich von der dCA3-Region an das VTA weiter. Die Hypothese wird zusätzlich dadurch gestützt, dass die dLS-Neuronen selbst vornehmlich APs im Theta-Bereich generieren. Die genauen physiologischen Mechanismen sind aktuell jedoch noch unbekannt. Höherfrequente CA3-Faserstimulationen werden in den dLS-Neuronen dagegen weniger verlässlich weitergeleitet. Auch bei diesen Experimenten sollten mögliche methodische Grenzen berücksichtigt werden. Bei der verwendeten reinen Faserstimulation könnte es im Vergleich zu einem am Soma der dCA3-Pyramidenzelle generierten AP zu einer geringeren Transmitterübertragung kommen (Gruver und Watt, 2019). Des Weiteren zeigten ChR2-Ionenkanäle ein von spannungsabhängigen Ionenkanälen abweichendes Verhalten. Die Zeit, die ein Kanal für die Öffnung nach Lichtstimulation benötigt, ist mit 0,2 ms relativ gering und mit der Öffnungszeit von spannungs- oder ligandenaktivierten Kanälen vergleichbar. Die Zeit bis zum Übergang in den geschlossen aktivierten

Zustand dauert je nach pH-Wert zwischen 10 und 400 ms (Nagel et al., 2003). Für die Versuche wurde eine mutierte Form des ChR2 (H134R) verwendet, die im Dunkeln nur max. 10 ms benötigt, ehe es wieder aktiviert werden kann (Nagel et al., 2005). Die Dauer könnte dennoch eine Ursache für die fehlende reliable Übertragung der höherfrequenten dCA3-Eingänge sein und damit gegen die Theorie vom dLS als Tiefpassfilter sprechen. Da jedoch in anderen Präparationen Axone auch mit Frequenzen von 30–50 Hz reliabel und schnell depolarisiert werden konnten, ist ein methodisches Artefakt dieser Art in der vorliegenden Arbeit eher unwahrscheinlich (Boyden et al., 2005).

4.2.2 Potenzieller Einfluss der GABA_A-Rezeptor-vermittelten Inhibition auf dCA3→dLS-Eingänge

Des Weiteren wurde geprüft, ob Netzwerkeigenschaften ursächlich für die mangelnde Weiterleitung von hochfrequenten Stimulationen sein könnten. Dazu wurde der Einfluss der GABA_A-vermittelten Inhibition auf die synaptische Übertragung untersucht. Der GABA_A-Rezeptor ist ein ionotroper Kanal, der bei Aktivierung zu einem Einstrom von Chlorid- und Bicarbonationen führt. Bei kurzzeitig erhöhter GABA-Konzentration kommt es daher in vielen Neuronen zu hyperpolarisierenden Potenzialen (inhibitorische postsynaptische Potenziale). In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, dass dieser Rezeptor sowohl bei phasischer als auch bei tonischer Inhibition eine Rolle einnimmt. Dabei entsteht die phasische Inhibition an synaptischen Rezeptoren, während die tonische Form an extrasynaptischen Rezeptoren generiert wird (Farrant und Nusser, 2005; Nusser und Mody, 2002). Die Inhibition ist für die Weiterleitung von Informationen sowie die Synchronisierung von neuronalen Netzwerken notwendig (Mann und Paulsen, 2007; Pouille und Scanziani, 2001). Die Neuronen des dLS erhalten zahlreiche GABAerge Eingänge, darunter vornehmlich Axon-Kollateralen von anderen dLS-Neuronen (Sheehan et al., 2004). GABAerge inhibitorische Ströme beeinflussen die Verarbeitung von hippokampalen Eingängen im dLS (Hasuo und Akasu, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurden die dCA3-Eingänge im dLS mit und ohne Blockierung der GABA_A-Rezeptoren durch Gabazine untersucht. Es zeigte sich, dass die GABA_A-Rezeptor-vermittelte Inhibition die Eingangs-Ausgangs-Transformation der dCA3-

Eingänge auf die dLS-Neuronen beeinflusst. Die Kinetik der einzelnen EPSPs blieb unbeeinflusst, was nahelegt, dass durch die Stimulation der CA3-Eingänge weder präsynaptische noch dendritische GABA_A-Rezeptoren aktiviert wurden. Hingegen war die Wahrscheinlichkeit der AP-Generierung nach der Gabazine-Gabe bei der 5-Puls-Stimulation im Theta-Bereich erheblich höher (s. Kap. 3.4.4), wenngleich die untersuchte Stichprobe mit n=6 doch relativ klein ist. Trotz Hemmung der GABA_A-Rezeptoren, konnten keine höherfrequenten Signale (20 und 30 Hz) übertragen werden. Ebenso fiel auf, dass durch Gabazine das Ruhemembranpotenzial signifikant depolarisierte (Abb. 13 F), was eine potenzielle tonische GABA_A-Rezeptor-vermittelte Inhibition vermuten lässt. Es bleibt zudem unklar, warum die Kinetik der einzelnen EPSPs unbeeinflusst blieb und welche Mechanismen eine Rolle bei der Übertragung einnehmen. Präsynaptische Phänomene könnten ebenso einen Einfluss besitzen. Da die GABA_B-Rezeptor-vermittelte Inhibition bei der Informationsverarbeitung von CA3-Eingängen im dLS involviert ist, wäre es denkbar, dass ein stärkerer Effekt oder ggf. die Übertragung von höherfrequenten Signalen im Gamma-Bereich durch die Blockierung des GABA_B-Rezeptors erreicht werden kann (Hasuo und Akasu, 2001). Auch konnten andere Faktoren, die den Filtermechanismus beeinflussen könnten, im Rahmen der Untersuchungen nicht identifiziert werden. Festzuhalten bleibt jedoch, dass das dLS als eine Art Frequenzfilter fungiert, der durch die tonische Inhibition mittels GABA_A-Rezeptoren einen zusätzlichen Abschwächungs- bzw. Verstärkungsmechanismus an seinem Ausgang besitzt.

4.3 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie belegen die Heterogenität der dLS-Neuronen bezüglich ihres physiologischen Potenzials zur Generierung von Bursts. Die größte Gruppe der untersuchten Zellen bildeten die HTB, sowohl unter den SST⁺- als auch unter den SST⁻-Neuronen. Folgeuntersuchungen sollten klären, inwieweit die SST-Expression eine funktionelle Relevanz für die Klassifizierung der Neuronen besitzt. Es stellen sich beispielsweise die Fragen, ob SST⁺-Neuronen einen anderen Input als SST⁻-Neuronen erhalten und ob Unterschiede zwischen diesen Gruppen lediglich während bestimmter Phasen der Ontogenese von Bedeutung sind. SST⁺- und SST⁻-Neuronen,

die nicht als HTB klassifiziert werden konnten, wurden aufgrund der geringen Anzahl nicht analysiert. Des Weiteren wurde der Schwerpunkt auf die Morphologie der HTB-Neuronen gelegt. Auch hier wäre eine weitere Analyse der RF- sowie der LTB-Zellen notwendig. Das dLS erhält massiven Input aus der dCA3-Region. Im Rahmen der Untersuchungen wurden ausschließlich die Eingänge der dCA3-Neuronen auf HTB-Neuronen analysiert, dabei erhalten auch RF und LTB Input von der dCA3-Region. Eine Analyse dieser Verbindungen könnte Informationen liefern, um die Struktur des dLS aufzuklären. Ebenso wäre eine getrennte Analyse der dCA3-Eingänge auf SST⁺-HTB-Neuronen wünschenswert. Der genaue Filtermechanismus der HTB-Neuronen auf dCA3-Eingänge bleibt unbekannt. Es sollte weiter untersucht werden, ob GABA_B-Rezeptor-vermittelte Inhibition für das Netzwerk der dLS-Neuronen relevant ist. Die dCA3→dLS→VTA-Verbindung spielt für das belohnungsassoziierte Lernen eine bedeutende Rolle. Laut einer Hypothese stimulieren exzitatorische glutamaterge dCA3-Pyramidenzellen die inhibitorischen GABAergen dLS-Neuronen, die wiederum die GABAergen VTA-Interneuronen und deren tonische Inhibition auf dopaminerge VTA-Zellen hemmen, was schließlich zur Dopamin-Ausschüttung führt (Luo et al., 2011). Es fehlen jedoch valide Daten zur dLS→VTA-Verbindung. Um die funktionelle Rolle dieses Netzwerkes zu verstehen, wären In-vivo-Messungen kombiniert mit Verhaltensversuchen von großer Bedeutung. Mit Hilfe eines solchen Studiendesigns könnten der Fluss der dCA3-Signale zum VTA verfolgt und durch eine spezifische Hemmung die Rolle der dLS-Neuronen bei der Verarbeitung der Informationen eruiert werden. Dabei ließe ich auch verifizieren, ob das dLS als eine Form von Tiefpassfilter fungiert. Zukünftig könnte dies eine Grundlage zur Forschung an medikamentösen Therapien bei bestimmten Lernschwächen am Menschen bilden.

5. Zusammenfassung

In der Verbindung zwischen der hippocampalen dCA3-Region mit dem dopaminergen Belohnungssystem des Area tegmentalis ventralis (VTA) spielt das dorsale laterale Septum (dLS) eine wichtige Rolle. Die dLS-Struktur und die dCA3-dLS-Verbindung sind bisher kaum erforscht. Zur Analyse des dLS und der CA3-Eingänge wurden elektrophysiologische („Whole-cell current-clamp“-Methode) und molekularbiologische Methoden (Markierung Somatostatin-positive-(SST⁺) Neuronen mittels Cre/loxP-Verfahren, optogenetische Stimulation der CA3-Eingänge) kombiniert. Insbesondere sollte die potenzielle Rolle der γ -Aminobuttersäure-(GABA)_A-rezeptorvermittelten Inhibition bei der Transmission von CA3-Impulsen auf dLS-Neuronen geklärt werden.

Die Experimente belegen, dass das dLS eine heterogene Gruppe von Neuronen enthält, die durch ein unterschiedliches Bursting-Vermögen gekennzeichnet sind. Der mit Abstand häufigste Phänotyp ist der High-Threshold-Burster (HTB). Das dLS enthält eine hohe Dichte an SST⁺-Neuronen. Sowohl SST⁺- als auch SST⁻-Neuronen sind mehrheitlich HTB. Die immense Anzahl an Afferenzen aus der CA3-Region klassifiziert das dLS als wichtiges hippocampales Zielgebiet. Synaptische Eingänge aus der CA3-Region im Theta-Frequenzbereich werden reliabel übertragen, höherfrequente Signale dagegen nur eingeschränkt. Diese Tiefpassfilter-Wirkung des dLS könnte synaptisch begründet sein, da dLS-Neuronen durchaus in der Lage sind, auf schnellere (20–50 Hz) überschwellige Membranpotenzialänderungen mit einem Aktionspotenzial zu reagieren. Ein methodisches Artefakt als Ursache scheint dagegen unwahrscheinlich. Die Befunde, dass Informationen vom Hippokampus primär im Theta-Bereich an das dLS übertragen werden und dass sich die Spontanfrequenzen der dLS-Neuronen ebenfalls im Theta-Bereich bewegen, unterstreicht die potenzielle Rolle dieses Gebietes in Lernprozessen. Dabei scheint auch eine tonische GABA_A-rezeptorvermittelte Inhibition involviert zu sein, obwohl die exakten Mechanismen noch weiter abgeklärt werden müssen. Zur Aufklärung der lokalen Informationsverarbeitung im dLS sind weitere Untersuchungen erforderlich. Die Vielzahl an modulatorischen Eingängen und die in der vorliegenden Arbeit identifizierte umfangreiche Dendritifizierung weisen auf komplexe Verbindungen innerhalb des Netzwerkes hin.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Subregionen des lateralen Septums (LS) (eigene Darstellung)	17
Abb. 2: Hippokampus-VTA-Verbindungen, links nach Floresco et al. (2001, 2003) und rechts nach Luo et al. (2011)	23
Abb. 3: Spektrum des Feuerverhaltens der Zellen im dLS	38
Abb. 4: Klassifizierung der Neuronen im dLS anhand des Bursting-Verhaltens	39
Abb. 5: Verhalten von HTB des dLS nach Anregung mit Stromimpulsen bis zu 50 Hz	43
Abb. 6: Nachweis von SST ⁺ -Neuronen im dLS	45
Abb. 7: SST ⁺ - und SST ⁻ -HTB im dLS	46
Abb. 8: Morphologie der HTB	48
Abb. 9: Dendritenmorphologie der HTB-Neuronen im dLS	49
Abb. 10: Input der CA3-Projektionsfasern zum dLS	51
Abb. 11: Abhängigkeit der Amplitude von EPSPs von der zur Stimulation verwendeten Laserleistung der CA3-Eingänge	52
Abb. 12: Übertragung synaptischer Eingänge von der CA3-Region auf das dLS	54
Abb. 13: Einfluss der GABA _A -Rezeptor-vermittelten Inhibition im CA3-dLS-Netzwerk auf HTB-Neuronen	58
Abb. 14: Einfluss der GABA _A -Rezeptor-vermittelten Inhibition auf Phänomene der Kurzzeitplastizität auf HTB-Neuronen im CA3-dLS-Netzwerk	59

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Charakteristika der Subregionen des lateralen Septums (LS)	19
Tab. 2: Passive und aktive Membraneigenschaften der LTB-, HTB- und RF-Neuronen im dLS	41
Tab. 3: Passive und aktive Membraneigenschaften der HTB-SST ⁺ -und SST ⁻ -Neuronen im dLS	47

8. Literaturverzeichnis

Abraham WC, Kairiss EW. Effects of the NMDA antagonist 2AP5 on complex spike discharge by hippocampal pyramidal cells. *Neurosci Lett* 1988; 89: 36–42

Aharon I, Etcoff N, Ariely D, Chabris CF, O'Connor E, Breiter HC. Beautiful faces have variable reward value: fMRI and behavioral evidence. *Neuron* 2001; 32: 537–551

Aiken SP, Kuenzi FM, Dale N. Xenopus embryonic spinal neurons recorded in situ with patch-clamp electrodes – conditional oscillators after all? *European Journal of Neuroscience* 2003; Vol. 18: 333–343

Alonso JR, Frotscher M. Organization of the septal region in the rat brain: a Golgi/EM study of lateral septal neurons. *J Comp Neurol* 1989; 286: 472–487

Amaral DG. Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Curr Opin Neurobiol* 1993; 3: 225–229

Amaral DG, Kurz J. An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* 1985; 240: 37–59

Amaral DG, Lavenex P. Hippocampal Neuroanatomy. in: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, Hrsg. *The hippocampus book*. New York: Oxford University Press, 2007: 37–117

Andy OJ, Stephan H. The septum in the human brain. *J Comp Neurol* 1968; 133: 383–409

Atkinson RC, Shiffrin RM. The control of short-term memory. *Sci Am* 1971; 225: 82–90

Baddeley A. Working Memory: Theories, Models, and Controversies. *Ann Rev Psychol* 2012; 63: 1–29

Barco A, Alarcon JM, Kandel ER. Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell* 2002; 108: 689–703

Barry C, Lever C, Hayman R, Hartley T, Burton S, O'Keefe J. The boundary vector cell model of place cell firing and spatial memory. *Rev Neurosci* 2006; 17: 71–97

Beier KT, Steinberg EE, DeLoach KE, Xie S, Miyamichi K, Schwarz L, et al. Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. *Cell* 2015; 162(3): 622–634

Beier KT, Gao XJ, Xie S, DeLoach KE, Malenka RC, Luo L. Topological Organization of Ventral Tegmental Area Connectivity Revealed by Viral-Genetic Dissection of Input-Output Relations. *Cell Reports* 2019; 26(1): 159–167

Beier KT. Modified viral-genetic mapping reveals local and global connectivity relationship of ventral tegmental area dopamine cells. *eLife*, 2022; 11: e76886

Berry KP, Nedivi E. Spine dynamics: Are they all the same? *Neuron* 2017; 96(1): 43–55

Berry SD, Thompson RF. Prediction of learning rate from the hippocampal electroencephalogram. *Science* 1978; 200: 1298–1300

Birbaumer N, Schmidt RF. Lernen und Gedächtnis. in: Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, Hrsg. *Physiologie des Menschen*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2010: 202–203

Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973; 232: 331–356

Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*. 2005; 8(9):1263-1268

Bragin A, Engel J, Wilson CL, Fried I, Buzsáki G. High-frequency oscillations in human brain. *Hippocampus* 1999; 9: 137–142

Buhry L, Azizi AH, Cheng S. Reactivation, replay, and preplay: how it might all fit together. *Neural Plast* 2011; 2011: 203462

Buzsáki G, Leung L, Vanderwolf C. Cellular bases of hippocampal EEG in the behaving rat. *Brain Res* 1983; 287: 139–171

Buzsáki G. Hippocampal sharp waves: their origin and significance. *Brain Res* 1986; 398: 242–252

Buzsáki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 2002; 33: 325–340

Buzsáki G. Theta rhythm of navigation: link between path integration and landmark navigation, episodic and semantic memory. *Hippocampus* 2005; 15: 827–840

Buzsáki G. Search Strategy in an Autoassociator. in: Buzsáki G, Hrsg. *Rhythms of the brain*. New York: Oxford University Press, 2006: 289–292

Buzsáki G. Hippocampal sharp wave-ripple: A cognitive biomarker for episodic memory and planning. *Hippocampus* 2015; 25: 1073–1188

Carus-Cadavieco M, Gorbati M, Ye L, Bender F, van der Veldt S, Kosse C, et al. Gamma oscillations organize top-down signalling to hypothalamus and enable food seeking. *Nature* 2017; 542(7640): 232–236

Cattaneo A, Maffei L, Morrone C. Two Firing Patterns in the Discharge of Complex Cells Encoding Different Attributes of the Visual Stimulus. *Exp BrainRes* 1981; 43: 115-118

Chen S, Su H, Yue C, Remy S, Royeck M, Sochivko D, Opitz T, Beck H, Yaaari Y. An increase in persistent sodium current contributes to intrinsic neuronal bursting after status epilepticus. *J Neurophysiol* 2011; 105: 117–129

Cheng S, Frank LM. New experiences enhance coordinated neural activity in the hippocampus. *Neuron* 2008; 57: 303–313

Dannenberg H, Pabst M, Braganza O, Schoch S, Niediek J, Bayraktar M, Mormann F, Beck H. Synergy of direct and indirect cholinergic septo-hippocampal pathways coordinates firing in hippocampal networks. *J Neurosci* 2015; 35: 8394–8410

Deister CA, Teagarden MA, Wilson CJ, Paladini CA. An intrinsic neuronal oscillator underlies dopaminergic neuron bursting. *J Neurosci* 2009; 29: 15888–1589

Di Ciano P, Everitt BJ. Conditioned reinforcing properties of stimuli paired with self-administered cocaine, heroin or sucrose: implications for the persistence of addictive behaviour. *Neuropharmacology* 2004; 47 Suppl 1: 202–213

Dickson SL, Egecioglu E, Landgren S, Skibicka KP, Engel JA, Jerlhag E. The role of the central ghrelin system in reward from food and chemical drugs. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 340: 80–87

Diekelmann S, Born J. The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 114–126

Duncan K, Ketz N, Inati SJ, Davachi L. Evidence for area CA1 as a match/mismatch detector: A high-resolution fMRI study of the human hippocampus. *Hippocampus* 2011; 22(3): 389–398

Dunn AR, Neuner SM, Ding S, Hope KA, O'Connell KMS, Kaczorowski CC. Cell-Type-Specific Changes in Intrinsic Excitability in the Subiculum following Learning and Exposure to Novel Environmental Contexts. *eNeuro* 2019; 5: ENEURO.0484–18.2018

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

Erk S, Spitzer M, Wunderlich AP, Galley L, Walter H. Cultural objects modulate reward circuitry. *Neuroreport* 2002; 13: 2499–2503

Fanselow EE, Richardson KA, Connors BW. Selective, state-dependent activation of somatostatin-expressing inhibitory interneurons in mouse neocortex. *J Neurophysiol* 2008; 100: 2640–2652

Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 215–229

Fishell G, Rudy B. Mechanisms of inhibition within the telencephalon: "where the wild things are". *Ann Rev Neurosci* 2011; 34: 535–567

Floresco SB, Todd CL, Grace AA. Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurosci* 2001; 21: 4915–4922

Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA. Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* 2003; 6: 968–973

Forloni G, Hohmann C, Coyle JT. Developmental expression of somatostatin in mouse brain. I. Immunocytochemical studies. *Brain Res Dev Brain Res* 1990; 53: 6–25

Gallagher JP, Zheng F, Hasuo H, Shinnick-Gallagher P. Activities of neurons within the rat dorsolateral septal nucleus (DLSN). *Prog Neurobiol* 1995; 45: 373–395

Gibson JR, Beierlein M, Connors, BW. Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex. *Nature* 1999; 402: 75–79

Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 1996; 379: 606-612

Gonzalo-Ruiz A, Morte L, Flecha JM, Sanz JM. Neurotransmitter characteristics of neurons projecting to the supramammillary nucleus of the rat. *Anat Embryol* 1999; 200: 377–392

Goyal A, Miller J, Qasim SE, Watrous AJ, Zhang H, Stein JM, et al. Functionally distinct high and low theta oscillations in the human hippocampus. *Nature Communications* 2020; 1–10

Gruver KM, Watt AJ. Optimizing Optogenetic Activation of Purkinje Cell Axons to Investigate the Purkinje Cell – DCN Synapse. *Fnsyn-11-00031* 2019; Tex: 1–8

Gu N, Vervaeke K, Hu H, Storm JF. Kv7/KCNQ/M and HCN/h, but not KCa2/SK channels, contribute to the somatic medium after-hyperpolarization and excitability control in CA1 hippocampal pyramidal cells. *J Physiol* 2005; 566: 689–715

Hafting T, Fyhn M, Molden S, Moser MB, Moser EI. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 2005; 436: 801–806

Hasselmo ME, Schnell E. Laminar Selectivity of the Cholinergic Suppression of Synaptic Transmission in Rat Hippocampal Region CA 1: Computational Modeling and Brain Slice Physiology. *The Journal of Neuroscience* 1994; 14(6): 3898-3914

Hasselmo ME, Schnell E, Barkai E. Dynamics of Learning and Recall at Excitatory Recurrent Synapses and Cholinergic Modulation in Rat Hippocampal Region CA3. *The Journal of Neuroscience* 1995; 15(7): 5249-5262

Hasuo H, Akasu T. Activation of inhibitory pathways suppresses the induction of long-term potentiation in neurons of the rat lateral septal nucleus. *Neuroscience* 2001; 105: 343–352

Hu H, Cavendish JZ, Agmon A. Not all that glitters is gold: off-target recombination in the somatostatin-IRES-Cre mouse line labels a subset of fast-spiking interneurons. *Frontiers in Neural Circuits* 2013; 7: 195

Huerta PT, Lisman JE. Bidirectional synaptic plasticity induced by a single burst during cholinergic theta oscillation in CA1 in vitro. *Neuron* 1995; 15: 1053–1063

Hurley SW, Arseth HA, Johnson AK. Orexin neurons couple neural systems mediating fluid balance with motivation-related circuits. *Behav Neurosci* 2018; 132: 284–292

Jensen MS, Azouz R, Yaari Y. Variant firing patterns in rat hippocampal pyramidal cells modulated by extracellular potassium. *J Neurophysiol* 1994; 71: 831–839

Ji H, Shepard PD. SK Ca²⁺-activated K⁺ channel ligands alter the firing pattern of dopamine-containing neurons in vivo. *Neuroscience* 2006; 140: 623–633

Jonides J, Lewis RL, Nee DE, Lustig CA, Berman MG, Moore KS. The Mind and Brain of Short-Term Memory. *Annu Rev Psychol* 2008; 59: 193–224

Jouvet M. Biogenic amines and the states of sleep. *Science* 1969; 163: 32–41

Kempadoo KA, Moshrov EV, Choi SJ, Sulzer D, Kandel E. Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. *Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory.* *Nature* 2016; 537: 357–362

Knierim JJ, Zhang K. Attractor dynamics of spatially correlated neural activity in the limbic system. *Ann Rev Neurosci* 2012; 35: 267–285

Knowland D, Lim BK. Circuit-based frameworks of depressive behaviors: The role of reward circuitry and beyond. *Pharmacol Biochem Behav* 2018; 174: 42–52

Kock CPJ, Pie J, Pieneman AW, Mease RA, Bast A, Guest JM, et al. High-frequency burst spiking in layer 5 thick-tufted pyramids of rat primary somatosensory cortex encodes exploratory touch. *Communications Biology* 2021; 1–14

Larkum ME, Zhu JJ, Sakmann B. A new cellular mechanism for coupling inputs arriving at different cortical layers. *Nature* 1999; 398: 338-342

Laurier LG, O`Dowd BF, George SR. Heterogeneous tissue-specific transcription of dopamine receptor subtype messenger RNA in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 25: 344–350

Lee I, Griffin AL, Zilli EA, Eichenbaum H, Hasselmo ME. Gradual translocation of spatial correlates of neuronal firing in the hippocampus toward prospective reward locations. *Neuron* 2006; 51: 639–650

Lega BC, Jacobs J, Kahana M. Human hippocampal theta oscillations and the formation of episodic memories. *Hippocampus* 2012; 22: 748–761

Legault M, Wise RA. Novelty-evoked elevations of nucleus accumbens dopamine: dependence on impulse flow from the ventral subiculum and glutamatergic neurotransmission in the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 819–828

Li S, Cullen WK, Anwyl R, Rowan MJ. Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nature Neurosci* 2003; 6: 526–531

Li WC, Soffe SR, Roberts A. A Direct Comparison of Whole Cell Patch and Sharp Electrodes by Simultaneous Recording From Single Spinal Neurons in Frog Tadpoles. *J Neurophysiol* 2004; 92: 380–386

Lin W, McKinney K, Liu L, Lakhani S, Jennes L. Distribution of vesicular glutamate transporter-2 messenger ribonucleic Acid and protein in the septum-hypothalamus of the rat. *Endocrinology* 2003; 144: 662–670

Lisman JE. Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci* 1997; 20: 38–43

Lisman JE, Grace AA. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 2005; 46: 703–713

Loprinzi PD, Edwards MK. Exercise and Implicit Memory: A Brief Systematic Review. *Psychol Rep* 2018; 121: 1072–1085

Lorente de Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Neurol* 1934; 46: 113–177

Lu L, Grimm J W, Shaham Y, Hope BT. Molecular neuroadaptations in the accumbens and ventral tegmental area during the first 90 days of forced abstinence from cocaine self-administration in rats. *J Neurochem* 2003; 85: 1604–1613

Luo AH, Tahsili-Fahadan P, Wise RA, Lupica CR, Aston-Jones G. Linking Context with Reward: A Functional Circuit from Hippocampal CA3 to Ventral Tegmental Area. *Science* 2011; 333: 353–357

Malinow R, Otmakhov N, Blum KI, Lisman J. Visualizing hippocampal synaptic function by optical detection of Ca²⁺ entry through the N-methyl-D-aspartate channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8170–8174

Mann EO, Paulsen O. Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Neurosci* 2007; 30: 343–349

Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 793–807

Masukawa LM, Prince DA. Synaptic control of excitability in isolated dendrites of hippocampal neurons. *J Neurosci* 1984; 4: 217–227

Matthews EA, Linardakis JM, Disterhoft JF. The fast and slow afterhyperpolarizations are differentially modulated in hippocampal neurons by aging and learning. *J Neurosci* 2009; 29(15): 4750-5

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

McNamara CG, Tejero-Cantero Á, Trouche S, Campo-Urriza N, Dupret D. Dopaminergic neurons promote hippocampal reactivation and spatial memory persistence. *Nat Neurosci* 2014; 17: 1658–1660

Menegas W, Bergan JF, Ogawa SK, Isogai Y, Venkataraju KU, Osten P, Uchida N, Watabe-Uchida M. Dopamine neurons projecting to the posterior striatum form an anatomically distinct subclass. *eLife* 2015; 4: e10032

Metz AE, Jarsky T, Martina M, Spruston N. R-Type Calcium Channels Contribute to Afterdepolarization and Bursting in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *J Neurosci* 2005; 25: 5763–5773

Mininni CJ, Caiafa CF, Zanutto BS, Tseng KY, Lew SE. Putative dopamine neurons in the ventral tegmental area enhance information coding in the prefrontal cortex. *Sci Rep* 2018; 8: 11740

Müller-Komorowska D, Opitz T, Elzoheiry S, Schweizer M, Giovannetti EA, Beck H. Nonspecific expression in limited excitatory cell populations in interneuron-targeting Cre-driver lines can have large function effects. *Front. Neural Circuits* 2020; 14: 16

Nagaeva E, Zubarev I, Bengtsson Gonzales C, Forss M, Nikouei K, de Miguel E, Elsilá L, Linden AM, Hjerling-Leffler J, Augustine GJ, Korpi ER. Heterogeneous somatostatin-expressing neuron population in mouse ventral tegmental area. *eLife* 2020; 9: e59328

Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E. Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 13940–13945

Nagel G, Brauner M, Liewald JF, Adeishvili N, Bamberg E, Gottschalk A. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol* 2005; 15: 2279–2284.

Nusser Z, Mody I. Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol* 2002; 87: 2624–2628

O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 1971; 34: 171–175

O'Keefe J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol* 1976; 51: 78–109

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

Oliva A, Fernández-Ruiz A, Buzsáki G, Berényi A. Role of Hippocampal CA2 Region in Triggering Sharp-Wave Ripples. *Neuron* 2016; 91: 1342–1355

Oswald AMM, Chacron MJ, Doiron B, Bastian J, Maler L. Parallel Processing of Sensory Input by Bursts and Isolated Spikes. *The Journal of Neuroscience* 2004; 24(18): 4351–4362

Otto T, Eichenbaum H, Wiener SI, Wible CG. Learning-related patterns of CA1 spike trains parallel stimulation parameters optimal for inducing hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus* 1991; 1: 181–192

Patestas MA, Gartner LP. A textbook of neuroanatomy. Oxford: Blackwell Publishing, 2011: 350–351

Pavlov PI. Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. *Ann Neurosci* 1927 (2010); 17: 136–141

Pedemonte M, Barrenechea C, Nunez A, Gambini JP, Garcia-Austt E. Membrane and circuit properties of lateral septum neurons: relationships with hippocampal rhythms. *Brain Res* 1998; 800: 145–153

Petsche H, Stumpf C, Gogolak G. The significance of the rabbit's septum as a relay station between the midbrain and the hippocampus. I. The control of hippocampus arousal activity by the septum cells. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1962; 14: 202–211

Phelan KD, Hasuo H, Twery MJ, Gallagher JP. Projection neurons in the rat dorsolateral septal nucleus possess recurrent axon collaterals. *Neurosci Lett* 1989; 97: 259–265

Pickenhain L, Klingberg F. Hippocampal slow wave activity as a correlate of basic behavioral mechanisms in the rat. *Prog Brain Res* 1967; 27: 218–227

Pouille F, Scanziani M. Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 2001; 293: 1159–1163

Ranck JB. Studies on single neurons in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rats. I. Behavioral correlates and firing repertoires. *Exp Neurol* 1973; 41: 461–531

Rescorla RA, Wagner AR. A theory of Pavlovian conditioning: variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement. in Black AH, Prokasy WF, Hrsg. *Classical conditioning II: current research and theory*. New York: Appleton-Century-Crofts, 1972: 64-99

Reubi JC, Maurer R. Autoradiographic mapping of somatostatin receptors in the rat central nervous system and pituitary. *Neuroscience* 1985: 1183-1193

Risold PY, Swanson LW. Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. *Brain Res Brain Res Rev* 1997a; 24: 91–113

Risold PY, Swanson LW. Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res Rev* 1997b; 24: 115–195

Rolls ET. A quantitative theory of the functions of the hippocampal CA3 network in memory. *Front Cell Neurosci* 2013; 7: 98.

Sanabria ER, Su H, Yaari Y. Initiation of network bursts by Ca²⁺-dependent intrinsic bursting in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol* 2001; 532: 205–216

Sartor GC, Aston-Jones GS. A septal-hypothalamic pathway drives orexin neurons, which is necessary for conditioned cocaine preference. *J Neurosci* 2012; 32: 4623–4631

Sarwar M. The septum pellucidum: normal and abnormal. *AJNR. Am J Neuroradiol* 1989; 10: 989–1005

Schacter DL, Wagner AD. Learning and Memory. in: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, Hrsg. *Principles Of Neural Science*. New York: McGraw-Hill Companies, 2013: 1441–1460

Schultz W. Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 191–197

Schultz W. Dopamine signals for reward value and risk: basic and recent data. *Behav Brain Funct* 2010; 6: 24–29

Schultz W. Dopamine reward prediction error coding. *Dialogues Clin Neurosci* 2016; 18 (1): 23-32

Schwindt P, Crill W. Mechanisms underlying burst and regular spiking evoked by dendritic depolarization in layer 5 cortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 1999; 81: 1341–1354

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

Sheehan TP, Chambers RA, Russell DS. Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain Res Brain Res Rev* 2004; 46: 71–117

Sherman SM. Tonic and burst firing: dual modes of thalamocortical relay. *TRENDS in Neurosciences* 2001; Vol.24 No.2: 122-126

Simonnet J, Brecht M. Burst firing and spatial coding in subicular principal cells. *J Neurosci* 2019; 39: 3651–3662

Singer AC, Frank LM. Rewarded outcomes enhance reactivation of experience in the hippocampus. *Neuron* 2009; 64: 910–921

Stanfield BB, Cowan WM. The morphology of the hippocampus and dentate gyrus in normal and reeler mice. *J Comp Neurol* 1979; 185: 393–422

Stevens CF, Wang Y. Facilitation and depression at single central synapses. *Neuron* 1995; 14: 795–802

Su H, Sochivko D, Becker A, Chen J, Jiang Y, Yaari Y, Beck, H. Upregulation of a T-type Ca^{2+} channel causes a long-lasting modification of neuronal firing mode after status epilepticus. *J Neurosci* 2002; 22: 3645–3655

Swanson LW, Mogenson GJ, Gerfen CR, Robinson P. Evidence for a Projection from the lateral Preoptic Area and Substantia Innominata to the 'Mesencephalic locomotor region in the rat. *Brain Research* 1984; 295: 161-178

Swanson LW, Mogenson GJ, Simerly RB, Wu M. Anatomical and electrophysiological evidence for a projection from the medial preoptic area to the 'mesencephalic and subthalamic locomotor regions in the rat. *Brain Research* 1987; 405: 108-122

Swanson LW, Sawchenko PE, Cowan WM. Evidence for collateral projections by neurons in Ammon's horn, the dentate gyrus, and the subiculum: a multiple retrograde labeling study in the rat. *J Neurosci* 1981; 1: 548–559

Swanson LW, Wyss JM, Cowan, WM. An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J Comp Neurol* 1978; 181: 681–715

Takeuchi T, Duzskiewicz AJ, Sonneborn A, Spooner PA, Yamasaki M, Watanabe M et al. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature* 2016;, 537(7620): 357–362

Taube JS. Place cells recorded in the parasubiculum of freely moving rats. *Hippocampus* 1995; 5: 569–583

Urban-Ciecko J, Fanselow EE, Barth AL. Neocortical somatostatin neurons reversibly silence excitatory transmission via GABA_B receptors. *Curr Biol* 2015; 25: 722–731

Vanderwolf CH. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1969; 26: 407–418

Vega-Quiroga I, Yarur HE, Gysling, K. Lateral septum stimulation disinhibits dopaminergic neurons in the antero-ventral region of the ventral tegmental area: Role of GABA-A alpha 1 receptors. *Neuropharmacology* 2017; 1–32

Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J, Markram H. Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* 2004; 561: 65–90

Wang Z, McCormick DA. Control of firing mode of corticotectal and corticopontine layer V burst-generating neurons by norepinephrine, acetylcholine, and 1S,3R-ACPD. *J Neurosci* 1993; 13: 2199–2216

Weber B, Aholt A, Neuhaus C, Trautner P, Elger CE, Teichert T. Neural evidence for Reference-dependence in real-market-transactions. *Neuroimage* 2007; 35: 441–447

White G, Lovinger DM, Weight FF. Transient low-threshold Ca²⁺ current triggers burst firing through an afterdepolarizing potential in an adult mammalian neuron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 6802–6806

Wong AYC, Graham BP, Billups B, Forsythe ID. Distinguishing between presynaptic and postsynaptic mechanisms of short-term depression during action potential trains. *J Neurosci* 2003; 23: 4868–4877

Woolf NJ. Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol* 1991; 37: 475–524

Wu LG, Saggau P. Adenosine inhibits evoked synaptic transmission primarily by reducing presynaptic calcium influx in area CA1 of hippocampus. *Neuron* 1994; 12: 1139–1148

Xu J, He L, Wu LG. Role of Ca²⁺ channels in short-term synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2007; 17: 352–359

Xu NL, Harnett MT, Williams SR, Huber D, O'Connor DH, Svoboda K. et al. Nonlinear dendritic integration of sensory and motor input during an active sensing task. *Nature* 2012; 492: 247–251

Yaari Y, Yue C, Su H. Recruitment of apical dendritic T-type Ca²⁺ channels by backpropagating spikes underlies de novo intrinsic bursting in hippocampal epileptogenesis. *J Physiol* 2007; 580: 435–450

Yetnikoff L, Lavezzi HN, Reichard RA, Zahm DS. Review and update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience* 2014; 282(C): 23–48

Yu JY, Frank LM. Hippocampal-cortical interaction in decision making. *Neurobiology of Learning and Memory* 2014; 1–8

Zucker RS, Regehr WG. Short-Term Synaptic Plasticity. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 355–405

Zweifel LS, Parker JG, Lobb CJ, Rainwater A, Wall VZ, Fadok JP, Darvas M, Kim MJ, Mizumori SJY, Paladini CA, Phillips PEM, Palmiter RD. Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 7281–7288