

# **Genetisches Tracing septohippocampaler Projektionen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Jurij Ilija Erwin Ernstbernard Rosen

aus Bonn

2015

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Beck
2. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Becker

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.02.2015

Aus der Klinik für Epileptologie  
Direktor: Prof. Dr. med. C. E. Elger

*meiner Familie*



## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>1.1 Die Hippocampusformation</b>	<b>9</b>
1.1.1 Anatomie	9
1.1.2 Hippocampale Neurone	10
1.1.3 Thetaaktivität	11
<b>1.2 Der mediale Septum-diagonale Band von Broca Komplex</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Projektionen der Neuronenpopulationen des MSDB</b>	<b>13</b>
<b>1.4 Rückprojektionen des Hippocampus in das MSDB</b>	<b>16</b>
<b>1.5 Funktionelle Bedeutung des septohippocampalen Systems</b>	<b>16</b>
1.5.1 Modulation der hippocampalen Thetaaktivität	17
1.5.2 Beeinflussung der synaptischen Transmission	19
<b>1.6 Ziele des Projektes</b>	<b>20</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Transgene Mauslinien</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Der virale DNA-Vektor</b>	<b>21</b>
2.2.1 Herstellung des Virus	22
<b>2.3 Virusinjektion und zelltypspezifische Expression von ChR2-eYFP</b>	<b>22</b>
2.3.1 Virusinjektion	22
2.3.2 Zelltypspezifische Expression der Proteine ChR2-eYFP	23
<b>2.4 Perfusion der Mäuse</b>	<b>25</b>
<b>2.5 Gewinnung der Hirnschnitte</b>	<b>25</b>
<b>2.6 Immunhistochemische Färbung</b>	<b>25</b>
2.6.1 Prinzip der Färbung	25
2.6.2 Verwendete Marker	26
2.6.3 Auswahl der Präparate	26
2.6.4 Reagenzien	27
2.6.5 Färbeprotokolle	27
<b>2.7 Mikroskopie</b>	<b>29</b>
2.7.1 Prinzip der konfokalen Mikroskopie	29

2.7.2 Durchführung der konfokalen Mikroskopie	29
2.7.3 Nicht-konfokale Fluoreszenzmikroskopie	31
<b>2.8 Verarbeitung und Auswertung der konfokalen Aufnahmen</b>	<b>32</b>
2.8.1 ChR2-eYFP Expression in transduzierten cholinergen, bzw. GABAergen Projektionsneuronen des MSDB	32
2.8.2 Areal- und laminaspezifische Verteilung septaler Projektionsfasern im Hippocampus	32
2.8.3 Putative Kontaktstellen zwischen hippocampalen GABAergen Interneuronen und GABAergen Projektionsfasern aus dem MSDB	33
<b>2.9 Statistik</b>	<b>35</b>
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>36</b>
<b>3.1 ChR2-eYFP Proteinexpression in transduzierten cholinergen, bzw. GABAergen Projektionsneuronen des MSDB</b>	<b>36</b>
3.1.1 Diffusion des Virus	36
3.1.2 Zelltypspezifität und Effektivität der viralen Transduktion	40
<b>3.2 Areal- und laminaspezifische Verteilung septaler Projektionsfasern im Hippocampus</b>	<b>42</b>
3.2.1 Verteilung cholinergischer Afferenzen im dorsalen Hippocampus	44
3.2.2 Verteilung cholinergischer Afferenzen im ventralen Hippocampus	46
3.2.3 Verteilung GABAerger Afferenzen im dorsalen Hippocampus	48
3.2.4 Verteilung GABAerger Afferenzen im ventralen Hippocampus	50
<b>3.3 Putative Kontaktstellen zwischen hippocampalen GABAergen Interneuronen und GABAergen Afferenzen aus dem MSDB</b>	<b>52</b>
3.3.1 Größe der Zellanschnitte und der Zelloberflächen detektierter hippocampaler Interneurone	56
3.3.2 Putative Kontaktstellen zwischen GABAergen Interneuronen und GABAergen Afferenzen	57
<b>4. Diskussion</b>	<b>59</b>
<b>4.1 ChR2-eYFP Proteinexpression in transduzierten cholinergen, bzw. GABAergen Projektionsneuronen des MSDB</b>	<b>59</b>
4.1.1 Methodische Aspekte	59
4.1.2 Ergebnisse	59

<b>4.2 Areal- und laminaspezifische Verteilung septaler Projektionsfasern im Hippocampus</b>	<b>61</b>
4.2.1 Methodische Aspekte	61
4.2.2 Ergebnisse für cholinerge Projektionen	62
4.2.3 Ergebnisse für GABAerge Projektionen	64
<b>4.3 Putative Kontaktstellen zwischen hippocampalen GABAergen Interneuronen und GABAergen Afferenzen aus dem MSDB</b>	<b>66</b>
4.3.1 Methodische Aspekte	66
4.3.2 Ergebnisse	67
<b>4.4 Ausblick</b>	<b>71</b>
<b>4.5 Klinische Relevanz</b>	<b>72</b>
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>6. Anhang</b>	<b>74</b>
6.1 Plasmid zur Herstellung des rAAV DIO Chr2-eYFP	74
6.2 Arealeinteilung des Hippocampus	75
6.3 Auswertroutinen	76
<b>7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>95</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>104</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
CA	Cornu Ammonis, Ammonshorn
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
ChR2	Channelrhodopsin-2
EC	Entorhinaler Cortex
ENS	Eselnormalserum
eYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
GABA	$\gamma$ -Aminobutyric acid, $\gamma$ -Aminobuttersäure
i. p.	Intraperitoneal
GD	Gyrus dentatus
mAChR	Muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MSDB	Mediales Septum-Diagonales Band von Broca Komplex
nAChR	Nikotinischer Acetylcholinrezeptor
LFP	Lokales Feldpotential
LTP	Long Term Potentiation, Langzeit-Potenzierung
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PV	Parvalbumin
rAAV	Recombinantes adeno-assoziiertes Virus
REM	Rapid Eye Movement
SLM	Stratum lacunosum-moleculare
Str. gr.	Stratum granulosum
Str. mol.	Stratum moleculare
Str. or.	Stratum oriens
Str. pyr.	Stratum pyramidale
Str. rad.	Stratum radiatum
Sub.	Subiculum
Syn	Synapsin

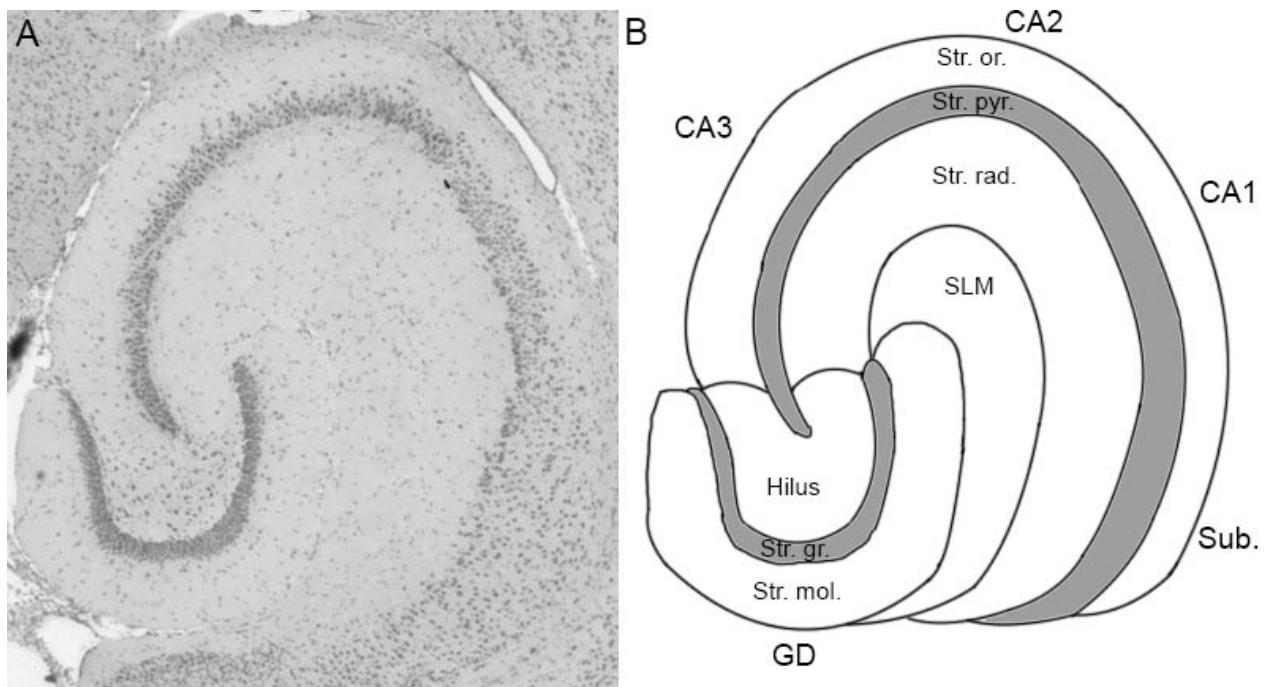


# 1. Einleitung

## 1.1 Die Hippocampusformation

Der Hippocampus ist Teil des limbischen Systems und hat eine zentrale funktionelle Bedeutung bei der Gedächtnisbildung, dem Abruf von Gedächtnisinhalten und der räumlichen Orientierung. Wegweisend in der Erforschung der Funktionen des Hippocampus war das Schicksal des Patienten Henry Molaison, bekannt als „H. M.“ Dieser litt unter ätiologisch unklaren Temporallappenanfällen, weshalb bei ihm eine operative, beidseitige Hippocampectomie durchgeführt wurde (Scoville und Milner, 1957). Während sich die Klinik seiner fokalen Anfälle verbesserte, bestand seit der Operation zeitlebens eine anterograde Amnesie für explizite Gedächtnisinhalte, sowie eine partielle retrograde Gedächtniseinschränkung. Multiple nachfolgende Untersuchungen des Patienten bis zu seinem Tod ließen darauf schließen, dass der Hippocampus wesentlich an kognitiven Prozessen beteiligt sein muss. Neben der klinischen Forschung wurde der Hippocampus zudem seit Ende des 19. Jahrhunderts intensiv in tierischen Präparaten untersucht.

1.1.1 Anatomie. Die Hippocampusformation setzt sich aus dem Hippocampus proper, dem Gyrus dentatus (GD), dem Subiculum, dem Pre-, bzw. Parasubiculum und dem entorhinalen Cortex zusammen (Amaral und Lavenex, 2007). Dabei umfasst der Hippocampus proper (oder auch Ammonshorn, Cornu Ammonis, CA) die drei Areale CA1, CA2, und CA3 (Abb. 1). Innerhalb dieser 3 Areale können weiterhin von der Oberfläche in Richtung der tiefen Schichten 4 verschiedene Laminae abgegrenzt werden. Dazu zählen das Stratum lacunosum-moleculare (SLM), das Stratum radiatum (Str. rad.), das Stratum pyramidale (Str. pyr.) und das Stratum oriens (Str. or.). Der Gyrus dentatus (GD), welcher in Folge mit dem Ammonshorn unter dem Begriff „Hippocampus“ subsumiert wird, umfasst 3 Laminae, das Stratum moleculare (Str. mol.), das Stratum granulosum (Str. gr.) und den Hilus.



**Abb. 1: Anatomie des Hippocampus.** **A** Dargestellt ist ein horizontaler Schnitt durch den Hippocampus einer Maus in einer Hämatoxylin-Eosin Färbung. Erkennbar ist eine Vielzahl von Zellen, insbesondere im Str. pyr. des CA und im Str. gr. des GD. **B** Vereinfachte schematische Darstellung der hippocampalen Areal- und Laminaeinteilung. CA, Cornu ammonis; GD, Gyrus dentatus; Sub., Subiculum; Str. or., Stratum oriens; Str. pyr., Stratum pyramidale; Str. rad., Stratum radiatum; SLM, Stratum lacunosum-moleculare; Str. gr., Stratum granulosum; Str. mol., Stratum moleculare.

1.1.2 Hippocampale Neurone. Das hippocampale Neuronennetzwerk setzt sich aus einer Vielzahl unterschiedlicher Nervenzelltypen zusammen, welche über multiple Verknüpfungen miteinander verbunden sind. Dabei stellen die Prinzipalzellen, i. e. die Pyramidenzellen im Stratum pyramidale und die Körnerzellen im Stratum granulosum des Gyrus dentatus, die größte Neuronengruppe dar. Diese Neurone setzen charakteristischerweise den erregenden Neurotransmitter Glutamat frei.

Daneben existieren im Hippocampus eine heterogene Gruppe inhibitorischer Interneurone, welche den Transmitter Gamma-Aminobuttersäure (Gamma-Aminobutyric acid, GABA) freisetzen. Hierbei kontrolliert auf zellulärer Ebene diese Minderheit GABAerger Interneurone die erregende Signalverarbeitung und das Entladungsverhalten der glutamatergen Prinzipalzellen. Auch auf Netzwerkebene ist die Rekrutierung der Interneurone für die Generierung von synchroner neuronaler Aktivität, wie der Thetaaktivität, entscheidend (Buzsáki, 2002; Freund und Antal, 1988; Tóth et al.,

1997). Dabei wurden im CA1 Areal über 20 verschiedene Interneurontypen identifiziert, welche sich in der Kontaktierung verschiedener subzellulärer Domänen der Prinzipalzellen, dem Expressionsprofil von Markerproteinen und der elektrophysiologischen Aktivität unterscheiden (Klausberger und Somogyi, 2008). Durch diese individuellen Eigenschaften haben die Interneurone einen spezifischen Beitrag zur Aktivität des hippocampalen Neuronennetzwerks und damit zu Oszillationen des extrazellulären, lokalen Feldpotentials (LFP, Klausberger und Somogyi, 2008). Eine orientierende Kategorisierung der Interneurone ist hierbei durch selektive Färbung der spezifisch exprimierten Markerproteine möglich (Klausberger und Somogyi, 2008). Bei diesen Proteinen handelt es sich u.a. um Somatostatin, Cholecystokinin, Neuropeptid Y oder um calciumbindende Proteine wie Parvalbumin (PV), Calbindin, bzw. Calretinin. Beispielsweise können durch spezifische Markierung von Parvalbumin die perisomatisch inhibierenden Korb-, axo-axonischen- und bilaminären Zellen, sowie die apical dendritisch inhibierenden oriens-lacunosum-moleculare Zellen identifiziert werden (Klausberger und Somogyi, 2008). Dabei bedingen Unterschiede in der jeweiligen Cytoarchitektur dieser PV<sup>+</sup> Interneurone unterschiedliche Funktionen innerhalb des hippocampalen Neuronennetzwerks. Durch Mehrfachfärbung für mehrere Interneuronmarker, und evtl. elektrophysiologische Charakterisierung mit nachfolgender Rekonstruktion des Axonplexus, können die Interneurone noch spezifischer charakterisiert werden und somit auf ihre funktionelle Bedeutung bei der Regulierung der Aktivität nachgeschalteter Neurone geschlossen werden.

1.1.3 Thetaaktivität. Theta Oszillationen stellen prominente Schwingungen des hippocampalen LFP mit einer Frequenz von 4-10 Hz dar und sind Ausdruck der koordinierten elektrischen Aktivität hippocampaler Neuronenpopulationen (Buzsáki, 2002; Lubenov und Siapas, 2009). Dabei entstehen Theta Oszillationen durch das Zusammenwirken von somatisch inhibierenden und dendritisch erregenden Stromgeneratoren an hippocampalen Prinzipalzellen, wodurch ein extrazellulärer elektrischer Dipol induziert wird (Buzsáki, 2002). Dabei werden die somatischen inhibitorischen postsynaptischen Potentiale (IPSPs) durch Afferenzen des medialen Septum-diagonalen Band von Broca Komplex, vermittelt über hippocampale Interneurone, an den Pyramidenzellen generiert

(Buzsáki, 2002; Lee et al., 1994). Andererseits werden die exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSPs) an den Dendriten der Pyramidenzellen durch erregende Eingänge des entorhinalen Cortex im Stratum lacunosum-moleculare induziert (Buzsáki, 2002; Lee et al., 1994). Funktionell stellt die Thetaaktivität einen hippocampalen „on-line Status“ dar, welcher für die zeitliche Codierung der Aktivität von Neuronengruppen für bestimmte kognitive Zustände essentiell ist (Buzsáki, 2002). Dazu gehören rapid eye movement (REM)-Schlafphasen und aktive Bewegungsvorgänge, wie die Exploration der Umgebung (Buzsáki, 2002). Darüber hinaus hat diese neuronale Aktivitätsform eine wesentliche Bedeutung bei der Modulation synaptischer Plastizität und damit bei Lern- und Gedächtnisvorgängen (Hyman et al., 2003; Winson, 1978). Hierbei konnte in Studien gezeigt werden, dass die Thetaaktivität einen essentiellen Beitrag zur Separation abgerufener Erinnerungen von neuen, noch zu speichernden Gedächtnisinhalten hat (Douchamps et al., 2013). Studien, welche durch selektive Unterbrechung der hippocampalen Thetaaktivität eine funktionelle Läsion des Hippocampus herbeiführten, bestätigen die zentrale Bedeutung des Theta Rhythmus für die funktionelle Integrität des Hippocampus (Brandon et al., 2014; Winson, 1978).

## **1.2 Der mediale Septum-diagonale Band von Broca Komplex**

Im basalen Vorderhirn befinden sich neben anderen anatomisch definierten Strukturen das mediale Septum und das diagonale Band von Broca. Innerhalb dieser beiden Bereiche befinden sich verschiedene Neuronenpopulationen, welche eine funktionelle Einheit bilden und daher als der mediale Septum-diagonale Band von Broca (MSDB) Komplex zusammenfasst werden. Diese Neurone können dabei nach dem freigesetzten Neurotransmitter in drei wesentliche Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe setzt den Transmitter Acetylcholin (ACh) frei und exprimiert das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT, Amaral und Kurz, 1985; Armstrong et al., 1983). Für die zweite Gruppe ist charakteristisch, dass sie GABAerg ist, wobei eine Subpopulation dieser Neurone das Protein Parvalbumin exprimiert (Freund und Antal, 1988; Freund, 1989; Kiss et al., 1990b). Die dritte Gruppe exozytiert typischerweise den Transmitter Glutamat (Huh et al., 2010; Sotty et al., 2003). Neben der Freisetzung verschiedener Neurotransmitter unterscheiden sich diese Neuronenpopulationen in ihrer elektro-

physiologischen Aktivität. Für die cholinergen Neurone wurde in vitro ein langsames Entladungsverhalten (5 Hz), breite Aktionspotentiale und lange Nachhyperpolarisationen beschrieben (Griffith und Matthews, 1986; Sotty et al., 2003). Die GABAergen Neurone zeigen hingegen ein schnelles Entladungsverhalten (10-18 Hz) mit schmalen Aktionspotentialen und kurzen Nachhyperpolarisationen, welches häufig mit salvenartigen Entladungen assoziiert ist (Knapp et al., 2000; Sotty et al., 2003). Die glutamatergen Neurone können währenddessen durch ein clusterartiges Feuerverhalten mit eingestreuten, unterschwelligen Membranoszillationen charakterisiert werden (Huh et al., 2010; Sotty et al., 2003). Jedoch weisen die glutamatergen Neurone teilweise auch schnelles Entladungsmuster auf, was die elektrophysiologische Abgrenzung zu den GABAergen Neuronen erschwert (Huh et al., 2010).

Dabei wird die Aktivität einer dieser Neuronengruppen durch die jeweils anderen Neuronenpopulationen beeinflusst. Neben reziproken Verbindungen zwischen cholinergen und GABAergen Neuronen, wird die Aktivität dieser beiden Neuronenpopulationen durch die glutamaterge Neuronengruppe beeinflusst (Manseau et al., 2005; Teles-Grilo Ruivo und Mellor, 2013; Tóth et al., 1993). Zudem exprimieren auch cholinerge und glutamaterge Neurone Acetylcholin-Rezeptoren (AChR), sodass die Freisetzung von Acetylcholin im MSDB zur Exzitation der cholinergen, GABAergen und glutamatergen Neurone führt (Manseau et al., 2005). Schließlich konnte auch für die PV<sup>+</sup> Subpopulation der GABAergen Neurone gezeigt werden, dass sie über ein lokales Netzwerk im MSDB die dort befindlichen Neurone innervieren (Borhegyi et al., 2004). Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivität einer Neuronenpopulation des MSDB nicht als streng isoliert betrachtet werden kann, sondern als Teil eines septalen Neuronennetzwerks aufgefasst werden sollte (Borhegyi et al., 2004).

### **1.3 Projektionen der Neuronenpopulationen des MSDB**

Die drei Neuronenpopulationen des MSDB entsenden über ihre axonalen Fortsätze langstreckige Projektionen in andere zentralnervöse Strukturen, wie den entorhinalen-, den perirhinalen- und den retrosplenialen Cortex, sowie den Hypothalamus und den Gyrus cinguli (Buzsáki, 2002; Dutar et al., 1995). Insbesondere ist für septalen Neurone bekannt, dass sie über die Fimbria und die dorsale Fornix in den Hippocampus

projizieren. Hierbei machen die Fortsätze der cholinergen und GABAergen Neurone den Großteil dieser septohippocampalen Projektionen aus, während rund 23 % der Projektionen glutamatergen Neuronen entstammen (Colom et al., 2005; Freund, 1989). Indessen existieren bereits grobe Kenntnisse über die Verteilung dieser Projektionen innerhalb der hippocampalen Areale und Laminae, bzw. über die innervierten Zielstrukturen.

Für die cholinergen Projektionen ist bekannt, dass sie sich diffus in allen hippocampalen Arealen verteilen und dort präferentiell Prinzipalzellen innervieren (Freund und Buzsáki, 1996; Vizi und Kiss, 1998). Hierbei wurde mittels der Injektion von Tracern in das MSDB gezeigt, dass die cholinergen Afferenzen im Stratum oriens und im inneren Stratum radiatum die proximalen, dendritischen Regionen von Pyramidenzellen innervieren (Freund und Antal, 1988; Frotscher und Léránth, 1985). Zudem kontaktieren sie in der infra- und supragranulären Zone des Gyrus dentatus Dendriten von Körnerzellen (Freund und Antal, 1988; Frotscher und Léránth, 1985). Jedoch enden 5-10 % der cholinergen Terminalien auch an hippocampalen, GABAergen Interneuronen (Freund und Buzsáki, 1996). Grundsätzlich scheinen cholinerge Afferenzen im Hippocampus jedoch nicht mit spezifischen postsynaptischen Nervenstrukturen assoziiert zu sein (Descarries et al., 1997). Zudem kann das freigesetzte Acetylcholin über das Erreichen des extrazellulären Milieus eine Vielzahl von umgebenden Zellen innervieren (Volumentransmission). Daher wird angenommen, dass die cholinergen Afferenzen potentiell alle hippocampalen Zelltypen kontaktieren können. Hierbei scheint die hippocampale Acetylcholin-Freisetzung abhängig von der aktuellen neuronalen Aktivität zeitlich und örtlich präzise reguliert zu sein (Parikh et al., 2007; Teles-Grilo Ruivo und Mellor, 2013).

Für die GABAergen Projektionen ist hingegen bekannt, dass sie im Hippocampus spezifisch GABAerge Interneurone-, jedoch keine Prinzipalzellen innervieren (Freund und Antal, 1988). Hierbei bilden die Projektionen typischerweise korbähnliche Kontaktstellen mit den Somata dieser Interneurone, welche vorrangig im Stratum oriens und Stratum radiatum des CA3 Areals, sowie im Hilus und im Stratum granulosum des Gyrus dentatus zu liegen scheinen (Freund und Antal, 1988). Währenddessen werden Interneurone im CA1 Areal, im Stratum moleculare des Gyrus dentatus, sowie im Stratum

lacunosum-moleculare des CA1- und CA3 Arealen seltener innerviert (Freund und Antal, 1988). Diese Kenntnisse basieren allerdings auf morphologisch-anatomischen Gesichtspunkten der Projektionsfasern nach ihrer unselektiven Markierung durch Injektion von Tracern in das MSDB. Die GABAergen Projektionen haben dabei einen wesentlichen Einfluss auf die Aktivität der hippocampalen Interneurone, was u.a. dadurch bestätigt wurde, dass 84 % der PV<sup>+</sup>/Calbindin<sup>+</sup> Interneurone des CA3 Arealen durch GABAerge Afferenzen kontaktiert werden (Freund und Antal, 1988). Da die hippocampalen Interneurone ihrerseits hippocampale Prinzipalzellen inhibieren, führt die Aktivität der GABAergen Afferenzen über die Inhibition GABAerger Interneurone zur Disinhibition einer Vielzahl exzitatorischer Prinzipalzellen (Freund und Antal, 1988; Tóth et al., 1997). Funktionell konnte gezeigt werden, dass GABAerge Projektionsneurone des MSDB ein rhythmisches Entladungsmuster aufweisen, welches einen zeitlichen Bezug zu Theta Oszillationen des laufenden hippocampalen LFP hat (Hangya et al., 2009). Zudem weist die Parvalbumin-haltige Subpopulation der GABAergen Neurone eine Phasenpräferenz ihres Entladungsmusters in Bezug auf den hippocampalen Theta Rhythmus auf, während PV-negative GABAerge Neurone nicht phasengebunden feuern (Borhegyi et al., 2004; Varga et al., 2008). Somit scheint die PV<sup>+</sup> Subpopulation der GABAergen Projektionsneurone potentiell einen größeren Beitrag zu hippocampalen Theta Oszillationen zu haben als GABAerge Neurone, die das Protein Parvalbumin nicht exprimieren (Hangya et al., 2009).

Die glutamatergen Projektionen sind indessen noch nicht ausreichend untersucht. Allerdings gibt es Hinweise, dass sie in alle hippocampalen Areale projizieren und hierbei hippocampale Pyramidenzellen des CA3 Arealen-, und potentiell auch hippocampale Interneurone kontaktieren (Colom et al., 2005; Huh et al., 2010). Somit könnte eine exzitatorische Funktion der glutamatergen Projektionen im septalen und hippocampalen Neuronennetzwerk vermutet werden (Huh et al., 2010; Manseau et al., 2005). Da auch für einen Teil der glutamatergen Neurone gezeigt werden konnte, dass diese ein spontanes rhythmisches Feuern im Theta Frequenzband aufweisen, wird angenommen, dass sie mit einigen GABAergen Neuronen zusammen eine intrinsische Schrittmacherfunktion der hippocampalen Thetaaktivität haben könnten (Huh et al., 2010; Sotty et al., 2003).

#### **1.4 Rückprojektionen des Hippocampus in das MSDB**

Während hippocampale Neurone durch septale Afferenzen innerviert werden, haben hippocampale Neurone ebenfalls Einfluss auf die elektrische Aktivität der septalen Projektionsneurone. Dabei entsenden GABAerge, Calbindin<sup>+</sup> Interneurone des Stratum oriens der Areale CA3 und CA1 Projektionen an GABAerge Neurone der PV<sup>+</sup> Subpopulation und teilweise auch an cholinerge Neurone des MSDB (Tóth et al., 1993). Da diese GABAergen, septal projizierenden Neurone wiederum durch hippocampale Prinzipalzellen innerviert werden, kann die rhythmische Aktivität letzterer an Neurone des MSDB vermittelt werden (Blasco-Ibáñez und Freund, 1995). Durch die GABAergen Rückprojektionen werden die kontaktierten Neurone des MSDB inhibiert, wobei in den GABAergen Projektionsneuronen des MSDB konsekutiv rhythmische Entladungen entstehen, welche wiederum an das hippocampale Neuronennetzwerk weitergeleitet werden (Borhegyi et al., 2004; Manseau et al., 2008). Somit scheinen die hippocamposeptalen Projektionen eine Rolle bei der Synchronisation des septohippocampalen Schaltkreises und der Aufrechterhaltung der Thetaaktivität zu haben (Hangya et al., 2009). Dies deutet darauf hin, dass die Funktion des septohippocampalen Systems einer reziproken Interaktion unterliegt, welche für die Feinmodulierung der neuronalen Netzwerkaktivität und assoziierten Kognitions- und Verhaltensprozessen entscheidend zu sein scheint (Manseau et al., 2008).

#### **1.5 Funktionelle Bedeutung des septohippocampalen Systems**

Die septohippocampalen Projektionen haben eine wesentliche funktionelle Bedeutung für die Aktivität des hippocampalen Neuronennetzwerks und assoziierten Kognitionsprozessen, bzw. Verhaltensweisen. Auch wenn die zugrundeliegenden zellulären Mechanismen noch nicht vollständig bekannt sind, ist gewiss, dass die septalen Afferenzen insbesondere die hippocampale Thetaaktivität modulieren und synaptische Plastizität induzieren. Da diese Mechanismen als Grundlage für die Verarbeitung von Gedächtnisinhalten angesehen werden, scheint die Aktivität der septalen Projektionen für diese Kognitionsprozesse wesentlich zu sein.



1.5.1 Modulation der hippocampalen Thetaaktivität. Eine Vielzahl an Studien hat bereits den funktionellen Beitrag der septohippocampalen Projektionen zur Generierung hippocampaler Theta Oszillationen untersucht. Während gezeigt werden konnte, dass hippocampale Strukturen autonom in der Lage sind, Theta Oszillationen zu generieren, ist seit geraumer Zeit bekannt, dass septale Afferenzen eine wesentliche Bedeutung bei der Modulation dieser Aktivitätsform haben (Goutagny et al., 2009; Huh et al., 2010; Petsche et al., 1962). Über welche exakten Mechanismen dies geschieht, ist allerdings noch nicht vollständig bekannt. Dabei weist die Konvergenz von neuronalen Fortsätzen weiterer extrinsischer Theta Generatoren im MSDB auf die Funktion der septalen Neurone als zentrale Schaltstelle für die Modulation der Thetaaktivität hin (Dutar et al., 1995; Teles-Grilo Ruivo und Mellor, 2013). Zudem werden die septalen Neurone durch die hippocamposeptalen Rückprojektionen über die aktuelle Aktivität des hippocampalen Neuronennetzwerks „informiert“. Die Aktivität der septalen Projektionsneurone resultiert also einerseits aus dem Zusammenlaufen Theta-relevanter elektrischer Signale aus anderen zentralnervösen Strukturen und andererseits aus ihrer intrinsischen Fähigkeit, phasengebunden im Theta Frequenzband zu entladen (Sotty et al., 2003; Varga et al., 2008). Die Bedeutung des MSDB für den Theta Rhythmus wird dabei durch die Tatsachen bestätigt, dass (i) bei einer Läsion oder Inaktivierung der septalen Afferenzen die hippocampale Thetaaktivität sistiert und (ii) auch Theta Oszillationen innerhalb des entorhinalen Cortex, welche über den tractus perforans an den Hippocampus weitergeleitet werden, vom MSDB beeinflusst werden (Buzsáki, 2002; Yoder und Pang, 2005). Es wird folglich angenommen, dass die Projektionsneurone des MSDB neben ihrer potentiellen Generatorfunktion des hippocampalen Theta Rhythmus eine zentrale Rolle bei der Integration einer Vielzahl von extrinsischen Signalen zur Feinmodulation des Aktivitätszustands des hippocampalen Neuronennetzwerks haben.

Welche zellulären Effekte die septalen Projektionen im Hippocampus bei der Modulation der Thetaaktivität haben, ist für die drei respektiven Neuronenpopulationen des MSDB teilweise bekannt.

Dabei haben die GABAergen-, sowie potentiell auch die glutamatergen Projektionen durch ihr rhythmisches Entladungsverhalten im Theta Frequenzband eine intrinsische Schrittmacherfunktion der Theta Oszillationen (Huh et al., 2010; Varga et al., 2008). Die Bedeutung der GABAergen Projektionen für hippocampale Theta Oszillationen wird hierbei durch die Beobachtung bestätigt, dass nach ihrer selektiven Ausschaltung hippocampale, bewegungsassoziierte Theta Oszillationen reduziert sind (Yoder und Pang, 2005).

Über welche zellulären Mechanismen die cholinergen Projektionen zur Thetaaktivität beitragen, ist noch nicht vollständig verstanden. Hierbei scheinen die cholinergen Afferenzen aufgrund ihres langandauernden Entladungsverhaltens jedoch nicht in der Lage zu sein, phasengebunden im Theta Rhythmus zu entladen und somit eine Schrittmacherfunktion dieser hippocampalen Aktivitätsform zu haben (Teles-Griolo Ruivo und Mellor, 2013). Die Freisetzung von Acetylcholin scheint vielmehr in der Amplifikation der Prinzipalzell-Antworten auf disinhibitorische Signale- und der Verstärkung des Entladungsverhaltens der Interneurone im Theta Frequenzband zu liegen (Tóth et al., 1997). Somit haben die cholinergen Projektionen einen permissiven, bzw. modulatorischen Effekt auf die hippocampalen Theta Oszillationen (Buzsáki, 2002). Dennoch ist die Aktivität der cholinergen Afferenzen essentiell für die Generierung von Thetaaktivität, was durch die Beobachtung bestätigt wurde, dass nach selektivem Ausschalten des cholinergen Inputs der bewegungsassoziierte Theta Rhythmus reduziert ist, ähnlich wie bei Inhibition der GABAergen Projektionen (Teles-Griolo Ruivo und Mellor, 2013; Yoder und Pang, 2005).

Welchen funktionellen Beitrag die glutamatergen Projektionen zur Modulation der Thetaaktivität haben, ist noch nicht ausreichend bekannt. Allerdings scheint eine Beteiligung wahrscheinlich, da glutamaterge Neurone die Aktivität von cholinergen und GABAergen Projektionsneurone im MSDB-, bzw. von Pyramidenzellen im CA3 Areal durch rhythmische Entladungen beeinflussen können (Manseau et al., 2005; Huh et al., 2010). Somit kann angenommen werden, dass ein Teil der glutamatergen Neurone über septale, bzw. hippocampale Verbindungen an der Modulation der Theta Oszillationen beteiligt ist (Huh et al., 2010).

Folglich scheint das Zusammenspiel der Aktivität der GABAergen-, cholinergen- und glutamatergen Neuronenpopulationen des MSDB für die hippocampale Thetaaktivität essentiell zu sein. Allerdings sind die respektiven Neuronengruppen für unterschiedliche Komponenten des Theta Rhythmus verantwortlich, was durch die Veränderung des hippocampalen Theta Rhythmus durch selektive Ausschaltung einer projizierenden Neuronenpopulation bestätigt wurde (Yoder und Pang, 2005). Daher wird angenommen, dass das anatomische und funktionelle Zusammenspiel der Projektionsneurone einem komplexen, zeitabhängigen Exzitations- und Inhibitionsprozess unterliegt, der für die Generierung synchroner hippocampaler Aktivität essentiell zu sein scheint (Teles-Grilo Ruivo und Mellor, 2013).

1.5.2 Beeinflussung der synaptischen Transmission. Die synaptische Plastizität im Hippocampus, i. e. die Veränderung der Übertragungsstärke zwischen hippocampalen Neuronen, wird als wesentlicher Mechanismus zur Konsolidierung von Gedächtnisinhalten und zur Bildung des Langzeitgedächtnisses angesehen. Dabei wird die synaptische Transmission durch eine Vielzahl von teilweise noch nicht vollständig verstandenen Mechanismen moduliert, wobei cholinerge Projektionen des MSDB eine wesentliche Rolle zu haben scheinen (Blitzer et al., 1990). Durch die fein abgestimmte Acetylcholin-Freisetzung aus cholinergen Afferenzen kann hierbei die Stärke der synaptischen Übertragung zwischen exzitatorischen bzw. inhibitorischen hippocampalen Neuronen sowohl auf einer zeitlichen Skala (kurz- und langfristig)-, als auch in der Richtung (Verstärkung vs. Abschwächung) differenziert moduliert werden (Teles-Grilo Ruivo und Mellor, 2013). Dabei ist die Dauer, die Lokalisation und das Ausmaß der hippocampalen Acetylcholin-Freisetzung für die fein justierte Aktivierung prä-, bzw. postsynaptischer nikotinischer und muscarinischer Acetylcholinrezeptoren (nAChR, bzw. mAChR) maßgebend. Diese Rezeptoren regulieren hierbei über eine Vielzahl zellulärer Mechanismen unter Beteiligung von Astrozyten die Stärke der synaptischen Übertragung (Navarrete et al., 2012; Teles-Grilo Ruivo und Mellor, 2013). Darüber hinaus ist besonders für die Induktion der langfristigen Verstärkung der synaptischen Übertragung (long term potentiation, LTP) bekannt, dass diese abhängig von der zeitlichen Relation der Aktivierung der nAChR, bzw. mAChR zur aktuellen hippocampalen Theta Phase

stattfindet (Hyman et al., 2003). Die Modulation der synaptischen Übertragung im Hippocampus unterliegt folglich einem komplexen Zusammenspiel einer Vielzahl von Faktoren, wobei die septalen Projektionen eine wesentliche Rolle zu haben scheinen.

### **1.6 Ziele des Projektes**

Viele Studien haben bereits die Neuronenpopulationen des MSDB, ihre hippocampalen Projektionen und ihre Bedeutung für die hippocampale Netzwerkaktivität, bzw. assoziierten kognitiven Prozessen untersucht. Allerdings ist noch nicht ausreichend bekannt, wie die Fortsätze der septalen Neurotransmittersysteme im Hippocampus verlaufen, bzw. ob hierbei bestimmte hippocampale Areale präferentiell innerviert werden. Zudem sind die zellulären Zielstrukturen dieser Projektionsfasern erst teilweise identifiziert. Da diese Kenntnisse für das Verständnis der septohippocampalen Interaktion essentiell sind, wird in unserer Arbeitsgruppe eine Methode verwendet, welche mittels viraler Transduktion eine eindeutige genetische Markierung der respektiven Neuronenpopulationen im MSDB und ihrer axonalen Fortsätze ermöglicht. Somit können diese durch eine immunhistochemische Färbung spezifisch dargestellt- und mittels Mehrfachfärbungen ihre potentiellen hippocampalen Zielstrukturen identifiziert werden. Zudem erlaubt der gewählte Ansatz die funktionelle Manipulation der genetisch definierten Projektionsneurone mittels lichtbasierter, optogenetischer Stimulation.

Ziel dieser Arbeit ist

- Die Validierung der viralen Transduktion septohippocampaler Projektionsneurone.
- Die Untersuchung des hippocampalen Verteilungsmusters der Projektionsfasern cholinerg und GABAerger Neurotransmittersysteme des MSDB.
- Die Identifikation potentieller Zielstrukturen dieser Projektionsfasern im Hippocampus und die Untersuchung, ob hierbei Zellen in spezifischen hippocampalen Arealen präferentiell innerviert werden.

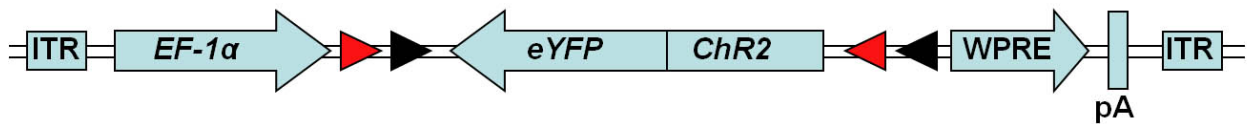
## 2. Material und Methoden

### 2.1 Transgene Mauslinien

Es wurden zwei transgene Mauslinien verwendet, welche das Protein Cre-Recombinase entweder in cholinergen (ChAT-Cre) Neuronen oder in der PV<sup>+</sup> Untergruppe GABAerger Neurone (PV-Cre) exprimierten. Die zelltypspezifische Expression der Cre-Recombinase war dabei die Grundlage für die selektive genetische Markierung dieser Neuronentypen und die Untersuchung ihrer hippocampalen Projektionen nach der viralen Transduktion der Versuchstiere. Die Expression der Cre-Recombinase wurde in cholinergen Neuronen durch den ChAT-Promotor kontrolliert (Mauslinie B6;129S6-Chattm2(cre)Lowl/J). In der PV<sup>+</sup> Subpopulation der GABAergen Neurone geschah dies durch den Promotor für das calciumbindende Protein Parvalbumin (Mauslinie B6;129P2-Pvalbtm1(cre)Arbr/J).

### 2.2 Der virale DNA-Vektor

Den Cre exprimierenden Mäusen wurde ein recombinantes adeno-assoziiertes Virus (rAAV) injiziert. Dieses Virus trug einen DNA-Vektor mit der genetischen Information für den lichtsensitiven Kationenkanal Channelrhodopsin-2 und das fluoreszierende Protein enhanced Yellow Fluorescent Protein (ChR2-eYFP, Abb. 2). Das Fusionsgen für ChR2-eYFP war umgekehrt zur üblichen Leserichtung der DNA angeordnet und von zwei inkompatiblen loxP Sequenzpaaren flankiert. Die Expression des Konstrukts wurde durch den ubiquitären Promotor human elongation factor-1 alpha erreicht (EF-1 $\alpha$ , Lund et al., 1996). Weitere Bestandteile des viralen Vektors waren ein woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE) zur Verstärkung der Expression, eine poly-Adenin Gensequenz (pA) zum Schutz vor DNAsen, und zwei inverted terminal repeat-Sequenzen (ITR) zur Initiation der Replikation (Bohenzky et al., 1988, Klein et al., 2006).



**Abb. 2: Der virale DNA Vektor.** Dieser wurde den Cre exprimierenden Mäusen vier Wochen nach der Geburt stereotaktisch injiziert. Mittig ist das invertierte Fusionsgen enhanced Yellow Fluorescent Protein-Channelrhodopsin-2 (eYFP-ChR2) dargestellt. Dieses wird von inkompatiblen loxP- (schwarze Pfeile) und lox2722 Paaren (rote Pfeile) flankiert. Die Expression erfolgte durch den human elongation factor-1 alpha (EF-1 $\alpha$ ) Promotor. Weitere Genbestandteile des Vektors waren zwei inverted terminal repeat-Sequenzen (ITR), ein woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE) und eine poly-Adenin (pA) Sequenz (modifiziert nach Cardin et al., 2009).

Herstellung des Virus. Das Plasmid zur Herstellung des viralen DNA-Konstrukts (Abb. 26 im Anhang) wurde durch die Arbeitsgruppe von Karl Deisseroth, Stanford Universität, USA zur Verfügung gestellt. Die Produktion und Aufreinigung des Virus wurde durch die Arbeitsgruppe Becker/Schoch wie zuvor beschrieben durchgeführt und für die hier beschriebenen Versuche zur Verfügung gestellt (van Loo et al., 2012).

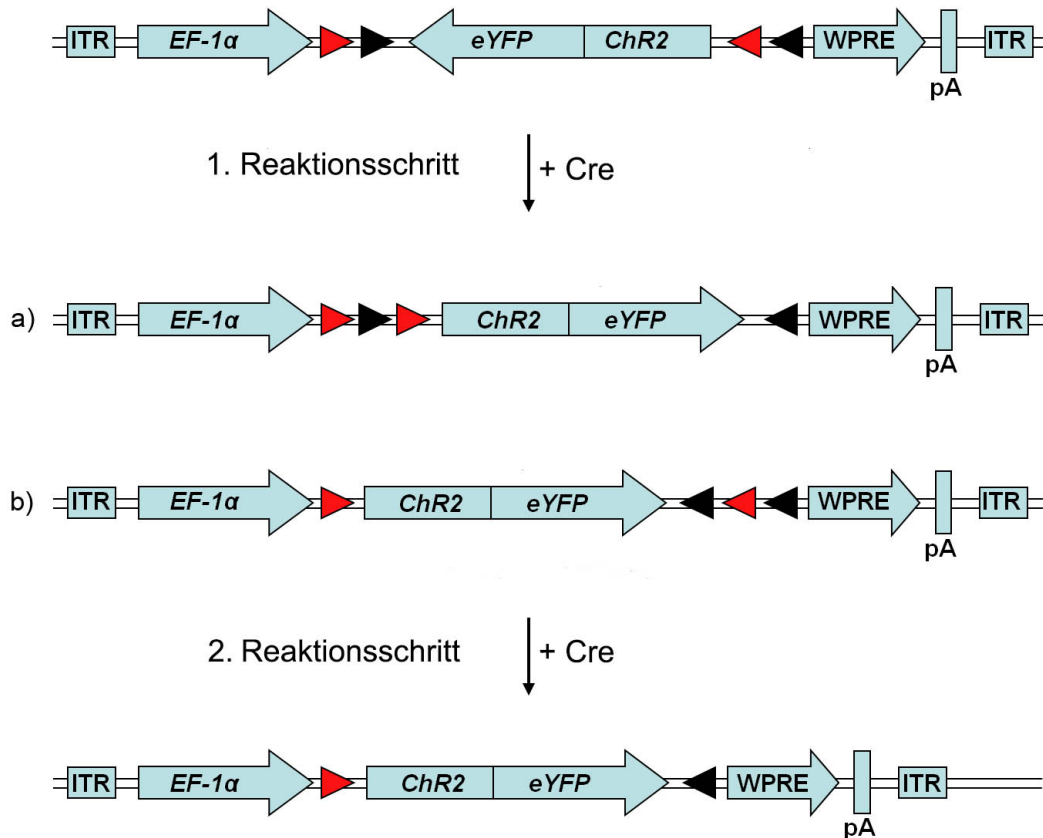
### 2.3 Virusinjektion und zelltypspezifische Expression von ChR2-eYFP

Virusinjektion. Das konditionale Virus wurde den transgenen Mäusen vier Wochen nach Geburt stereotaktisch injiziert. Dafür wurden die Tiere durch intraperitoneale (i. p.) Applikation von 1 ml/kg Medetomidine (Dormitor<sup>®</sup>, Provet AG, Lyssach, Schweiz) und 1 ml/kg Ketamin (bela-pharm, Vechta, Deutschland) anästhesiert. Das Kopffell wurde rasiert und die Augen mittels einer Creme (Bepanthen, Bayer, Leverkusen, Deutschland) vor Austrocknen geschützt. Anschließend wurde die Maus auf einem regelbaren Heizkissen abgelegt und die Körpertemperatur während und nach der Operation überwacht (Temperaturregler TCAT-2LV, Physitemp, Clifton, USA). Nach Fixierung des Kopfes im Stereotaxierahmen (Modell 902, Kopf Instruments, Tujunga, USA) wurde der Schädel durch eine mediane Inzision freigelegt und die Schädelhäute vorsichtig entfernt. Zur Injektion wurde eine Injektionsnadel (NanoFil syringe, World Precision Instruments, Sarasota, USA) mit einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l am Stereotaxierahmen befestigt. Die Maus wurde mittels eines feinen Dentalbohrers (Fine Science Tools, Foster City, USA) an der Position +0,1 cm rostral und +0,07 cm rechts-

lateral von Bregma mit einem Durchmesser ca. 0,7 mm kraniotomiert. Nach Freilegung der Hirnhäute wurde die Injektionsspritze in einem Winkel von 10° zur dorso-kaudalen Achse eingestellt. Dieser Winkel war nötig, um die Punktion des venösen Blutleiters zu verhindern. Die Spritze wurde um 0,48 cm nach ventral in das Gehirn vorgeschoben und die erste von zwei Virusinjektionen durchgeführt. Das Injektionsvolumen betrug dabei jeweils 1 µl der Virussuspension. Die Injektionsgeschwindigkeit (200 nl/min) wurde durch eine Microinjektionsspritze (Modell Micro4, World Precision Instruments, Sarasota, USA) gesteuert.

Nach Beendigung der Injektion wurde die Injektionsnadel noch für weitere drei Minuten an der Position belassen, um die Diffusion der viralen Partikel nicht zu beeinträchtigen. Für die zweite Injektion wurde die Injektionsnadel um 0,04 cm zurückgezogen und die Injektion mit identischem Volumen und Geschwindigkeit initiiert. Nach Abschluss der Injektion wurde die Spritze um weitere fünf Minuten am Ort belassen. Anschließend wurde die Injektionsspritze langsam aus dem Gewebe herausgezogen. Nach Naht der Kopfhaut mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl Plus 5-0, Johnson & Johnson, New Brunswick, USA) wurde das Tier aus dem Stereotaxierahmen genommen und das Antidot des Anästhetikums (5 mg/kg i. p. Atipamezole, Antisedan, Provet AG) gespritzt.

2.3.2 Zelltypspezifische Expression der Protein ChR2-eYFP. Die stabile zelltypspezifische Expression der Proteine ChR2-eYFP in transduzierten, Cre exprimierenden Neuronen des MSDB wurde in zwei Einzelschritten erreicht. Zuerst kam es durch die Cre-Recombinase zur Inversion des Fusionsgens (Abb. 3). Durch die zellspezifische Expression der Cre-Recombinase in ChAT<sup>+</sup> bzw. PV<sup>+</sup> Neuronen fand die Inversion ausschließlich in diesen Neuronen statt. Durch die Inversion kam es zudem zur seriellen Anordnung eines loxP Sequenzpaares, was im zweiten Recombinationsschritt zur Deletion von zwei loxP Sequenzen führte. Die Deletion resultierte in stabiler, irreversibler Expression der Proteine ChR2-eYFP und führte zur Fluoreszenzmarkierung der ChAT<sup>+</sup> bzw. PV<sup>+</sup> Projektionsneurone im MSDB und ihrer axonalen Projektionen.



**Abb. 3: Reaktionsprinzip des Cre/loxP Systems nach Aufnahme des viralen DNA Vektors in Cre exprimierende Neurone des MSDB.** Oben: Dargestellt ist der virale DNA Vektor, der den Mäusen vier Wochen nach Geburt ins das MSDB injiziert wurde. Nach zellulärer Aufnahme des Vektors kam es in Cre exprimierenden Neuronen des MSDB zur Inversion des Fusionsgens ChR2-eYFP (1. Reaktionsschritt). Diese fand entweder zwischen den spiegelbildlich angeordneten loxP Sequenzen (schwarze Pfeile, a) oder den Sequenzen der loxP Variante lox2272 (rote Pfeile, b) statt. Durch den 1. Reaktionsschritt wurden die loxP Sequenzen zudem neu angeordnet, so dass ein loxP Sequenzpaar derselben Variante in die gleiche Richtung orientiert war. Entsprechend dem allgemeinen Reaktionsprinzip der Cre-Recombinase erfolgte im 2. Reaktionsschritt die Exzision des DNA Abschnitts zwischen diesem loxP Sequenzpaar. Diese Reaktionsschritte resultierten in einer stabilen Expression der Proteine ChR2-eYFP in Cre exprimierenden Zellen des MSDB (modifiziert nach Cardin et al., 2009).



## 2.4 Perfusion der Mäuse

Die Perfusion der Mäuse erfolgte frühestens vier Wochen nach Injektion der Virus-suspension. Dazu wurden die Tiere zunächst mit Isofluran (Forene<sup>®</sup>, Abbott, Chicago, USA) anästhesiert. Anschließend wurde die Bauchhöhle eröffnet und diese bis zum Zwerchfell freipräpariert. Nach Durchtrennung des Zwerchfells wurde der linke Ventrikel mit einer Kanüle punktiert und die Maus mit 40 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) perfundiert. Zuvor musste ein größeres Gefäß (z.B. die untere Hohlvene) eröffnet werden, damit Blut während der Injektion austreten konnte. Nach Abschluss der Injektion wurde die Maus dekapitiert, das Gehirn aus dem Schädel präpariert und über Nacht bei 4 °C in PFA nachfixiert.

## 2.5 Gewinnung der Hirnschnitte

Das fixierte Gehirn wurde auf einem Probeteller aufgeklebt und 50 µm dicke coronare Hirnschnitte an einem Vibratom (Modell VT1000s, Leica, Wetzlar, Deutschland, Schnittgeschwindigkeit 0,15 mm/s) hergestellt. Die Präparate wurden anschließend in eine Multititerplatte (24 Nöpfchen, VWR International, Radnor, USA) überführt.

## 2.6 Immunhistochemische Färbung

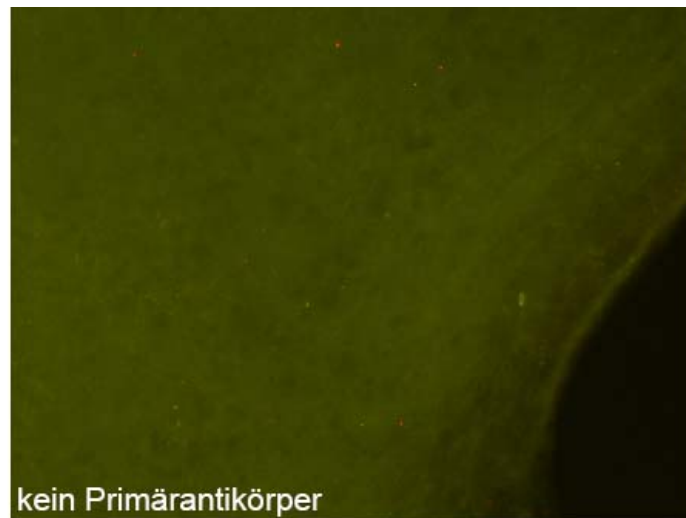
2.6.1 Prinzip der Färbung. In den Hirnschnitten sollten spezifische Strukturen, i. e. Neurone, bzw. septohippocampale Projektionsfasern durch eine indirekte immunhistochemische Färbung markiert werden. Diese Färbung beruht auf der spezifischen Bindung eines Primärantikörpers an charakteristische Antigene der zu markierenden Struktur. Da die Primärantikörper allerdings noch keine Fluoreszenz verursachen, müssen diese wiederum mit Sekundärantikörpern markiert werden, welche spezifisch gegen den Zuchtwirt des Primärantikörpers gerichtet sind. Die Sekundärantikörper sind dabei an Fluoreszenzproteine gekoppelt, welche nach lichtbasierter Exzitation Licht mit spezifischer Wellenlänge emittieren. Der Vorteil dieses indirekten Färbeverfahrens im Vergleich zu direkten Färbeverfahren liegt in der höheren Sensitivität der Markierung durch eine Amplifikation des Fluoreszenzsignals (aus: Dako, Immunohistochemical Staining Methods, Fifth Edition).

2.6.2 Verwendete Marker. Zur Markierung cholinergischer Neurone wurde ein Primärantikörper verwendet, der spezifisch gegen das Enzym Cholin-Acetyl-Transferase (anti-ChAT) gerichtet war. Die Markierung der Parvalbumin-haltigen Subpopulation GABA-erger Neurone erfolgte mit einem Antikörper gegen das Protein Parvalbumin (anti-PV). Zur Fluoreszenzmarkierung transduzierter, eYFP<sup>+</sup> Neurone wurde ein Antikörper gegen das fluoreszierende Protein eYFP (anti-eYFP) verwendet. Durch Doppelfärbungen konnten somit in septalen Hirnschnitten die Neuronenpopulationen charakterisiert- und transduzierte Neurone markiert werden. Im Hippocampus erfolgte eine Identifikation von PV<sup>+</sup> Interneuronen nebst der Markierung septaler eYFP<sup>+</sup> Afferenzen. Da zudem putative Kontaktstellen zwischen den PV<sup>+</sup> Interneuronen und GABAergen eYFP<sup>+</sup> Afferenzen nachgewiesen werden sollten, erfolgte eine Dreifachfärbung mithilfe des Antikörpers gegen Synapsin 1,2 (anti-Syn) zur Detektion von Synapsen.

2.6.3 Auswahl der Präparate. Es sollte die Lokalisation, Zelltypspezifität und Effizienz der ChR2-eYFP Expression in transduzierten Projektionsneuronen des MSDB untersucht werden. Dazu wurden Hirnschnitte in einem Bereich von Bregma +1,2 bis +0,2 mm ausgewählt, da dieser Bereich der anatomischen Lage des MSDB entspricht (Paxinos und Franklin, 2008). Bei Präparaten von Tieren, in denen cholinerge Projektionsneurone transduziert worden waren, wurde eine immunhistochemische anti-ChAT/anti-eYFP Doppelfärbung durchgeführt. Bei Präparaten von Tieren, in denen PV-positive Projektionsneurone transduziert worden waren, erfolgte eine anti-PV/anti-eYFP Doppelfärbung. Zudem sollte das areal- und laminaspezifische Verteilungsmuster septaler Projektionsfasern im dorsalen und ventralen Hippocampus untersucht-, bzw. ihre hippocampalen Zielstrukturen erfasst werden. Dazu wurden anhand der Koordinaten -2,0 mm, bzw. -2,8 mm von Bregma Hirnschnitte zur Darstellung des dorsalen, bzw. ventralen Hippocampus ausgewählt und eine anti-PV/anti-eYFP-Doppelfärbung durchgeführt. Diese wurde in einigen Präparaten durch die anti-Synapsin Färbung ergänzt.

2.6.4 Reagenzien. Vor Beginn der Färbung wurden verschiedene Lösungen bereitgestellt. Es wurde eine Blocklösung vorbereitet, welche die unspezifische Markierung von Hirnstrukturen durch die fluoreszierenden Sekundärantikörper verhinderte. Diese bestand aus 5 %igem Eselnormals serum (ENS, 017-000-121, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, USA), gelöst in 0,1 M PBS–Triton (0,1 %, Triton™ X-100, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA). Für die Färbungen wurden folgende Primärantikörper verwendet: anti-ChAT (1:100, Wirt: Kaninchen, AB143, Millipore, Billerica, USA), anti-PV (1:1000, Wirt: Kaninchen, PV 25, swant, Marly, Schweiz), anti-GFP (1:1000, Wirt: Ziege, ab5449, abcam, Cambridge, Großbritannien), bzw. anti-Synapsin 1,2 (1:500, Wirt: Meerschweinchen, 106004, Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland). Die Fluoreszenzmarkierung der Primärantikörper erfolgte mit folgenden Sekundärantikörpern: anti-Ziege (1:500, Wirt: Esel, Alexa Fluor® 488, 705-545-147, Jackson ImmunoResearch), anti-Kaninchen (1:500, Wirt: Esel, Cyanine 3, 711-165-152, Jackson ImmunoResearch), bzw. anti-Meerschweinchen (1:500, Wirt: Esel, Alexa Fluor® 647, 706-605-148, Jackson ImmunoResearch). Zur Inkubation der Hirnschnitte waren alle Antikörper zu den genannten Konzentrationen in 0,1 M PBS–Triton 0,1 % mit 5 %igem ENS gelöst.

2.6.5 Färbeprotokolle. Die ausgewählten Hirnschnitte wurden dreimal in 0,1 M PBS für jeweils 10 min gewaschen und anschließend während einer Stunde in jeweils 300 µl der Blocklösung inkubiert. Es folgte die Inkubation mit jeweils 200 µl der gelösten Primärantikörper über Nacht (12 bis 16 Stunden). Dabei wurde stets eine Negativkontrolle angefertigt, um die unspezifische Markierung von Hirnstrukturen durch Sekundärantikörper ausschließen zu können (Abb. 4). Dazu wurde ein Präparat ohne Zusatz des Primärantikörpers in der Blocklösung belassen. Am Folgetag wurden die Präparate dreimal 10 min in 0,1 M PBS gewaschen und anschließend in jeweils 200 µl der Sekundärantikörperlösung inkubiert. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden die Präparate dreimal 10 min in 0,1 M PBS gewaschen, auf Objektträger transferiert und eingedeckt. Alle Färbungsschritte erfolgten in einer Multititerplatte bei Raumtemperatur. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluoreszenzproteine wurde ab der Inkubation mit Sekundärantikörpern der Raum abgedunkelt und die gefärbten Präparate unter Ausschluss vom Licht gelagert.



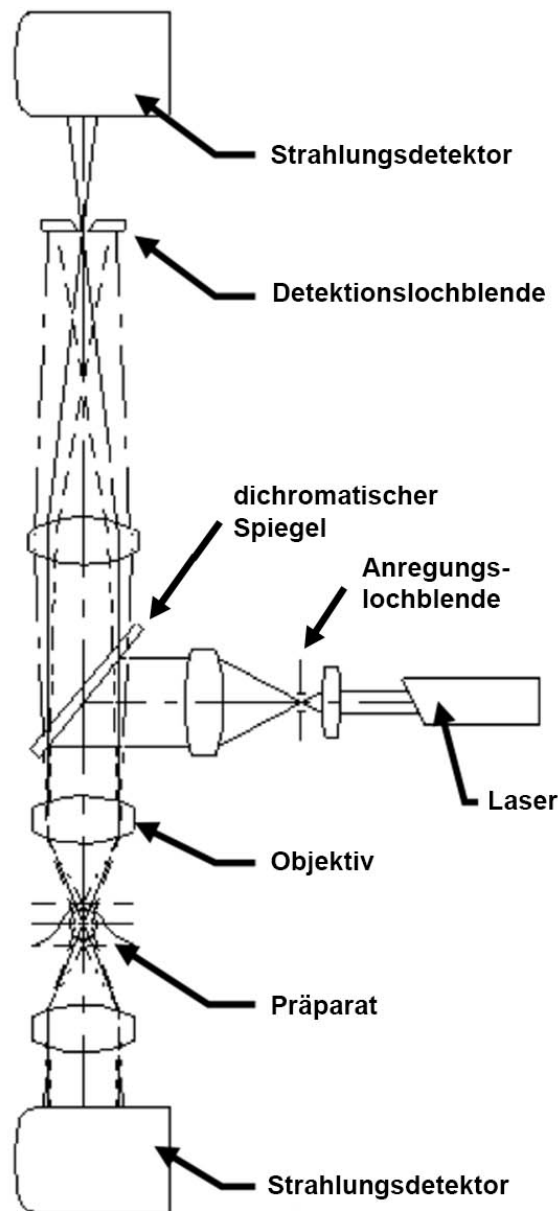
**Abb. 4: Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung.** Dargestellt ist eine Aufnahme des MSDB eines Präparates, welches bei der Färbung nicht mit Primärantikörpern inkubiert wurde. Die restlichen Schritte der Färbung wurden gemäß des Färbeprotokolls durchgeführt. Zu erkennen ist abgesehen von einer unspezifischen Hintergrundfärbung keine spezifische Markierung von Hirnstrukturen. Dies beweist, dass die Fluoreszenz in den durchgeführten immunhistochemischen Färbungen nicht durch eine unspezifische Bindung der fluoreszierenden Sekundärantikörper an Epitope von Hirnstrukturen hervorgerufen wurde.

## 2.7 Mikroskopie

2.7.1 Prinzip der konfokalen Mikroskopie. Die Fluoreszenz der gefärbten Präparate wurde mittels eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops detektiert. Zur Exzitation der an Sekundärantikörper gekoppelten Fluoreszenzproteine wurden Laserstrahlen durch eine Anregungslochblende fokussiert und durch einen dichromatischen Spiegel auf das Präparat reflektiert (Abb. 5). Dabei wurden die Laserstrahlen durch ein Objektiv auf einen sehr kleinen Punkt des Präparates fokussiert und dieses anschließend in x- und y- Richtung abgerastert. Hierbei richtete sich die Wellenlänge der verwendeten Laser nach der Wellenlänge, an welcher die Fluoreszenzstoffe Exzitationsmaxima auswiesen. Nach Exzitation der Fluoreszenzproteine kam es zur Emission von fluoreszierendem Licht. Die Fluoreszenz wurde nach Durchtritt des emittierten Lichts durch einen Bandpassfilter (nicht in Abb. 5 dargestellt) durch Strahlungsdetektoren detektiert. Dabei besteht die wesentliche Eigenschaft des konfokalen Mikroskops darin, dass sich im Strahlengang des emittierten Fluoreszenzlichts eine Detektionslochblende befindet, wobei deren Mittelpunkt und der Beleuchtungspunkt im Präparat konfokal zueinander stehen. Somit wird ausschließlich das emittierte Licht der eingestellten Z-Ebene detektiert, wobei die anderen Ebenen des Präparates nicht abgebildet werden. Dies bedingt die hohe Z-, bzw. Tiefenauflösung des konfokalen Mikroskops, wodurch die selektive Darstellung einer Schicht des Präparates ohne Überlagerung der anderen Schichten ermöglicht wird.

2.7.2 Durchführung der konfokalen Mikroskopie. Es wurden zwei invertierte konfokale Fluoreszenzmikroskope verwendet: FluoView FV1000 Confocal Microscope (Olympus, Tokyo, Japan) mit der Steuerungssoftware Fluoview 3.1., bzw. Eclipse Ti (Nikon, Chiyoda, Japan) mit der Steuerungssoftware NIS-Elements 4.00.

Aufnahmen des MSDB und des Hippocampus wurden mit einem 10-fachen Objektiv (UPlanSApo, NA 0,4, Olympus, Tokyo, Japan, bzw. CFI Plan Apo Lambda, NA 0,45, Nikon, Chiyoda, Japan) angefertigt. Dabei erfolgte die sequentielle Exzitation der Fluoreszenzproteine mit zwei Lasern der Wellenlängen 488 nm und 543 nm (FluoView Microscope), bzw. 488 nm und 561 nm (Eclipse Ti). Zur Filterung des Emissionslichts wurden 500/30 nm und 555/70 nm- (FluoView), bzw. 525/50 nm und 595/50 nm (Eclipse



**Abb. 5: Vereinfachte Darstellung der Funktionsweise des konfokalen Mikroskops.**

Zur Exzitation der Fluoreszenzproteine im Präparat werden Laserstrahlen durch eine Lochblende zu einer punktförmigen Lichtquelle fokussiert und durch einen dichromatischen Spiegel in Richtung des Präparates reflektiert. Nach Bündelung der Laserstrahlen durch ein Objektiv wird Fluoreszenzlicht im Präparat generiert und dieses durch das Objektiv zurückgeworfen (in der Darstellung nach oben). Nach Durchtritt durch den Spiegel wird nur die Fluoreszenz jener Schicht im Präparat vom Strahlungsdetektor erfasst, welche sich konfokal zur Lochblende befindet. Somit kommt es ausschließlich zur Darstellung einer Ebene des Präparats unter Ausblendung der Fluoreszenz der restlichen Schichten. Ohne Lochblende würde die Fluoreszenz aller Ebenen im Präparat unter Verlust der Tiefenauflösung detektiert (s. Strahlengang ab dem Präparat nach unten). Abb. aus: Bedienungsanleitung zum Fluoview FV300 Confocal Microscope (Olympus).

Ti) Bandpassfilter verwendet. Die Aufnahmen wurden in einer Ebene angefertigt und anschließend manuell zusammengefügt (mit Photoshop, Adobe© Creative Suite 5).

Zur Analyse putativer Kontaktstellen zwischen hippocampalen Interneuronen und septalen Afferenzen wurden Z-Stapelaufnahmen des Stratum pyramidale der Areale CA1, bzw. CA3 und des Stratum granulosum des Gyrus dentatus angefertigt. Diese bestanden aus 15 Einzelaufnahmen mit einem Z-Abstand von jeweils 1  $\mu\text{m}$ . Dabei wurde ein 40-faches Wasserimmersionsobjektiv (Planapo, NA 0,9 NA, Olympus, Tokyo, Japan, bzw. CFI Apo Lambda S, NA 1,25, Nikon, Chiyoda, Japan) und die gleichen Laser und Filter wie zuvor beschrieben verwendet. Zur Darstellung von hochauflösenden 3D-Projektionen einzelner Zellen wurden zudem Aufnahmen mit einem 60-fachen Wasserimmersionsobjektiv (CFI Plan Apo IR, NA 1,27, Nikon, Chiyoda, Japan) angefertigt. Bei Dreifachfärbungen mit anti-PV/anti-eYFP/anti-Syn wurde zur Exzitation ein weiterer Laser der Wellenlänge 633 nm und zur Filterung des Emissionslichts ein zusätzlicher 650/30 nm Bandpassfilter verwendet. Alle Aufnahmen wurden im TIFF-Format gespeichert und später auch in diesem Format bearbeitet und analysiert.

2.7.3 Nicht-konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Zur Untersuchung der Virusdiffusion innerhalb der Hirnschnitte wurden zusätzlich Übersichtsaufnahmen an einem nicht-konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer.Z1 with ApoTome, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) angefertigt. Anhand dieser Aufnahmen konnte analysiert werden, in welche Strukturen das Virus diffundiert war und potentiell zur neuronalen Transduktion geführt hatte.

## 2.8 Verarbeitung und Auswertung der konfokalen Aufnahmen

2.8.1 ChR2-eYFP Proteinexpression in transduzierten cholinergen, bzw. GABAergen Projektionsneuronen des MSDB. Es sollte die Zelltypspezifität und die Effizienz der viralen Transduktion von Projektionsneuronen des MSDB untersucht werden. Die konfokalen Aufnahmen der anti-ChAT/anti-eYFP, bzw. anti-PV/anti-eYFP gefärbten Präparate wurden dazu mit dem frei verfügbaren Bildbearbeitungsprogramm ImageJ analysiert, wobei die manuelle Detektion fluoreszierender Neurone mithilfe einer Auswertroutine erfolgte (s. Anhang). Die wesentlichen Schritte dieser Routine waren:

- Markierung des Bereiches im Hirnschnitt, welcher dem MSDB entsprach.
- Markierung der
  - o ChAT<sup>+</sup> und eYFP<sup>+</sup> Zellen (bei Transduktion cholinergischer Neurone), bzw.
  - o PV<sup>+</sup> und eYFP<sup>+</sup> Zellen (bei Transduktion GABAerger Neurone)
- Quantifikation der markierten Zellen.
- Darstellung der Ergebnisse.

So konnte die Spezifität und die Effizienz der viralen Transduktion ermittelt werden.

2.8.2 Areal- und laminaspezifische Verteilung septaler Projektionsfasern im Hippocampus. Die Verteilungsanalyse septaler Affenzen nach hippocampalen Arealen und Laminae erfolgte für jedes Tier in einem dorsalen und ventralen Hippocampus. Hierzu musste in den aufgenommenen Hirnschnitten eine hippocampale Areal- (CA1, CA2, CA3, Gyrus dentatus), bzw. Laminaeinteilung (Stratum lacunosum-moleculare, -radiatum, -pyramidale und -oriens für CA1-CA3, bzw. Stratum moleculare, -granulosum und Hilus für den Gyrus dentatus) vorgenommen werden. Dazu wurde eine Schablone für den dorsalen, bzw. ventralen Hippocampus angefertigt (Abb. 27 im Anhang), welche auf der zuvor beschriebenen hippocampalen Arealeinteilung basierte (Paxinos und Franklin, 2008). Diese wurde auf die Präparate übertragen. Die Quantifikation fluoreszierender Fasern wurde automatisiert ausgeführt. Dazu musste eine Helligkeitsschwelle für das Präparat bestimmt werden, um zu beurteilen, ob eine fluoreszierende Struktur als Faser, oder als Hintergrund zu werten war. Aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenzintensität der Präparate wurde diese Schwelle individuell



pro Präparat festgesetzt. Dazu wurde im Präparat ein Bereich markiert, in welchem keine Projektionsfasern verliefen. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Helligkeit innerhalb dieses Bereichs wurden bestimmt. Aus dem Mittelwert plus der 3,6-fachen Standardabweichung wurde der Schwellenwert der Helligkeit für die Differenzierung zwischen Fasern und Hintergrund im Präparat festgelegt.

Zur Quantifikation der septalen Afferenzen nach hippocampalen Arealen und Laminae wurde eine Routine in ImageJ entwickelt (s. Anhang). Dazu wurde eine Aufnahme einer hippocampalen anti-PV/anti-eYFP Färbung, und die Arealeinteilung benötigt. Die wesentlichen Schritte der Routine waren die:

- Spaltung der Aufnahme in die zwei Farbkanäle.
- Setzen des Maßstabs.
- Übernahme der zuvor ermittelten Helligkeitsschwelle auf den grünen Kanal und somit ausschließliche Darstellung der eYFP<sup>+</sup> Fasern (s. Abb. 11)
- jeweilige Berechnung der Gesamtfläche einer Lamina, der Gesamtfläche der eYFP<sup>+</sup> Pixel innerhalb dieser Lamina, und damit Angabe des Verhältnisses eYFP<sup>+</sup> Faserfläche/Laminafläche.
- Ausgabe der Ergebnisse.

2.8.3 Putative Kontaktstellen zwischen hippocampalen GABAergen Interneuronen und GABAergen Projektionsfasern aus dem MSDB. Um zu untersuchen, ob GABAerge Interneurone in bestimmten hippocampalen Arealen präferenziell durch GABAerge Afferenzen aus dem MSDB innerviert werden, wurde eine Auswertroutine in ImageJ entwickelt (s. Anhang). Diese benötigte eine Z-Stapelaufnahme bestehend aus 15 Einzelaufnahmen einer anti-PV/anti-eYFP Färbung. Hierbei waren die wesentlichen Schritte:

- Spaltung der Stapelaufnahme in die zwei Farbkanäle
- semiautomatische Detektion und Markierung der optischen Anschnitte von PV<sup>+</sup> Interneuronen
- Ermittlung folgender Daten für jede Schnittebene:
  - Position in der Stapelaufnahme.
  - Anzahl detektierter Zellanschnitte.

- Fläche, Umfang, Position (nach x- und y-Koordinate) der Zellanschnitte und Quantifikation der perisomatisch verlaufenden Afferenzen.
- Ergebnisausgabe.

Hierbei wurden nach der Detektion der Interneurone die Markierungen der Zellanschnitte um 1  $\mu\text{m}$  erweitert und diesen Bereichen die Pixelflächen perisomatisch verlaufender Projektionsfasern bestimmt (Abb. 20). Dabei wurde deren Faserfläche oberhalb eines festen Helligkeitsschwellenwertes ermittelt. Das Ergebnis der Analyse einer Stapelaufnahme wurde wie folgt ausgegeben: Nummer der analysierten Schnittebene, fortlaufende Nummerierung detektierter Zellanschnitte innerhalb der Ebene mit Angabe der Fläche perisomatischer Fasern (in  $\mu\text{m}^2$ ), Fläche des markierten Zellanschnitts (in  $\mu\text{m}^2$ ), x-Koordinate und y-Koordinate des Zellmittelpunktes, Umfang des Zellanschnitts (in  $\mu\text{m}$ ).

Eine weitere Analyse wurde mit Hilfe von Herrn Dr. med. Mischa Uebachs in Igor (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) entwickelt, um zu untersuchen, ob detektierte Zellanschnitte aus unterschiedlichen Schichten einer Z-Stapelaufnahme zu einer identischen Gesamtzelle zusammengefasst werden konnten. Dabei entschieden die Positionen der Zellanschnitte, ob diese zu einer Zelle gehörten. Folgende Kriterien waren Voraussetzung für die Zuordnung zweier Zellanschnitte zu einer Zelle: 1. Die Zellanschnitte mussten in zwei aufeinanderfolgenden Ebenen liegen. 2. Der xy-Abstand zwischen den Mittelpunkten der Zellanschnitte musste kleiner sein als ihr gemittelter Radius. Für jede Zelle konnten somit folgende Parameter erhoben werden: Nummer der Ebene in welcher sich der letzte Zellanschnitt befand, Anzahl der Schnittebenen in denen die Zelle detektiert wurde, Gesamtfaserfläche perisomatisch verlaufender Afferenzen, Gesamtfläche der Zellanschnitte, x- und y-Koordinate des letzten Anschnittes, Zelloberfläche. Aus der Fläche der perisomatisch verlaufenden Afferenzen pro Zellumfang konnte somit angenähert werden, wie viele putative Kontaktstellen zwischen den Interneuronen und den Afferenzen existierten.

## 2.9 Statistik

Die Datenauswertung erfolgte mit Prism<sup>®</sup> (GraphPad). Die statistische Auswertung der Verteilung septaler Projektionsfasern in hippocampalen Arealen und Laminae erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen und dem Newman-Keuls Post-Test. Dieses Testverfahren wurde gewählt, da es sich um gepaarte Wertesätze handelte, wobei eine Normalverteilung der Werte angenommen wurde. Die statistische Auswertung der Zellanschnittsflächen, bzw. Oberflächen detektierter hippocampaler Interneurone, sowie der Anzahl putativer Kontaktstellen zwischen hippocampalen Interneuronen und GABAergen Afferenzen erfolgte mit der einfaktoriellen Varianzanalyse und dem Bonferroni's Post-Test. Da es sich hierbei nicht um gepaarte Wertesätze handelte, wurde das Verfahren ohne Messwiederholungen verwendet. Das statistische Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgesetzt (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). Alle Ergebnisse wurden mit dem Mittelwert und dessen Standardfehler angegeben.

### 3. Ergebnisse

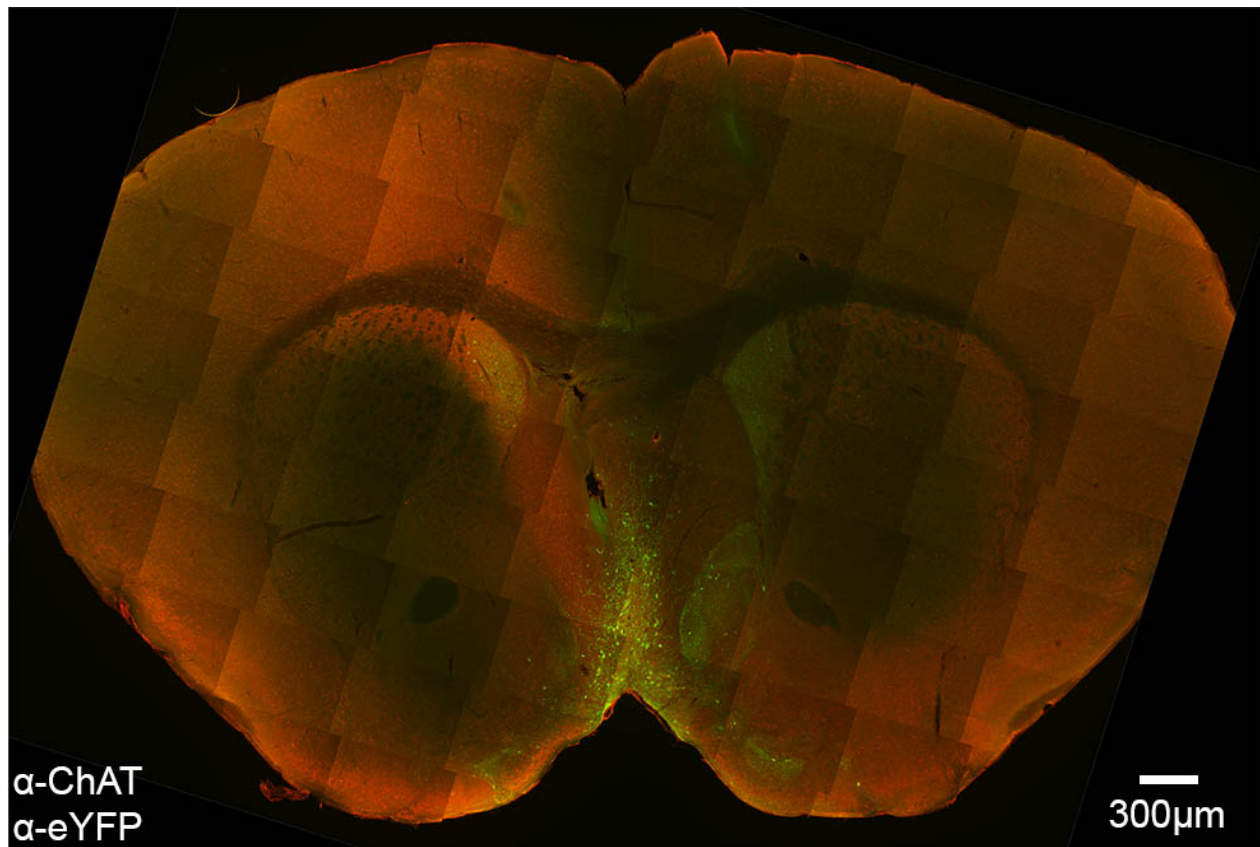
#### 3.1 ChR2-eYFP Proteinexpression in transduzierten cholinergen, bzw. GABAergen Projektionsneuronen des MSDB

3.1.1 Diffusion des Virus. Es sollte untersucht werden, wie weit das rAAV nach Injektion in das MSDB in das Gewebe diffundiert-, und in welchen Arealen des ZNS es zur zellulären Expression der Proteine ChR2-eYFP gekommen war. Dazu erfolgte eine immunhistochemische anti-eYFP Färbung von sequentiellen, coronaren Hirnschnitten der transduzierten Tiere. Somit wurden Zellen markiert, welche durch die virale Transduktion die Proteine ChR2-eYFP exprimierten. Von diesen Präparaten wurden Aufnahmen mittels eines Fluoreszenzmikroskops angefertigt, welche anschließend auf Fluoreszenz der eYFP<sup>+</sup> Neurone und ihrer Fortsätze untersucht wurden.

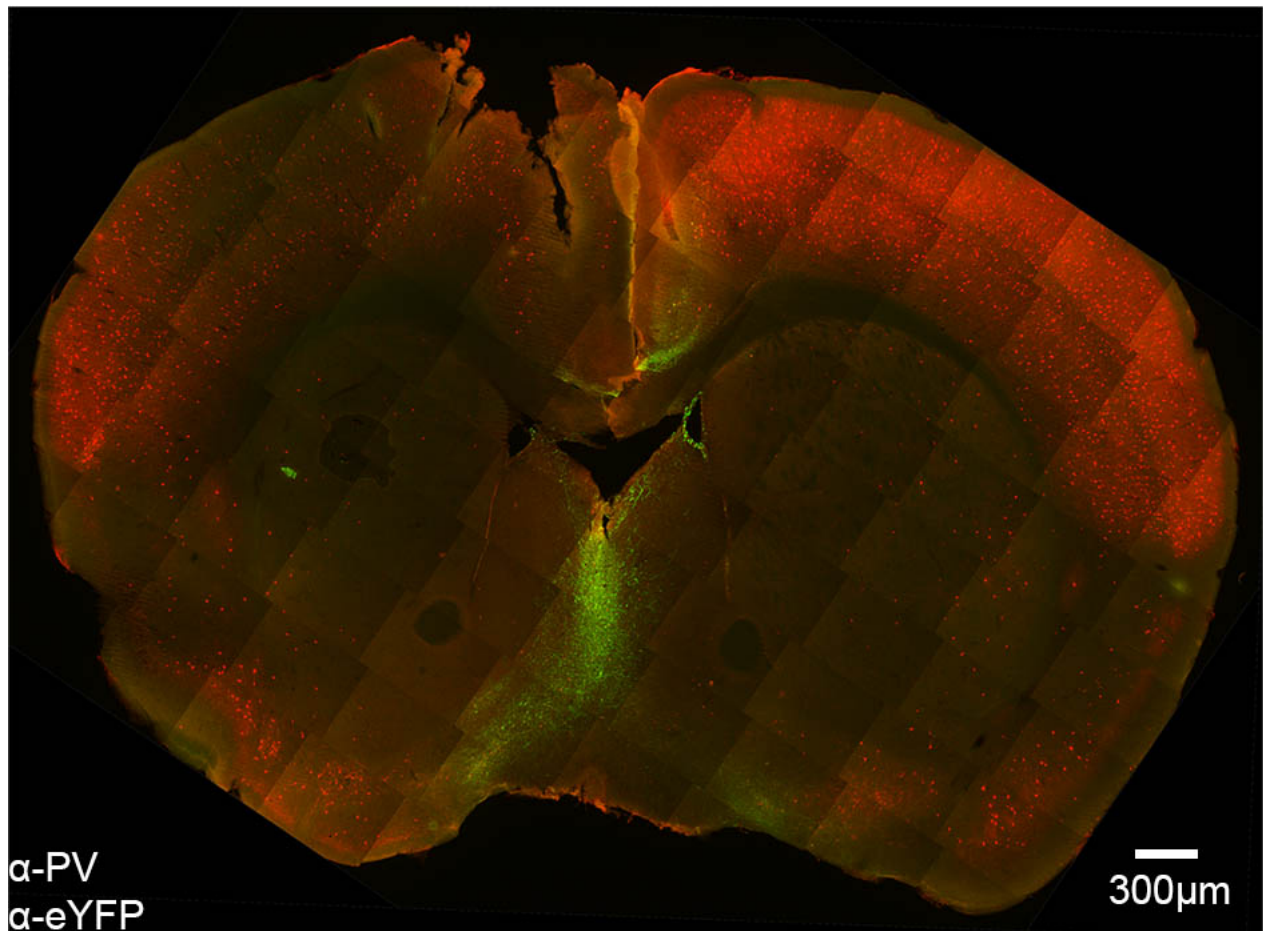
In Tieren, in denen cholinerge Neurone das Enzym Cre-Recombinase exprimierten, war die ChR2-eYFP Expression in allen Bereichen des MSDB über eine rostro-caudalen Distanz von mind. 1,05 mm (Bregma +0,4 mm bis +1,55 mm, N = 1) detektierbar (Abb. 6 und 8). Zudem ließen sich einseitig eYFP<sup>+</sup> Neurone in der Schale des Nucleus accumbens und im periventrikulären Bereich nachweisen.

In Tieren, in denen die PV<sup>+</sup> Subpopulation GABAerger Neurone die Cre-Recombinase exprimierte, war die ChR2-eYFP Expression in allen Bereichen des MSDB über eine rostro-caudalen Distanz von mind. 1,50 mm (Bregma +0,2 mm bis +1,7 mm, N = 1) detektierbar (Abb. 7 und 8). Zudem wurden in einigen Präparaten eYFP<sup>+</sup> Neurone im lateralen Septum, bzw. im lateralen, präoptischen Bereich nachgewiesen.

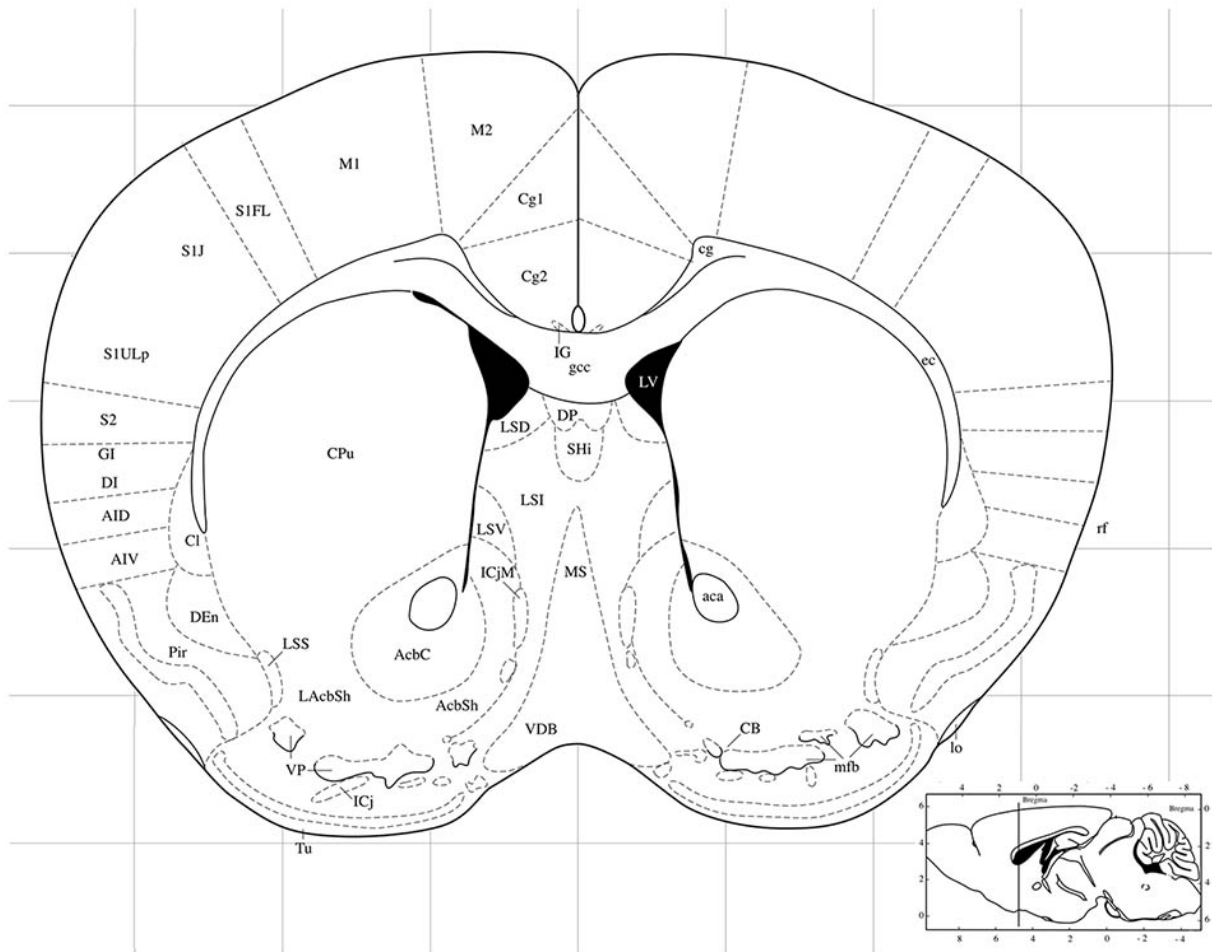
Somit konnte für die transduzierten Mäuse beider Mauslinien nachgewiesen werden, dass es in allen Bereichen des MSDB zur Expression von ChR2-eYFP in Cre exprimierenden Zellen gekommen war.



**Abb. 6: Diffusion des rAAV nach dessen Injektion in das MSDB einer Maus, welche das Enzym Cre-Recombinase in cholinergen Neuronen exprimiert.** Das rAAV wurde den Mäusen 4 Wochen nach Geburt in einer stereotaktischen Operation injiziert und trug die Gene für die Proteine ChR2-eYFP. Nach Diffusion des Virus und dessen zellulärer Aufnahme kam es zur Expression von ChR2-eYFP in cholinergen Neuronen des MSDB. Dargestellt ist eine zusammengesetzte Aufnahme eines coronaren Hirnschnitts (Bregma +1,0 mm), welche eine immunhistochemische Antikörperfärbung gegen das Enzym Cholin-Acetyltransferase (anti-ChAT) und das fluoreszierende Protein eYFP (anti-eYFP) zeigt. Dabei markiert die anti-ChAT Färbung cholinerge Neurone (rot) und die anti-eYFP Färbung transduzierte Neurone, welche das Protein ChR2-eYFP exprimieren (grün). Zu erkennen ist, dass es zu einer deutlichen Expression von ChR2-eYFP in allen Anteilen des MSDB gekommen ist (s. anatomisches Schema in Abb. 8). Zudem zeigte sich einseitig die Proteinexpression in der Schale des Nucleus accumbens und im periventrikulären Bereich.



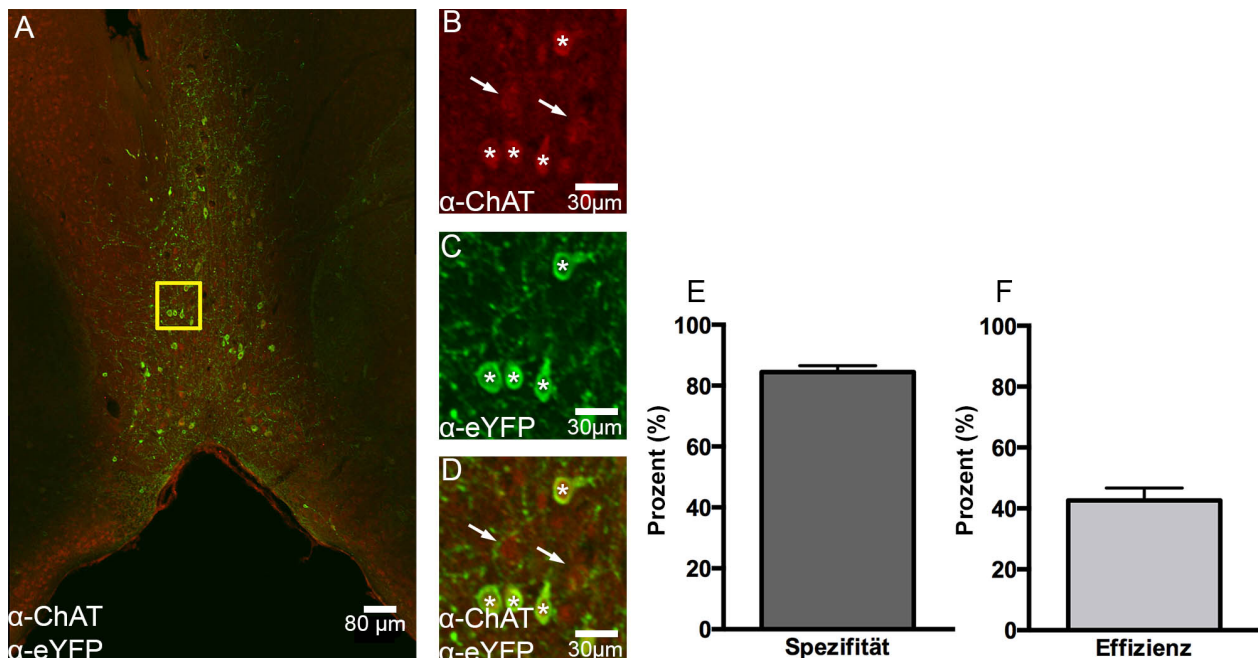
**Abb. 7: Diffusion des rAAV nach dessen Injektion in das MSDB einer Maus, welche das Enzym Cre-Recombinase in PV<sup>+</sup> Neuronen exprimiert.** Das rAAV wurde den Mäusen 4 Wochen nach Geburt in einer stereotaktischen Operation injiziert und trug die Gene für die Proteine ChR2-eYFP. Nach Diffusion des Virus und dessen zellulärer Aufnahme kam es zur Expression von ChR2-eYFP in PV<sup>+</sup> Neuronen des MSDB. Dargestellt ist eine zusammengesetzte Aufnahme eines coronaren Hirnschnitts (Bregma +0,5 mm), welche eine immunhistochemische Antikörperfärbung gegen das Protein PV (anti-PV) und das fluoreszierende Protein eYFP (anti-eYFP) zeigt. Dabei markiert die anti-PV Färbung eine Untergruppe GABAerger Neurone (rot) und die anti-eYFP Färbung transduzierte Neurone, welche das Protein ChR2-eYFP exprimieren (grün). Zu erkennen ist eine deutliche Expression von ChR2-eYFP in der MSDB-Region (s. anatomisches Schema in Abb. 8). Zudem zeigte sich einseitig betont eine Expression im lateralen, präoptischen Bereich (in Abb. 8 nicht dargestellt).



**Abb. 8: Schematische Darstellung der anatomischen Strukturen eines coronaren Hirnschnitts auf Höhe des MSDB einer Maus.** Mittig ist das mediale Septum (MS) und ventral davon der vertikale Teil des diagonalen Bands von Broca (VDB) zu erkennen. Die kleine Abbildung rechts unten verdeutlicht die Position des schematischen Hirnschnittes im Maushirn bei Bregma +0,98 mm (modifiziert nach Paxinos und Franklin, 2008).

**3.1.2 Zelltypspezifität und Effektivität der viralen Transduktion.** Im nächsten Schritt wurde die Zelltypspezifität und die Effektivität der viralen Transduktion Cre exprimierender Projektionsneurone des MSDB untersucht. Dazu wurden Neurone des MSDB mittels immunhistochemischer Antikörperfärbungen charakterisiert und die ChR2-eYFP Proteinexpression durch die anti-eYFP Färbung detektiert.

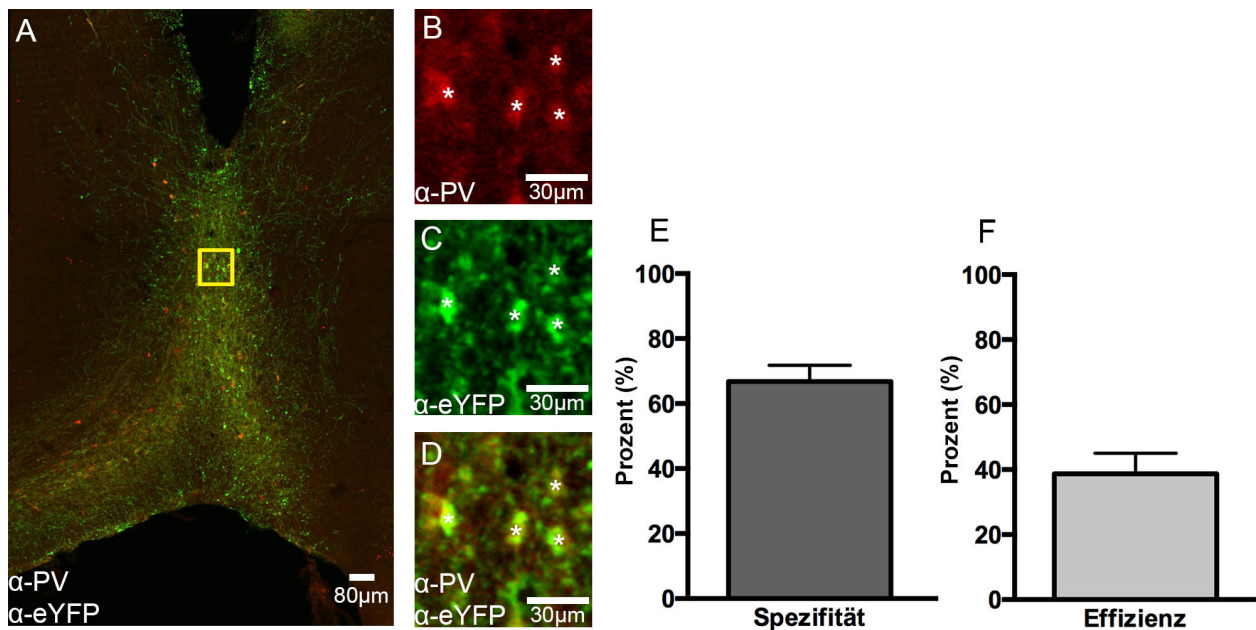
Zur Analyse der Transduktion Cre exprimierender, cholinergischer Neurone wurde eine anti-ChAT/anti-eYFP Färbung septaler Hirnschnitte durchgeführt (Abb. 9 A-D). Nach manueller Quantifikation der fluoreszierenden Zellen ergab sich für die Transduktion eine Spezifität von  $84,4 \pm 2,1$  % und eine Effizienz von  $42,6 \pm 4,0$  % (N = 5 Mäuse mit jew. n = 3 Präparaten, Abb. 9 E, F).



**Abb. 9: Spezifität und Effizienz der Transduktion cholinergischer Neurone des MSDB mittels des rAAV.** **A** Repräsentative konfokale Aufnahme des MSDB des in Abb. 6 dargestellten coronaren Hirnschnittes. Nach Injektion des rAAV in das MSDB der Maus kam es zur selektiven Expression der Proteine ChR2-eYFP in transduzierten cholinergen Projektionsneuronen. Gezeigt wird eine immunhistochemische Antikörperfärbung gegen das Enzym Cholin-Acetyltransferase (anti-ChAT) und das fluoreszierende Protein eYFP (anti-eYFP). **B,C,D** Vergrößerungen des Ausschnittes in A (gelber Rahmen). **B** Die anti-ChAT Färbung markiert cholinerge Neurone. Die Pfeile zeigen Neurone, die zwar ChAT-immunreaktiv sind, aber nicht vom Virus transduziert wurden. **C** Die anti-eYFP Färbung markiert transduzierte Neurone, welche die Proteine ChR2-eYFP exprimieren. **D** Überlagerung der Färbungen aus B und C. Sterne markieren Zellen, die sowohl ChAT<sup>+</sup>, als auch eYFP<sup>+</sup> sind. **E, F** Spezifität und Effizienz der Transduktion ( $84,4 \pm 2,1$  %, bzw.  $42,6 \pm 4,0$  %, N = 5 Mäuse mit jew. n = 3 Präparaten).



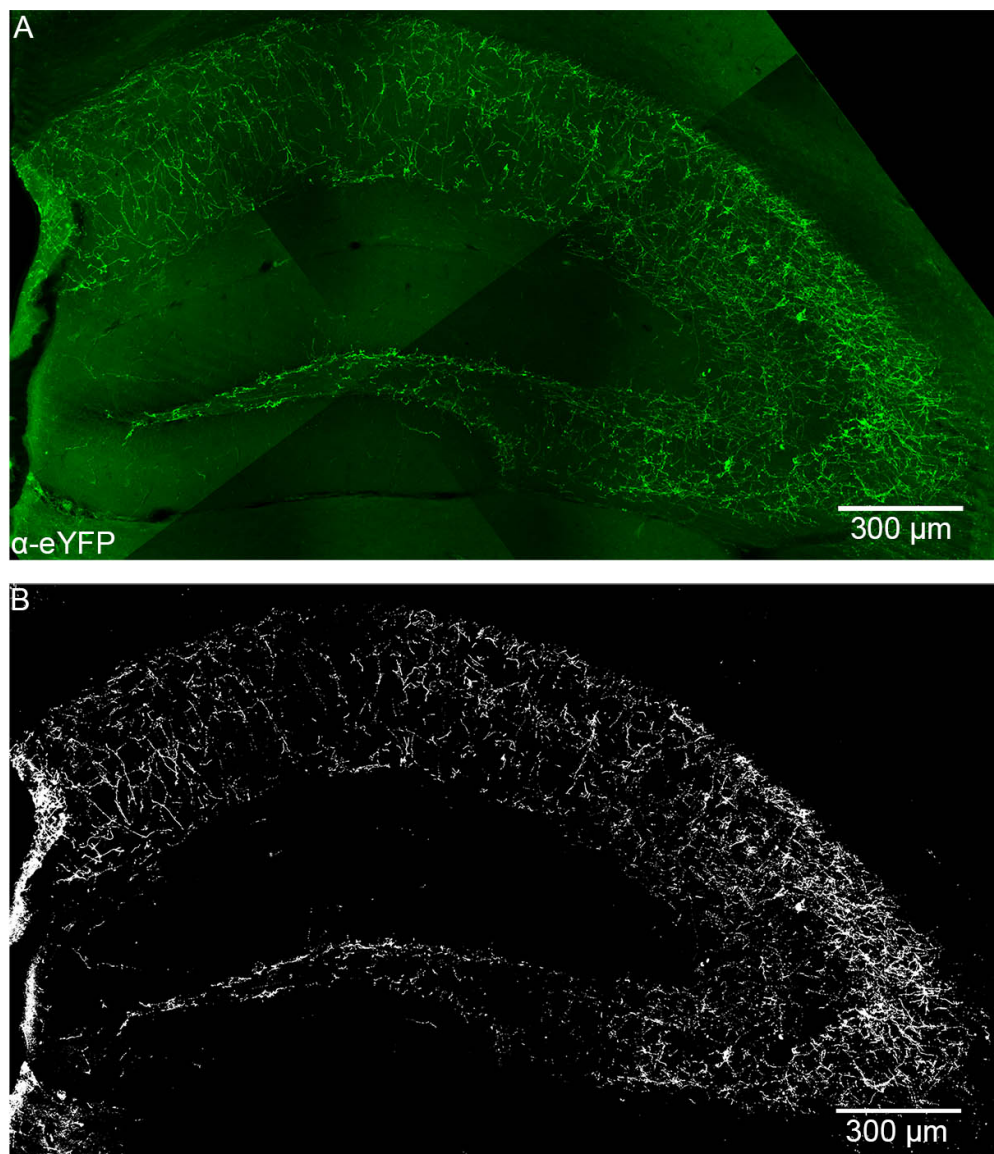
Zur Analyse der Transduktion Cre exprimierender, PV<sup>+</sup> Neurone wurde eine anti-PV/anti-eYFP Färbung septaler Hirnschnitte durchgeführt (Abb. 10 A-D). Nach manueller Quantifikation der fluoreszierenden Zellen ergab sich für die Transduktion eine Spezifität von  $66,7 \pm 5,0$  % und eine Effizienz von  $38,7 \pm 6,3$  % (N = 3 Mäuse mit jew. n = 3 Präparaten, Abb. 10 E, F).



**Abb. 10: Spezifität und Effizienz der Transduktion PV<sup>+</sup> Neurone des MSDB mittels des rAAV.** **A** Repräsentative konfokale Aufnahme des MSDB in einem coronaren Hirnschnitt (Bregma +0,9 mm). Nach Injektion des rAAV in das MSDB der Maus kam es zur selektiven Expression der Proteine Chr2-eYFP in der PV<sup>+</sup> Subpopulation GABAerger Projektionsneurone. Gezeigt wird eine immunhistochemische Antikörperfärbung gegen das Protein Parvalbumin (anti-PV) und das fluoreszierende Protein eYFP (anti-eYFP). **B,C,D** Vergrößerungen des Ausschnittes in A (gelber Rahmen). **B** Die anti-PV Färbung markiert eine Subpopulation GABAerger Neurone. **C** Die anti-eYFP Färbung markiert transduzierte Neurone, welche die Proteine Chr2-eYFP exprimieren. **D** Überlagerung der Färbungen aus B und C. Sterne markieren Zellen, die sowohl PV<sup>+</sup>, als auch eYFP<sup>+</sup> sind. **E**, **F** Spezifität und Effizienz der Transduktion ( $66,7 \pm 5,0$  %, bzw.  $38,7 \pm 6,3$  %, N = 3 Mäuse mit jew. n = 3 Präparaten).

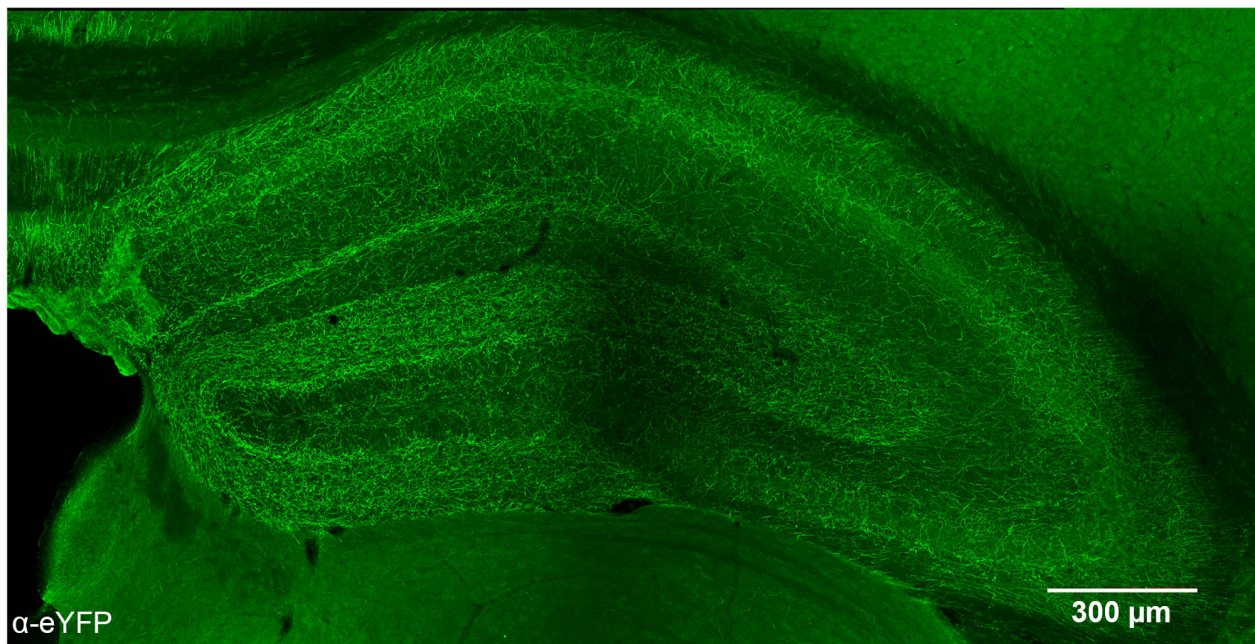
### **3.2 Areal- und laminaspezifische Verteilung septaler Projektionsfasern im Hippocampus**

Es wurde die Verteilung cholinergischer bzw. GABAergen Afferenzen aus dem MSDB im dorsalen und im ventralen Hippocampus untersucht. Dazu wurde in hippocampalen Präparaten der transduzierten Mäuse eine anti-PV/anti-eYFP Doppelfärbung durchgeführt. Nach hippocampaler Arealeinteilung wurde eine individuelle Helligkeitsschwelle zur selektiven Darstellung der eYFP<sup>+</sup> Afferenzen für jedes Präparat festgesetzt (Abb. 27 und Abb. 11). Die Flächen der laminären eYFP<sup>+</sup> Faserpixel wurden automatisiert bestimmt, auf die jeweiligen Laminaflächen normalisiert und somit als Flächenanteile innerhalb der Laminae angegeben. Es erfolgte ein Vergleich der laminären Innervation innerhalb der Areale CA1, CA3 und des Gyrus dentatus. Zudem wurde untersucht, ob septale Afferenzen präferentiell die somato-dendritischen Regionen der Prinzipalzellen eines spezifischen Areals innervieren. Dazu wurden die Flächenanteile der Afferenzen in diesen Regionen innerhalb der Areale addiert, i. e. in den Strata oriens, pyramidale, radiatum und lacunosum-moleculare im CA1 und CA3 Areal, bzw. in den Strata granulosum und moleculare im Gyrus dentatus, und anschließend zwischen den Arealen verglichen. Die Ergebnisse sind für die cholinergen, bzw. GABAergen Afferenzen getrennt für den dorsalen und ventralen Hippocampus dargestellt.



**Abb. 11: Selektive Darstellung von eYFP<sup>+</sup> Projektionsfasern aus dem MSDB im Hippocampus.** **A** Gezeigt ist eine repräsentative konfokale Aufnahme eines coronar angeschnittenen dorsalen Hippocampus (Bregma -2,0 mm). Nach Transduktion Cre exprimierender, PV<sup>+</sup> Projektionsneurone des MSDB mit einem rAAV kam es zur selektiven Expression der Proteine ChR2-eYFP in diesen Zellen und somit zur Fluoreszenzmarkierung ihrer hippocampalen Projektionsfasern. Durch eine immunhistochemische Färbung gegen das fluoreszierende Protein eYFP wurden diese Fasern im Hippocampus selektiv markiert (grün). Die Abbildung wurde aus Einzelaufnahmen zusammengesetzt. **B** Alleinige Darstellung der septalen Projektionsfasern (weiß) unter Ausblendung des Hintergrunds durch Anwendung einer spezifischen Helligkeitsschwelle. Durch die Ausblendung der Hintergrundstrukturen konnten die Projektionsfasern in den Arealen und Laminae anschließend automatisiert quantifiziert werden.

3.2.1 Verteilung cholinergischer Afferenzen im dorsalen Hippocampus. Die statistische Auswertung ließ eine präferentielle Innervation des Stratum moleculare innerhalb des Gyrus dentatus erkennen (20,7 % Flächenanteil im Stratum moleculare vs. 11,8 % im Stratum granulosum, bzw. 5,4% im Hilus,  $*p < 0,05$ , Abb. 12, Tab. 1, Abb. 13 C). Überraschend war hierbei die geringe Afferenzdichte im Hilus, ein Areal mit vielen verschiedenen exzitatorischen und inhibitorischen Interneurontypen. Innerhalb des CA3 Areals fand sich eine präferentielle Innervation des Stratum lacunosum-moleculare (26,0 % Flächenanteil im Stratum lacunosum-moleculare vs. 15,3 % im Stratum oriens, 13,4 % im Stratum pyramidale, bzw. 9,1 % im Stratum radiatum,  $*p < 0,05$ , Abb. 13 B). Hingegen ergab die Analyse keine präferentielle laminäre Innervation innerhalb des CA1 Areals ( $p = 0,24$ , Abb. 13 A). Es wurde nachgewiesen, dass die cholinergen Projektionsfasern die somato-dendritischen Regionen der Prinzipalzellen aller Areale innervieren und dabei keine Arealpräferenz aufweisen ( $p = 0,18$ , Abb. 13 D).

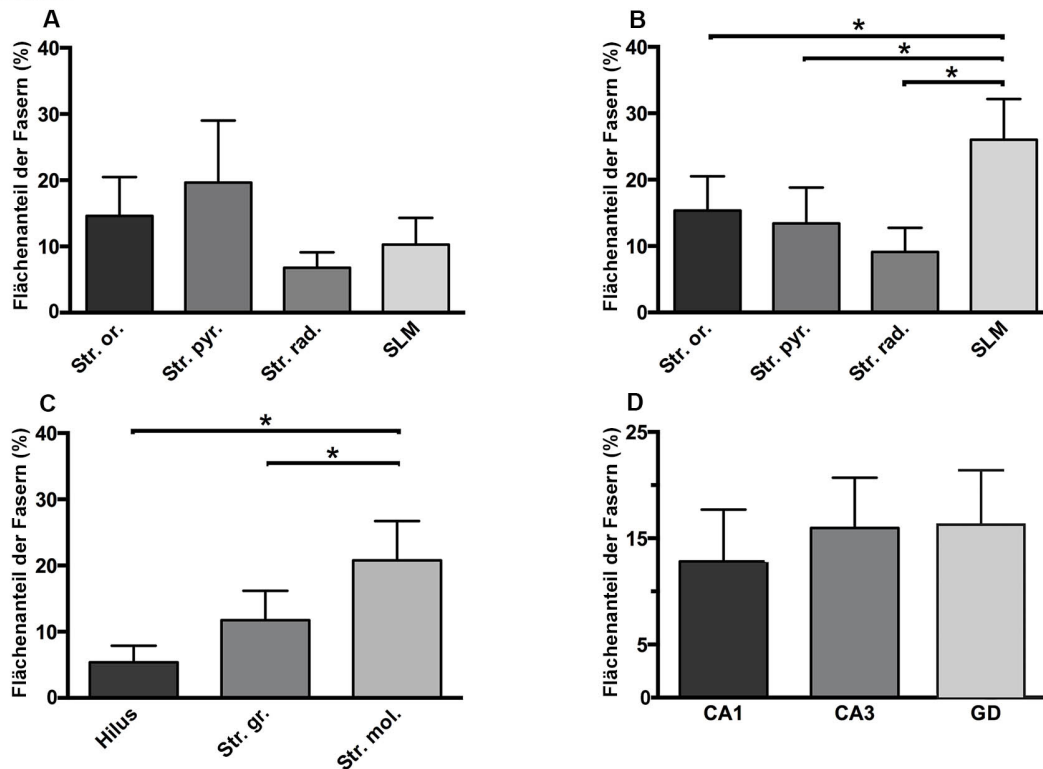


**Abb. 12: Immunhistochemische Färbung cholinergischer Projektionsfasern aus dem MSDB im dorsalen Hippocampus einer viral transduzierten Maus.** Gezeigt ist eine repräsentative konfokale Aufnahme eines coronar angeschnittenen dorsalen Hippocampus (Bregma -2,0 mm). Nach viraler Transduktion Cre exprimierender, cholinergischer Projektionsneurone des MSDB kam es zur selektiven Expression der Proteine ChR2-eYFP in diesen Zellen und somit zur Fluoreszenzmarkierung ihrer hippocampalen Projektionsfasern. Mittels einer immunhistochemischen anti-eYFP Antikörperfärbung wurden diese Fasern selektiv markiert (grün). Zu erkennen ist die charakteristische Verteilung der cholinergen Projektionen. Die Abbildung wurde aus Einzelaufnahmen zusammengesetzt.

Tab. 1: Anteile cholinergischer Faserflächen an laminären Gesamtflächen des dorsalen Hippocampus

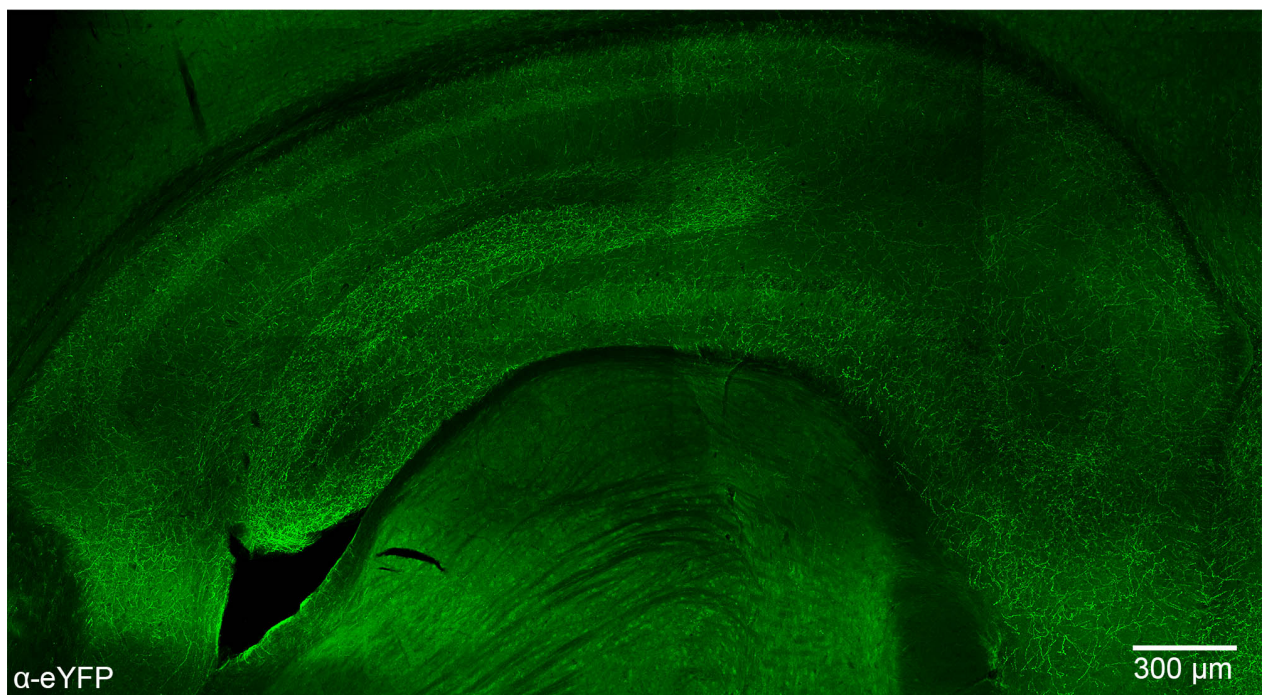
Areal	Lamina	Messwerte	Areal	Lamina	Messwerte	Areal	Lamina	Messwerte
CA1	Str. or.	14,6 ± 5,9	CA3	Str. or.	15,3 ± 5,2	GD	Hilus	5,4 ± 2,5
	Str. pyr.	19,6 ± 9,4		Str. pyr.	13,4 ± 5,4		Str. gr.	11,8 ± 4,4
	Str. rad.	6,8 ± 2,3		Str. rad.	9,1 ± 3,6		Str. mol.	20,7 ± 5,9
	SLM	10,3 ± 4,0		SLM	26,0 ± 6,1			
	Durchschnitt	12,8 ± 4,9		Durchschnitt	16,0 ± 4,7	Str. gr.+Str. mol.	16,3 ± 5,1	

Es wurden N = 3 Mäuse mit n = 3 Hippocampi analysiert. CA, Cornu Ammonis; GD, Gyrus dentatus; Str. or., Stratum oriens; Str. pyr., Stratum pyramidale; Str. rad., Stratum radiatum; SLM, Stratum lacunosum-moleculare; Str. gr., Stratum granulosum; Str. mol., Stratum moleculare.



**Abb. 13: Verteilung cholinergischer Projektionsfasern aus dem MSDB im dorsalen Hippocampus.** Durch eine virale Transduktion kam es zur Expression der Proteine ChR2-eYFP in Cre exprimierenden, cholinergen Projektionsneuronen des MSBD und ihren axonalen Fortsätzen. Somit konnten die eYFP<sup>+</sup> Projektionsfasern im Hippocampus mittels einer immunhistochemischen anti-eYFP Färbung markiert werden. Die Fasern wurden durch Ausblendung des Hintergrunds selektiv zur Darstellung gebracht. Anschließend wurden die laminären Faserflächen bestimmt und auf die jeweilige Gesamtfläche der Lamina normalisiert. **A-C** Anteile der cholinergischen Faserflächen an den laminären Gesamtflächen innerhalb der Areale. **A** CA1 Areal. **B** CA3 Areal. **C** GD Areal. **D** Vergleich der durchschnittlichen Flächenanteile der Fasern innerhalb der somatischen und dendritischen Regionen der Pyramidenzellen zwischen den Arealen. Analysiert wurden N = 3 Mäuse mit n = 3 Hippocampi. Sterne deuten signifikante Unterschiede an (\*p<0,05, einfaktorische Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und Newman-Keuls Post-Test). CA, Cornu Ammonis; GD, Gyrus dentatus; Str. or., Stratum oriens; Str. pyr., Stratum pyramidale; Str. rad., Stratum radiatum; SLM, Stratum lacunosum-moleculare; Str. gr., Stratum granulosum; Str. mol., Stratum moleculare.

3.2.2 Verteilung cholinergischer Afferenzen im ventralen Hippocampus. Auch im ventralen Hippocampus wurde eine präferentielle Innervation des Stratum moleculare innerhalb des Gyrus dentatus mit einem geringeren Flächenanteil der Fasern im Hilus nachgewiesen (22,9 % Flächenanteil im Stratum moleculare vs. 7,1 % im Hilus,  $*p < 0,05$ , Abb. 14, Tab. 2, Abb. 15 C). Im CA1 Areal wurde ein vorrangiger Faserverlauf im Stratum pyramidale beobachtet (25,8 % Flächenanteil der Fasern im Stratum pyramidale vs. 11,8 % im Stratum oriens, 8,6 % im Stratum radiatum, bzw. 9,1 % im Stratum lacunosum-moleculare,  $*p < 0,05$ , Abb. 15 A). Innerhalb des CA3 Areals fand sich hingegen keine präferentielle Innervation ( $p = 0,18$ , Abb. 15 B). Der Arealvergleich zeigte auch hier, dass die cholinergen Projektionsfasern die somato-dendritischen Regionen der Prinzipalzellen von keinem Areal präferentiell innervieren ( $p = 0,14$ , Abb. 15 D).

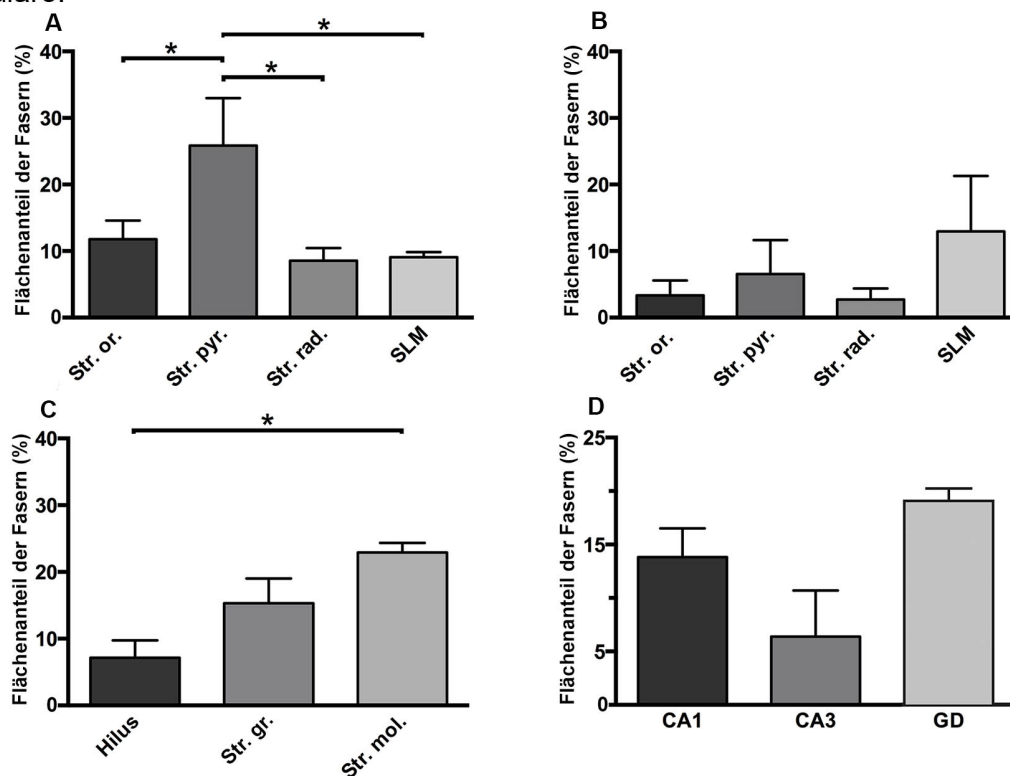


**Abb. 14: Immunhistochemische Färbung cholinergischer Projektionsfasern aus dem MSDB im ventralen Hippocampus einer viral transduzierten Maus.** Gezeigt ist eine repräsentative konfokale Aufnahme eines coronar angeschnittenen ventralen Hippocampus (Bregma -2,8 mm). Nach viraler Transduktion Cre exprimierender, cholinergischer Projektionsneurone des MSDB kam es zur selektiven Expression der Proteine ChR2-eYFP in diesen Zellen und somit zur Fluoreszenzmarkierung ihrer hippocampalen Projektionsfasern. Mittels einer immunhistochemischen anti-eYFP Antikörperfärbung wurden diese Fasern selektiv markiert (grün). Zu erkennen ist die charakteristische Verteilung der cholinergen Projektionen. Die Abbildung wurde aus Einzelaufnahmen zusammengesetzt und zur Darstellung um 90° nach links gedreht.

Tab. 2: Anteile cholinergischer Faserflächen an laminären Gesamtflächen des ventralen Hippocampus

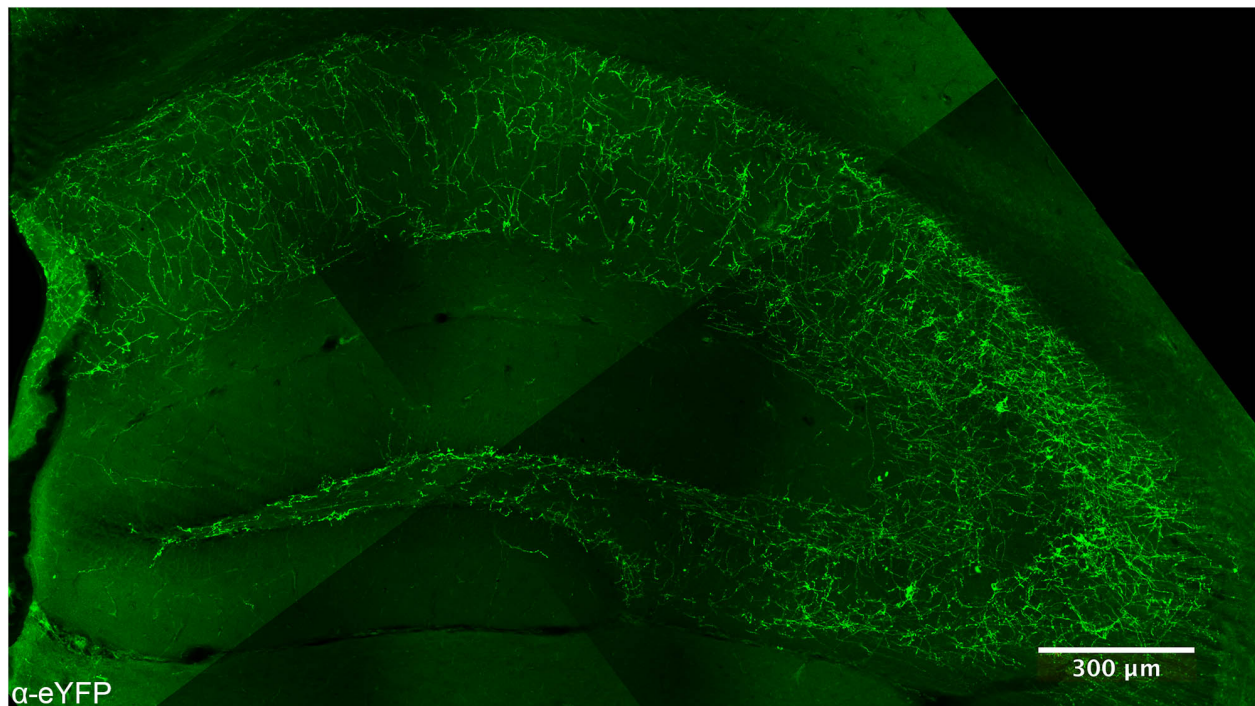
Areal	Lamina	Messwerte	Areal	Lamina	Messwerte	Areal	Lamina	Messwerte
CA1	Str. or.	11,8 ± 2,8	CA3	Str. or.	3,3 ± 2,2	GD	Hilus	7,1 ± 2,6
	Str. pyr.	25,8 ± 7,2		Str. pyr.	6,5 ± 5,1		Str. gr.	15,3 ± 3,7
	Str. rad.	8,6 ± 1,9		Str. rad.	2,7 ± 1,7		Str. mol.	22,9 ± 1,4
	SLM	9,1 ± 0,8		SLM	13,0 ± 8,3			
	Durchschnitt	13,8 ± 2,7		Durchschnitt	6,4 ± 4,3		Str. gr.+Str. mol.	19,1 ± 1,1

Es wurden N = 3 Mäuse mit n = 3 Hippocampi analysiert. CA, Cornu Ammonis; GD, Gyrus dentatus; Str. or., Stratum oriens; Str. pyr., Stratum pyramidale; Str. rad., Stratum radiatum; SLM, Stratum lacunosum-moleculare; Str. gr., Stratum granulosum; Str. mol., Stratum moleculare.



**Abb. 15: Verteilung cholinergischer Projektionsfasern aus dem MSDB im ventralen Hippocampus.** Durch eine virale Transduktion kam es zur Expression der Proteine ChR2-eYFP in Cre exprimierenden, cholinergen Projektionsneuronen des MSBD und ihren axonalen Fortsätzen. Somit konnten die eYFP<sup>+</sup> Projektionsfasern im Hippocampus mittels einer immunhistochemischen anti-eYFP Färbung markiert werden. Die Fasern wurden durch Ausblendung des Hintergrunds selektiv zur Darstellung gebracht. Anschließend wurden die laminären Faserflächen bestimmt und auf die jeweilige Gesamtfläche der Lamina normalisiert. **A-C** Anteile der cholinergischen Faserflächen an den laminären Gesamtflächen innerhalb der Areale. **A** CA1 Areal. **B** CA3 Areal. **C** GD Areal. **D** Vergleich der durchschnittlichen Flächenanteile der Fasern innerhalb der somatischen und dendritischen Regionen der Pyramidenzellen zwischen den Arealen. Analysiert wurden N = 3 Mäuse mit n = 3 Hippocampi. Sterne deuten signifikante Unterschiede an (\*p<0,05, einfaktorielles Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und Newman-Keuls Post-Test). CA, Cornu Ammonis; GD, Gyrus dentatus; Str. or., Stratum oriens; Str. pyr., Stratum pyramidale; Str. rad., Stratum radiatum; SLM, Stratum lacunosum-moleculare; Str. gr., Stratum granulosum; Str. mol., Stratum moleculare.

3.2.3 Verteilung GABAerger Afferenzen im dorsalen Hippocampus. Es wurde nachgewiesen, dass GABAerge Projektionsfasern innerhalb des Gyrus dentatus präferentiell den Hilus innervieren (3,0 % Flächenanteil der Fasern im Hilus vs. 0,6 % im Stratum moleculare, bzw. 0,7 % im Stratum granulosum,  $***p < 0,001$ , Abb. 16, Tab. 3, Abb. 17 C). Auch innerhalb des CA3 Areals zeigte sich eine präferentielle Innervation der tieferen Laminae, während in den oberflächlichen Schichten nur wenige Fasern detektiert wurden (10,4 % Flächenanteil im Stratum oriens und 8,5 % im Stratum pyramidale vs. 0,6 % im Stratum lacunosum-moleculare,  $*p < 0,05$ , Abb. 17 B). Ein ähnliches Verteilungsmuster fand sich auch innerhalb des CA1 Areals, jedoch ohne eine statistisch signifikante laminäre Präferenz ( $p = 0,08$ , Abb. 17 A). Im Arealvergleich zeigte sich, dass sich die GABAergen Projektionsfasern vorrangig in den somato-dendritischen Regionen der Pyramidenzellen der Areale CA1 und CA3 verteilen (4,5 % Flächenanteil im CA1-, bzw. 5,7 % im CA3 Areal vs. 0,6 % im Gyrus dentatus,  $*p < 0,05$ , Abb. 17 D).



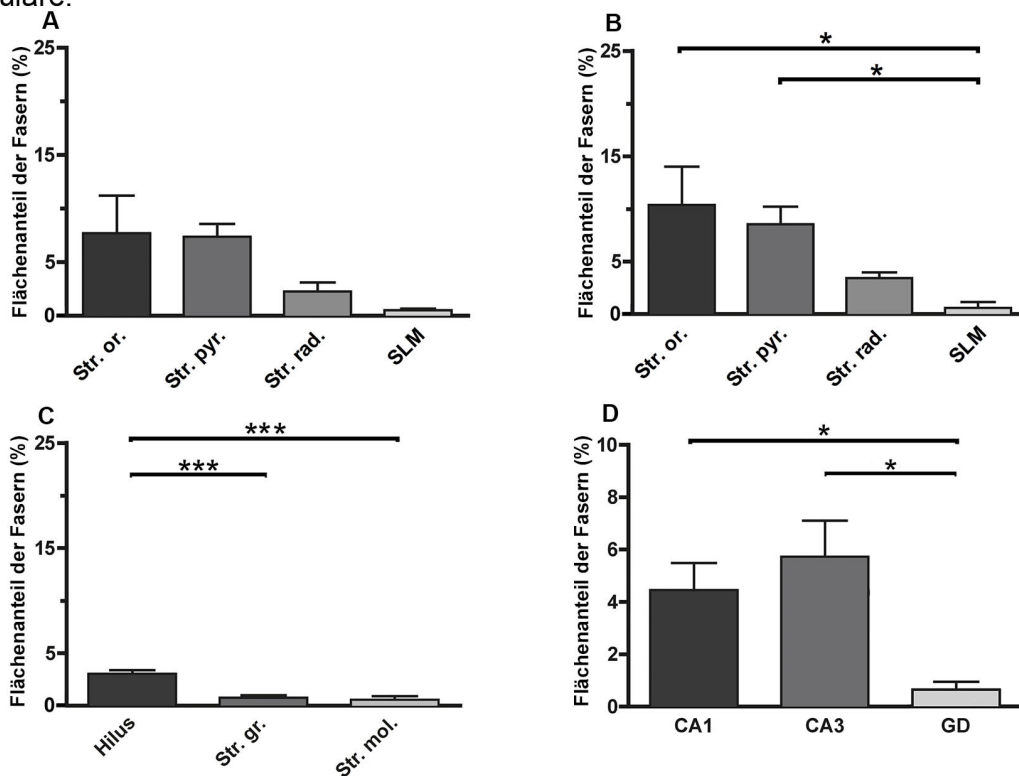
**Abb. 16: Immunhistochemische Färbung GABAerger Projektionsfasern aus dem MSDB im dorsalen Hippocampus einer viral transduzierten Maus.** Gezeigt ist eine repräsentative konfokale Aufnahme eines coronar angeschnittenen dorsalen Hippocampus (Bregma -2,0 mm). Nach viraler Transduktion Cre exprimierender, GABAerger Projektionsneurone der PV<sup>+</sup> Subpopulation des MSDB kam es zur selektiven Expression der Proteine Chr2-eYFP in diesen Zellen und zur Fluoreszenzmarkierung ihrer hippocampalen Projektionsfasern. Mittels einer immunhistochemischen anti-eYFP Antikörperfärbung wurden diese Fasern selektiv markiert (grün). Zu erkennen ist die charakteristische Verteilung der GABAergen Projektionen. Die Abbildung wurde aus Einzelaufnahmen zusammengesetzt.



Tab. 3: Anteile GABAerger Faserflächen an laminären Gesamtflächen des dorsalen Hippocampus

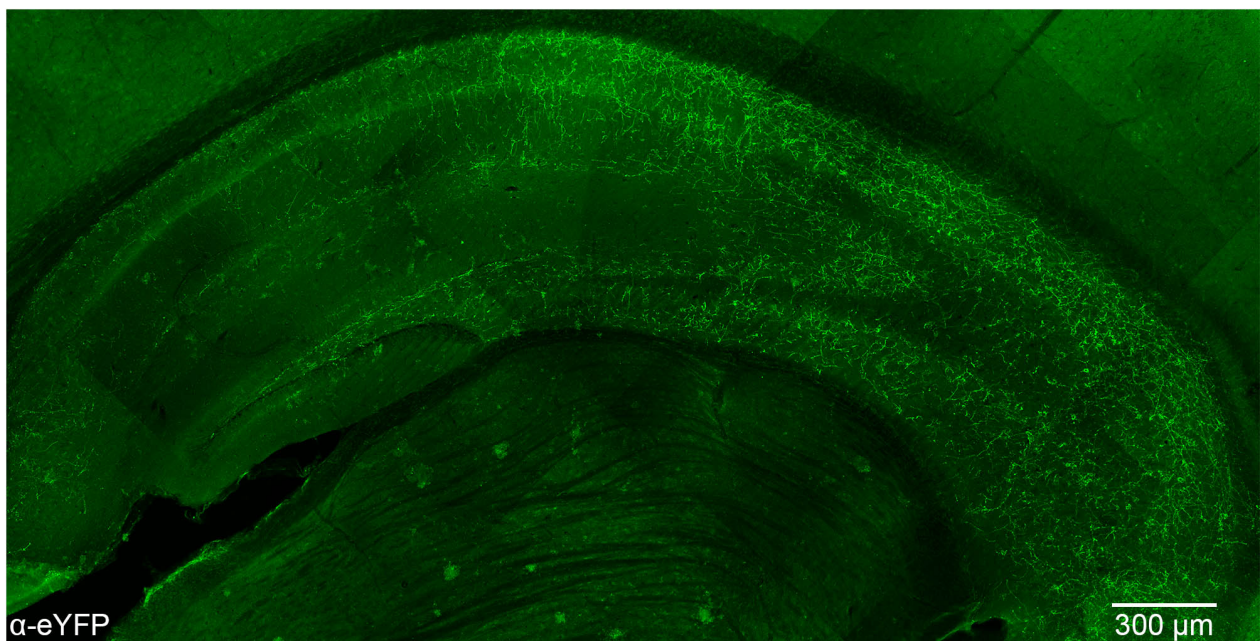
Areal	Lamina	Messwerte	Areal	Lamina	Messwerte	Areal	Lamina	Messwerte
CA1	Str. or.	7,7 ± 3,5	CA3	Str. or.	10,4 ± 3,6	GD	Hilus	3,0 ± 0,3
	Str. pyr.	7,4 ± 1,2		Str. pyr.	8,5 ± 1,7		Str. gr.	0,7 ± 0,2
	Str. rad.	2,3 ± 0,8		Str. rad.	3,4 ± 0,5		Str. mol.	0,6 ± 0,3
	SLM	0,5 ± 0,1		SLM	0,6 ± 0,6			
	Durchschnitt	4,5 ± 1,0		Durchschnitt	5,7 ± 1,4		Str. gr.+Str. mol.	0,6 ± 0,3

Es wurden N = 3 Mäuse mit n = 3 Hippocampi analysiert. CA, Cornu Ammonis; GD, Gyrus dentatus; Str. or., Stratum oriens; Str. pyr., Stratum pyramidale; Str. rad., Stratum radiatum; SLM, Stratum lacunosum-moleculare; Str. gr., Stratum granulosum; Str. mol., Stratum moleculare.



**Abb. 17: Verteilung GABAerger Projektionsfasern aus dem MSDB im dorsalen Hippocampus.** Durch eine virale Transduktion kam es zur Expression der Proteine Chr2-eYFP in Cre exprimierenden, GABAergen Projektionsneuronen der PV<sup>+</sup> Subpopulation des MSBD und ihren axonalen Fortsätzen. Somit konnten die eYFP<sup>+</sup> Projektionsfasern im Hippocampus mittels einer immunhistochemischen anti-eYFP Färbung markiert werden. Die Fasern wurden durch Ausblendung des Hintergrunds selektiv zur Darstellung gebracht. Anschließend wurden die laminären Faserflächen bestimmt und auf die jeweilige Gesamtfläche der Lamina normalisiert. **A-C** Anteile der GABAergen Faserflächen an den laminären Gesamtflächen innerhalb der Areale. **A** CA1 Areal. **B** CA3 Areal. **C** GD Areal. **D** Vergleich der durchschnittlichen Flächenanteile der Fasern innerhalb der somatischen und dendritischen Regionen der Pyramidenzellen zwischen den Arealen. Analysiert wurden N = 3 Mäuse mit n = 3 Hippocampi. Sterne deuten signifikante Unterschiede an (\*p<0,05, \*\*\*p<0,001, einfaktorielles Varianzanalyse mit wiederholten Messungen und Newman-Keuls Post-Test). CA, Cornu Ammonis; GD, Gyrus dentatus; Str. or., Stratum oriens; Str. pyr., Stratum pyramidale; Str. rad., Stratum radiatum; SLM, Stratum lacunosum-moleculare; Str. gr., Stratum granulosum; Str. mol., Stratum moleculare.

3.2.4 Verteilung GABAerger Afferenzen im ventralen Hippocampus. Die statistische Auswertung ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der laminären Faser-  
verteilung ( $p = 0,32$ ,  $p = 0,34$ , bzw.  $p = 0,29$  in den Arealen CA1, CA3, bzw. im Gyrus  
dentatus, Abb. 18, Tab. 4, Abb. 19 A-C). Auch die Faserverteilung innerhalb der somato-  
dendritischen Regionen der Prinzipalzellen unterschied sich nicht zwischen den Arealen  
( $p = 0,62$ , Abb. 19 D).

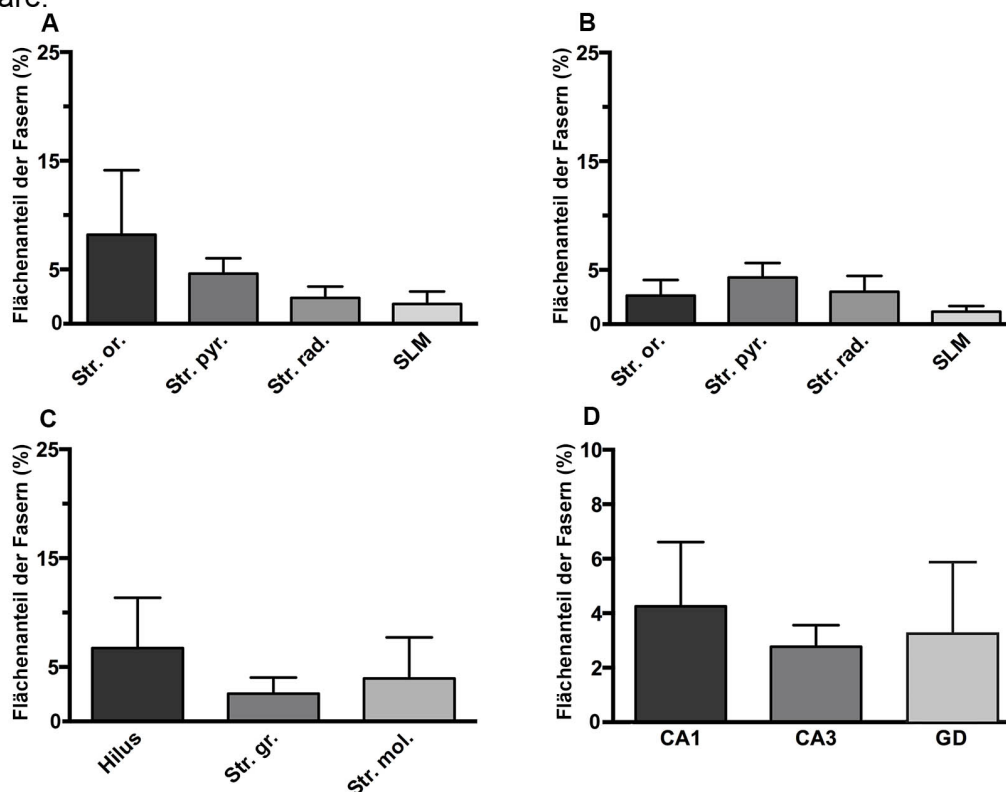


**Abb. 18: Immunhistochemische Färbung GABAerger Projektionsfasern aus dem MSDB im ventralen Hippocampus einer viral transduzierten Maus.** Gezeigt ist eine repräsentative konfokale Aufnahme eines coronar angeschnittenen ventralen Hippocampus (Bregma -2,8 mm). Nach viraler Transduktion Cre exprimierender, GABAerger Projektionsneurone der PV<sup>+</sup> Subpopulation des MSDB kam es zur selektiven Expression der Proteine ChR2-eYFP in diesen Zellen und zur Fluoreszenzmarkierung ihrer hippocampalen Projektionsfasern. Mittels einer immunhistochemischen anti-eYFP Antikörperfärbung wurden diese Fasern selektiv markiert (grün). Zu erkennen ist die charakteristische Verteilung der GABAergen Projektionen. Die Abbildung wurde aus Einzelaufnahmen zusammengesetzt und zur Darstellung um ca. 45° nach links gedreht.

Tab. 4: Anteile GABAerger Faserflächen an laminären Gesamtflächen des ventralen Hippocampus

Areal	Lamina	Messwerte	Areal	Lamina	Messwerte	Areal	Lamina	Messwerte
CA1	Str. or.	8,2 ± 5,9	CA3	Str. or.	2,6 ± 1,4	GD	Hilus	6,7 ± 4,6
	Str. pyr.	4,6 ± 1,4		Str. pyr.	4,3 ± 1,3		Str. gr.	2,5 ± 1,5
	Str. rad.	2,4 ± 1,0		Str. rad.	3,0 ± 1,5		Str. mol.	4,0 ± 3,8
	SLM	1,8 ± 1,1		SLM	1,2 ± 0,5			
	Durchschnitt	4,3 ± 2,4		Durchschnitt	2,8 ± 0,8		Str. gr.+Str. mol.	3,2 ± 2,6

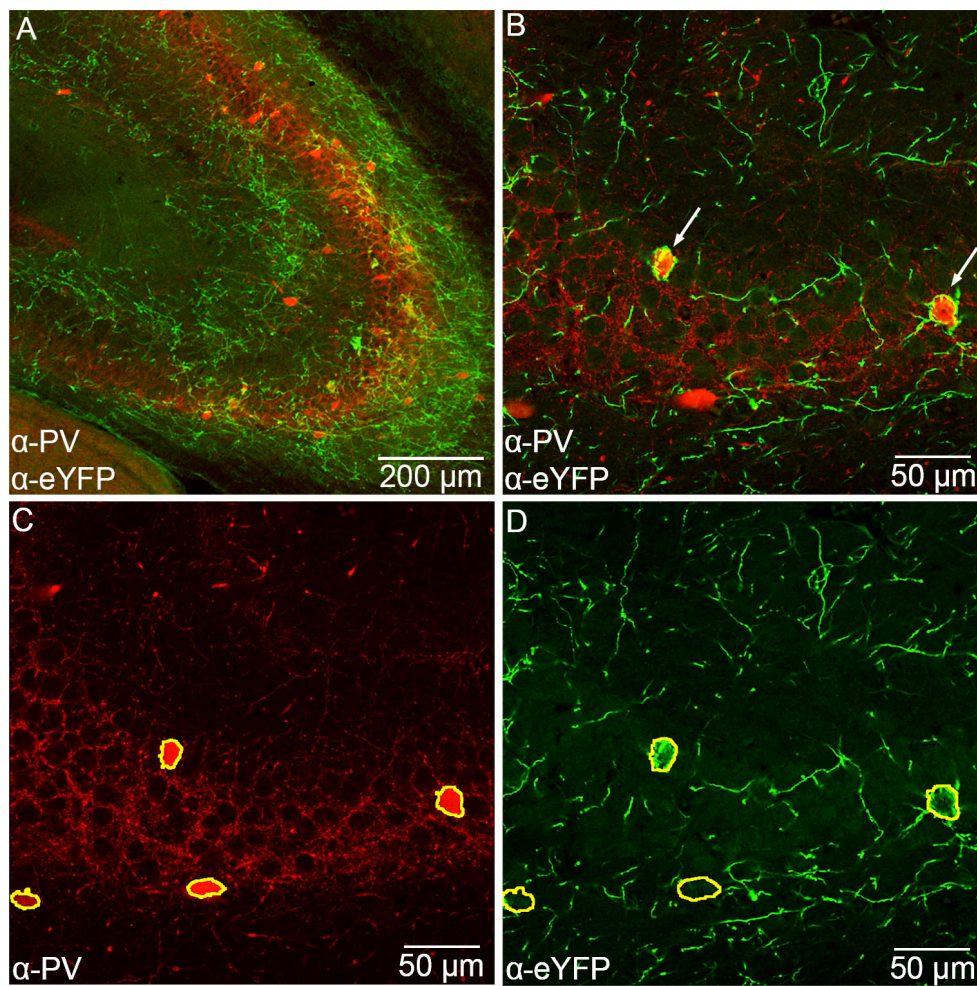
Es wurden N = 3 Mäuse mit n = 3 Hippocampi analysiert. CA, Cornu Ammonis; GD, Gyrus dentatus; Str. or., Stratum oriens; Str. pyr., Stratum pyramidale; Str. rad., Stratum radiatum; SLM, Stratum lacunosum-moleculare; Str. gr., Stratum granulosum; Str. mol., Stratum moleculare.



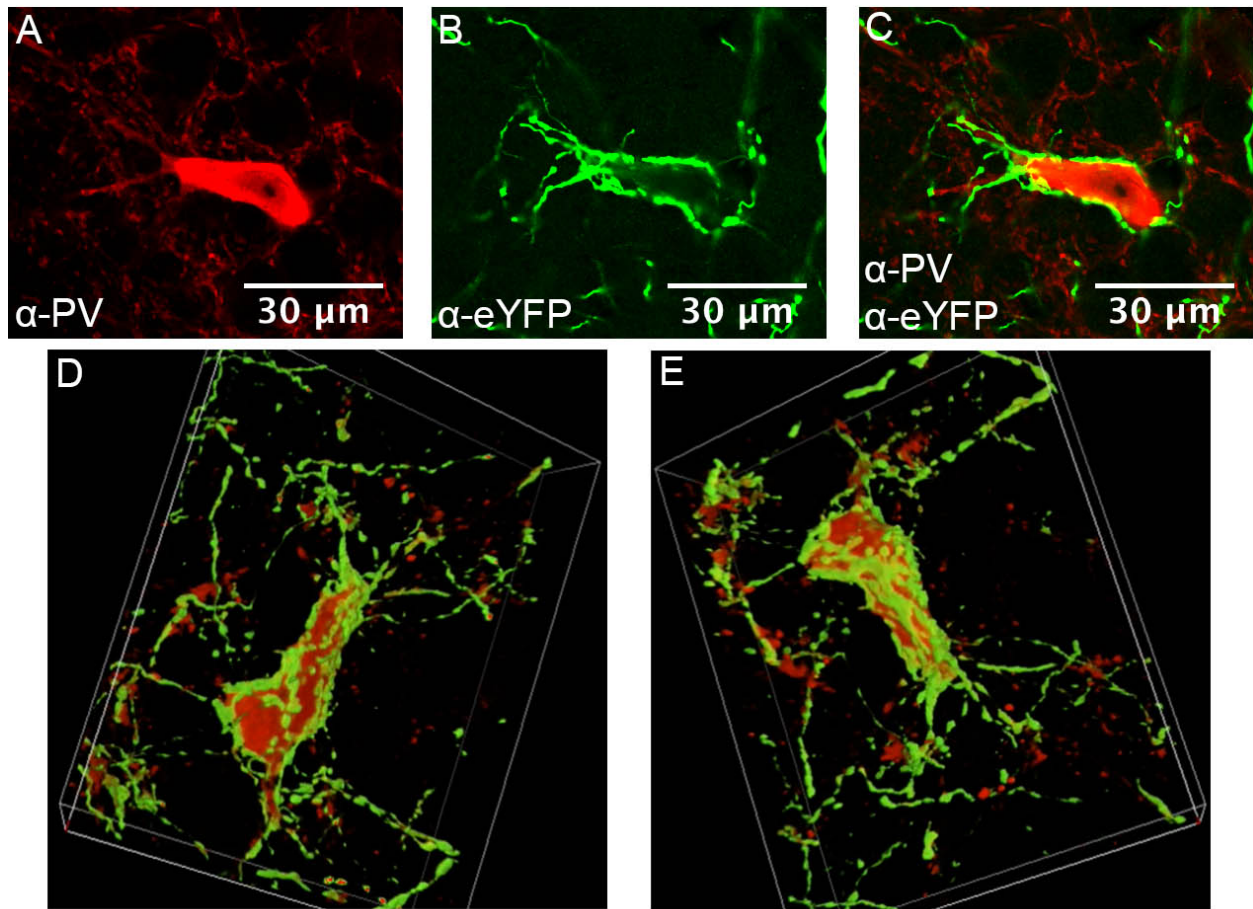
**Abb. 19: Verteilung GABAerger Projektionsfasern aus dem MSDB im ventralen Hippocampus.** Durch eine virale Transduktion kam es zur Expression der Proteine ChR2-eYFP in Cre exprimierenden, GABAergen Projektionsneuronen der PV<sup>+</sup> Subpopulation des MSDB und ihren axonalen Fortsätzen. Somit konnten die eYFP<sup>+</sup> Projektionsfasern im Hippocampus mittels einer immunhistochemischen anti-eYFP Färbung markiert werden. Die Fasern wurden durch Ausblendung des Hintergrunds selektiv zur Darstellung gebracht. Anschließend wurden die laminären Faserflächen bestimmt und auf die jeweilige Gesamtfläche der Lamina normalisiert. **A-C** Anteile der GABAergen Faserflächen an den laminären Gesamtflächen innerhalb der Areale. **A** CA1 Areal. **B** CA3 Areal. **C** GD Areal. **D** Vergleich der durchschnittlichen Flächenanteile der Fasern innerhalb der somatischen und dendritischen Regionen der Pyramidenzellen zwischen den Arealen. Analysiert wurden N = 3 Mäuse mit n = 3 Hippocampi. CA, Cornu Ammonis; GD, Gyrus dentatus; Str. or., Stratum oriens; Str. pyr., Stratum pyramidale; Str. rad., Stratum radiatum; SLM, Stratum lacunosum-moleculare; Str. gr., Stratum granulosum; Str. mol., Stratum moleculare.

### **3.3 Putative Kontaktstellen zwischen hippocampalen GABAergen Interneuronen und GABAergen Afferenzen aus dem MSDB**

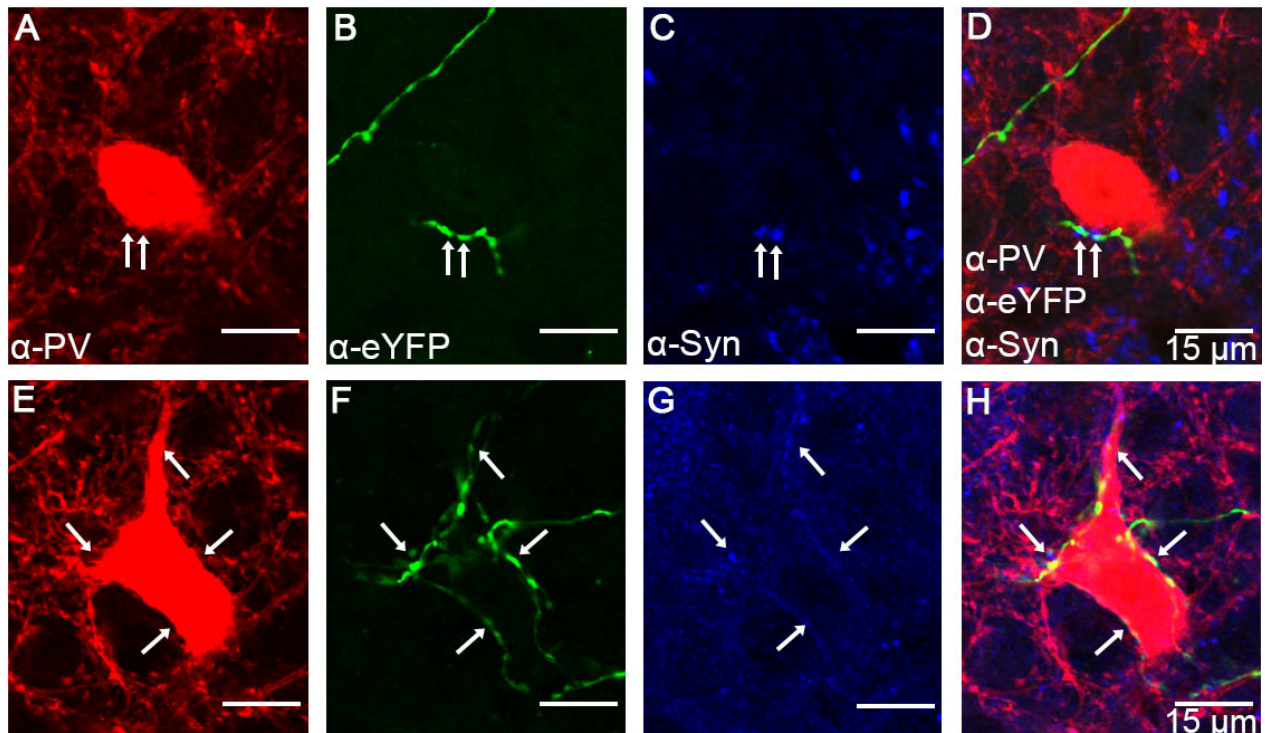
Es ist bekannt, dass GABAerge Projektionsfasern des MSDB spezifisch inhibitorische Interneurone im Hippocampus kontaktieren. Es sollte mittels der genetischen Markierung GABAerger Afferenzen und hippocampaler Doppelfärbungen untersucht werden, ob hierbei Interneurone eines bestimmten hippocampalen Areals präferentiell innerviert werden. Dazu wurden in hippocampalen Hirnschnitten von Mäusen, welche die Proteine ChR2-eYFP spezifisch in der PV<sup>+</sup> Subpopulation GABAerger Projektionsneurone des MSDB exprimieren, anti-PV/anti-eYFP Färbungen angefertigt. Dadurch wurde die PV<sup>+</sup> Subpopulation GABAerger Interneurone, bzw. eYFP<sup>+</sup> markierte Projektionsfasern in den Präparaten markiert. Mittels konfokaler Mikroskopie wurden in den Arealen CA1 und CA3 Schichtaufnahmen des Stratum pyramidale und der angrenzenden Strata oriens und radiatum, bzw. im Gyrus dentatus des Stratum granulosum und des angrenzenden Stratum moleculare, bzw. des Hilus angefertigt. In diesen Schichtaufnahmen wurden die optischen Anschnitte der GABAergen Interneurone semiautomatisch markiert (n = 192/213/124 Interneurone in den Arealen CA1/CA3, bzw. im Gyrus dentatus in N = 3 Mäusen mit jew. n = 3 Hirnschnitten, Abb. 20). Zudem wurden an den Interneuronen perisomatisch verlaufende, GABAerge Afferenzen detektiert und deren Faserfläche bestimmt. Dabei wurden ausschließlich Afferenzen mit einem maximalen Abstand von 1 µm zum Zellsoma quantifiziert. Es wurde beobachtet, dass die Afferenzen in unmittelbarer Nähe zu den Zellsomata vielfach axonale Varikositäten aufwiesen (Abb. 21). Dies wies auf die Existenz von somatischen Kontaktstellen zwischen den GABAergen Interneuronen und den GABAergen Afferenzen hin. Durch den fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Synapsen an diesen Varikositäten mittels der anti-Synapsin 1,2 Färbung konnte die Existenz der Kontaktstellen angenommen werden (Abb. 22). Da allerdings ein eindeutiger, elektronenmikroskopischer Nachweis der Synapsen nicht erfolgte, wurden die Kontaktstellen als putativ bezeichnet.



**Abb. 20: Detektion putativer Kontaktstellen zwischen hippocampalen GABAergen Interneuronen und GABAergen Afferenzen aus dem MSDB.** **A** Konfokale Aufnahme des hippocampalen CA3 Areals einer Maus, welche nach viraler Transduktion die Proteine Chr2-eYFP spezifisch in PV<sup>+</sup> Projektionsneuronen des MSDB exprimierte. Gezeigt wird eine immunhistochemische anti-PV/anti-eYFP Färbung, welche die PV<sup>+</sup> Subpopulation GABAerger Interneurone (rot), bzw. eYFP<sup>+</sup> Afferenzen (grün) markiert. **B,C,D** Hochauflösende, konfokale Aufnahmen des Zellbands und angrenzender Strukturen des in A gezeigten Hippocampus. Gegeben durch die hohe Tiefenauflösung befanden sich die abgebildeten Strukturen exakt in einer Ebene (Schichtdicke 1  $\mu$ m). **B** Zu erkennen sind GABAerge Afferenzen in direktem Kontakt zum Soma der Interneurone (Pfeile). Zur Analyse der Kontaktstellen wurden die Interneurone zunächst detektiert (**C**). Die Zellsomata wurden dabei semiautomatisch erfasst, hier durch deren gelbe Markierung dargestellt. Die markierten Zellbereiche wurden anschließend um 1  $\mu$ m erweitert und darin die Pixelfläche der eYFP<sup>+</sup> Projektionsfasern bestimmt (**D**). Die Fläche der Afferenzen innerhalb eines Zellbereichs wurde auf den Umfang des jeweiligen Interneurons normalisiert und damit die Anzahl putativer Kontaktstellen angegeben.

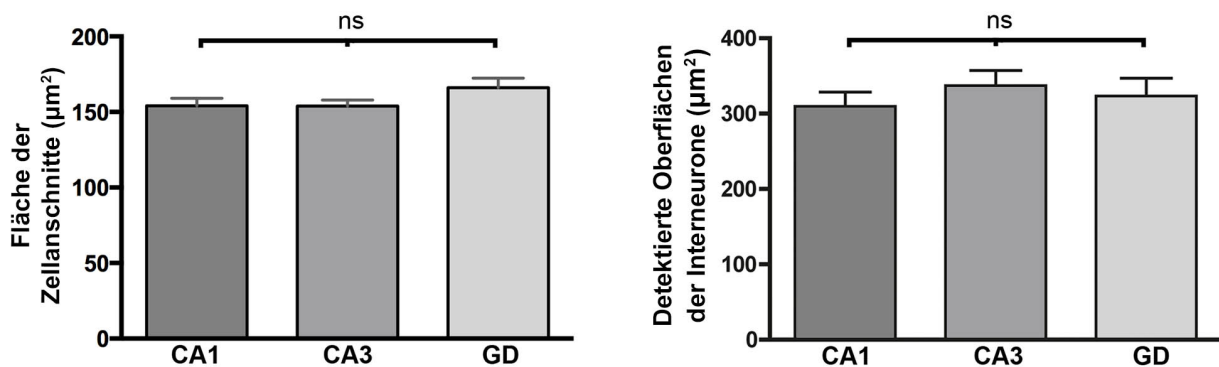


**Abb. 21:** Darstellung putativer Kontaktstellen zwischen einem hippocampalen GABAergen Interneuron und GABAergen Afferenzen aus dem MSDB. **A,B,C** Hochauflösende, konfokale Aufnahmen des hippocampalen CA3 Arealis einer Maus, welche nach viraler Transduktion die Proteine ChR2-eYFP spezifisch in PV<sup>+</sup> Projektionsneuronen des MSDB exprimierte. Gezeigt wird eine immunhistochemische anti-PV/anti-eYFP Färbung, die ein GABAerges Interneuron der PV<sup>+</sup> Subpopulation (**A**), bzw. eYFP<sup>+</sup> Afferenzen (**B**) markiert. Die Überlagerung der beiden Kanäle zeigt die unmittelbare Nähe der Afferenzen zum Soma (**C**). Gegeben durch die hohe Tiefenauflösung befanden sich die abgebildeten Strukturen exakt in einer Ebene (Schichtdicke 1  $\mu\text{m}$ ). **D, E** Ansichten der 3D-Projektion desselben Interneurons. Zu erkennen sind multiple axonale Varikositäten der Afferenzen am Soma, was die Existenz von Synapsen zwischen dem Interneuron und den Afferenzen sehr wahrscheinlich macht.



**Abb. 22: Nachweis von Kontaktstellen zwischen hippocampalen GABAergen Interneuronen und GABAergen Afferenzen aus dem MSDB mittels einer immunhistochemischen anti-Synapsin 1,2 Färbung.** Hochauflösende, konfokale Aufnahmen des hippocampalen CA3 Areal einer Maus, welche nach viraler Transduktion die Proteine Chr2-eYFP spezifisch in PV<sup>+</sup> Projektionsneuronen des MSDB exprimierte. Dargestellt sind Aufnahmen von zwei coronaren Hirnschnitten, Schichtdicke 1  $\mu$ m. Gezeigt wird eine anti-PV/anti-eYFP/anti-Syn-Färbung, die zwei GABAerge Interneurone der PV<sup>+</sup> Subpopulation (**A**, **E**), GABAerge Afferenzen aus dem MSDB (**B**, **F**), bzw. Synapsen (**C**, **G**) markiert. **D** und **H** zeigen die Überlagerung der Färbungen. Erkennbar ist, dass an den axonalen Varikositäten der Afferenzen am Soma der Interneurone Synapsen nachgewiesen werden können (Pfeile).

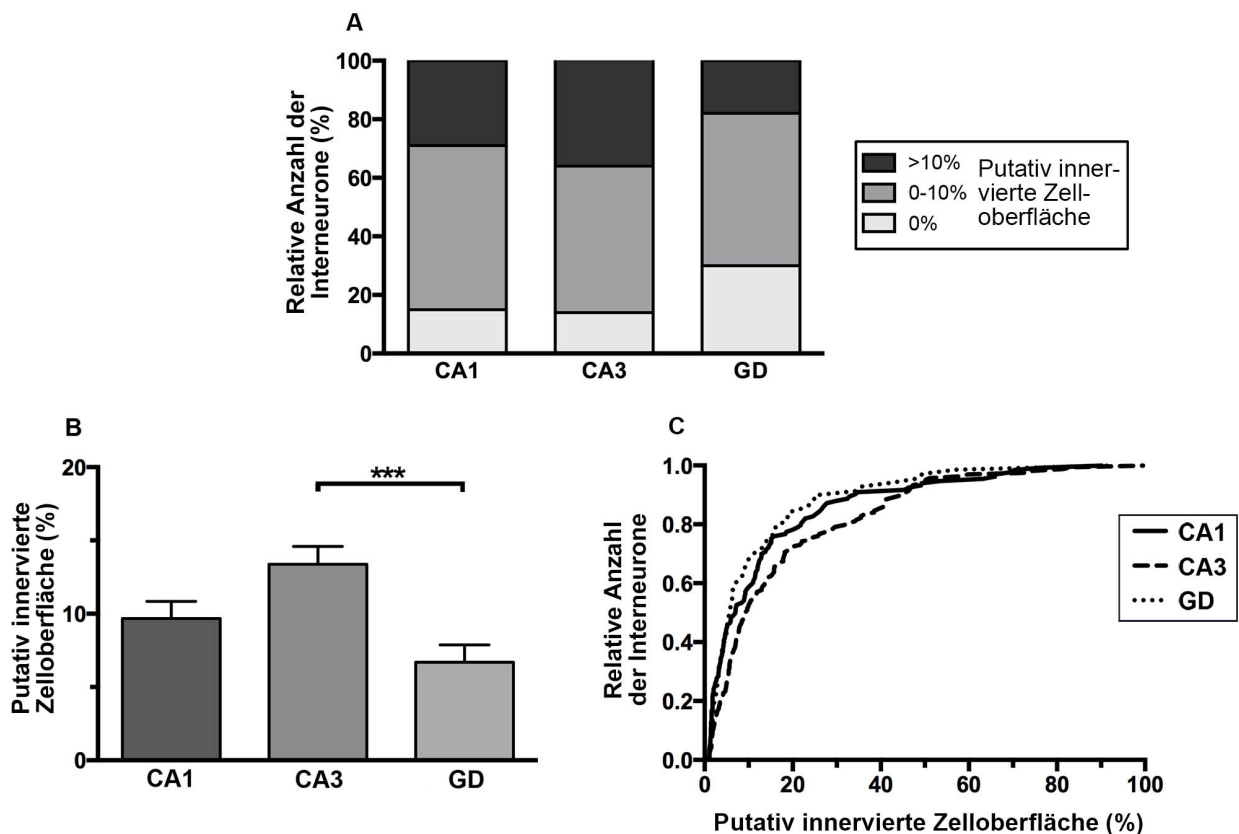
**3.3.1 Größe der Zellanschnitte und der Zelloberflächen detektierter hippocampaler Interneurone.** Die durchschnittlichen Anschnittsflächen der detektierten Interneurone wurden bestimmt und zwischen den Arealen verglichen (Abb. 23). Hierbei wurde festgestellt, dass sich diese nicht zwischen den Arealen unterschieden ( $154 \mu\text{m}^2$ ,  $154 \mu\text{m}^2$ , bzw.  $166 \mu\text{m}^2$  in den Arealen CA1, CA3, bzw. im Gyrus dentatus,  $p = 0,16$ ). Zudem wurde aus den Umfängen der Zellanschnitte die Größe der detektierten zellulären Oberflächen ermittelt. Es zeigte sich, dass von den hippocampalen Interneuronen in den drei Arealen ähnlich große Zelloberflächen detektiert wurden ( $310 \mu\text{m}^2$ ,  $337 \mu\text{m}^2$ , bzw.  $324 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,6$ ).



**Abb. 23: Anschnittsflächen und Zelloberflächen detektierter hippocampaler Interneurone.** In coronaren Hirnschnitten wurde die  $PV^+$  Subpopulation GABAerger Interneurone im Hippocampus mittels einer immunhistochemischen anti-PV Färbung markiert. Die Anschnitte dieser Neurone wurden in Schichtaufnahmen der Präparate semiautomatisch detektiert. **A** Durchschnittliche Fläche der detektierten Zellanschnitte. Diese unterschieden sich nicht zwischen den hippocampalen Arealen (CA1  $154 \pm 4 \mu\text{m}^2$ , CA3  $154 \pm 5 \mu\text{m}^2$ , GD  $166 \pm 4 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,16$ , einfaktorielle Varianzanalyse). **B** Größe der detektierten zellulären Oberflächen, welche aus den Umfängen der Einzelanschnitte eines Interneurons berechnet wurden. Auch diese differierten nicht zwischen den Arealen (CA1  $310 \pm 19 \mu\text{m}^2$ , CA3  $337 \pm 20 \mu\text{m}^2$ , GD  $324 \pm 24 \mu\text{m}^2$ ,  $p = 0,6$ , einfaktorielle Varianzanalyse). Detektiert wurden  $n = 192$ ,  $213$ , bzw.  $124$  Interneurone in CA1, CA3, bzw. im Gyrus dentatus von  $N = 3$  Mäusen mit jew.  $n = 3$  Präparaten. CA, Cornu Ammonis; GD, Gyrus dentatus.



3.3.2 Putative Kontaktstellen zwischen GABAergen Interneuronen und GABAergen Afferenzen. Durch die Detektion der Interneurone und der perisomatisch verlaufenden GABAergen Afferenzen konnte bestimmt werden, welcher Anteil der detektierten Interneurone in den hippocampalen Arealen putative Kontaktstellen mit diesen Projektionsfasern bildeten. Hierbei wurde festgestellt, dass die Mehrheit der GABAergen Interneurone aller Areale perisomatische Projektionsfasern auswiesen und mit diesen putative Kontaktstellen bildeten (85 %, 86 %, bzw. 70 % der Interneurone in den Arealen CA1, CA3, bzw. im Gyrus dentatus, Abb. 24 A). Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die eYFP<sup>+</sup> Afferenzen vermehrt Kontaktstellen mit Interneuronen eines spezifischen hippocampalen Areals bilden. Dazu wurde die Anzahl putativer Kontaktstellen angenähert aus dem Anteil der Zelloberfläche der Interneurone, der in direktem Kontakt mit den Afferenzen war. Dieser wurde aus der Fläche perisomatisch verlaufender Afferenzen pro Somaumfang der Zelle berechnet. Die Analysen zeigten, dass im Durchschnitt 13,4 % der Zelloberfläche von Interneuronen im CA3 Areal in Kontakt mit Afferenzen war, während dies im CA1 Areal 9,7 %, und im Gyrus dentatus 6,7 % der respektiven Zelloberflächen waren (Abb. 24 B). Aus diesen Werten konnte auf die Anzahl putativer Kontaktstellen geschlossen werden, welche sich zwischen den Arealen signifikant unterschied (\*\*p<0,001). Interneurone im CA3 Areal bildeten hierbei signifikant mehr Kontaktstellen als Interneurone im Gyrus dentatus (\*\*p<0,001). Die Darstellung der kumulativen Häufigkeit der Anzahl putativer Kontaktstellen an Interneuronen spiegelt dieses Ergebnis ebenfalls wider (Abb. 24 C).



**Abb. 24: Putative Kontaktstellen zwischen hippocampalen GABAergen Interneuronen und GABAergen Afferenzen aus dem MSDB.** Zur Analyse der Kontaktstellen wurden zunächst GABAerge Projektionsneurone der PV<sup>+</sup> Subpopulation im MSDB genetisch markiert. Dazu wurden Mäuse, welche das Enzym Cre-Recombinase spezifisch in PV<sup>+</sup> Neuronen exprimierten, mit einem konditionalen Virus transduziert, welcher das Gen für die Proteine ChR2-eYFP trug. Nach Cre abhängiger Expression dieser Proteine in PV<sup>+</sup> Projektionsneuronen des MSDB kam es zur Fluoreszenzmarkierung dieser Zellen und ihrer axonalen Fortsätze. In coronaren Hirnschnitten der transduzierten Mäuse wurden mittels einer immunhistochemischen anti-PV/anti-eYFP Doppel-färbung PV<sup>+</sup> Interneurone bzw. afferente eYFP<sup>+</sup> Projektionsfasern im Hippocampus markiert. Die Interneurone wurden nach Arealen semiautomatisch detektiert und an den Interneuronen perisomatatisch verlaufende Afferenzen quantifiziert. Die Anzahl ihrer Kontaktstellen wurde aus der Fläche der perisomatatisch verlaufenden Afferenzen zur Zelloberfläche ermittelt.

**A** Relative Anzahl detektierter Interneurone unterteilt nach dem Anteil ihrer Zelloberflächen, die putativ Kontaktstellen mit GABAergen Afferenzen bildet. Erkennbar ist, dass die Mehrheit der Interneurone aller Areale Kontaktstellen mit GABAergen Projektionsfasern bildet (85 %, 86 %, 70 % der Interneurone der Areale CA1, CA3, bzw. des GD). **B** Putativ innervierte Zelloberflächen GABAergen Interneurone, bzw. **C** deren kumulative Häufigkeitsdarstellung ab einem Anteil >1 %. Gemessen an der durchschnittlichen, putativ innervierten Zelloberfläche werden Interneurone im CA3 Areal im Vergleich zum GD präferentiell durch GABAerge Projektionsfasern innerviert (CA1 9,7 ± 1,2 %, CA3 13,4 ± 1,2 %, GD 6,7 ± 1,2 %). Untersucht wurden n = 192, 213, bzw. 124 Interneurone in CA1, CA3, bzw. im Gyrus dentatus von N = 3 Mäusen mit jew. n = 3 Präparaten. Sterne deuten signifikante Unterschiede an (\*\*p < 0,001, einfaktorielles Varianzanalyse und Bonferroni's Post-Test). CA, Cornu Ammonis; GD, Gyrus dentatus.

## 4. Diskussion

### 4.1 ChR2-eYFP Proteinexpression in transduzierten cholinergen, bzw. GABAergen Projektionsneuronen des MSDB

4.1.1 Methodische Aspekte. Es wurde die Diffusion des injizierten rAAV im Hirngewebe-, sowie die Spezifität und Effizienz der viralen Transduktion Cre exprimierender Neurone des MSDB untersucht. Die dazu durchgeführten immunhistochemischen Doppelfärbungen septaler Hirnschnitte ermöglichten die Zuordnung von Neuronen zu Neurotransmittersystemen und die Identifikation transduzierter, eYFP<sup>+</sup> Zellen. Zur Spezifitäts- und Effizienzanalyse der Transduktion mussten diese fluoreszenzmarkierten Neurone quantifiziert werden, wobei zunächst eine automatische Zelldetektion entwickelt werden sollte. Jedoch stellte sich heraus, dass die Fluoreszenzintensität der Zellen und des Hintergrundes deutlich variierte, so dass das automatisierte Verfahren trotz Anpassung der Detektionsmethode keine korrekte Zellidentifikation ermöglichte. Entsprechend mussten die gefärbten Neurone manuell detektiert werden, was naturgemäß kein objektives Beurteilungsverfahren darstellt. Jedoch war diese Methode ein reliables Verfahren zur Bewertung der zellulären Fluoreszenz.

4.1.2 Ergebnisse. Mittels der Färbungen gegen das fluoreszierende Protein eYFP konnte gezeigt werden, dass es in allen Bereichen des MSDB zur zellulären Transduktion und genetischen Markierung Cre exprimierender Neurone gekommen war. Die Transduktion war in einigen Fällen jedoch nicht auf Neurone des MSDB begrenzt, da eine eYFP-Expression teilweise auch in der Schale des Nucleus accumbens, im periventriculären- und im präoptischen Bereich nachgewiesen wurde. Allerdings ist nicht davon auszugehen, dass die Proteinexpression in diesen zentralnervösen Strukturen die Untersuchungen beeinflusst hat, da es sich um Transduktion von lokalen cholinergen, bzw. GABAergen Interneuronen gehandelt haben wird. Da diese Interneurone jedoch keine, bzw. nur spärliche hippocampale Projektionen aufweisen, hat deren Transduktion keinen Einfluss auf die spezifische Analyse der Verteilung und der Zielstrukturen des septohippocampalen Fasersystems (Groenewegen und Russchen, 1984; Saito et al., 2013).

Die ermittelte Spezifität von rund 84 % bei der Transduktion Cre exprimierender, ChAT<sup>+</sup> Neurone entspricht einer vorrangigen Transduktion von cholinergen Neuronen und ist vergleichbar mit den entsprechenden Ergebnissen in ähnlichen Studien (z.B. Borgius et al., 2010). Die Spezifität der Transduktion cholinergischer Neurone wurde zudem in elektrophysiologischen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bestätigt, bei denen eine lichtbasierte, optogenetische Stimulation dieser transduzierten Neurone ein charakteristisches, für cholinerge Neurone beschriebenes Entladungsverhalten hervorrief. Darüber hinaus konnten die durch Exzitation cholinergischer Projektionsneurone induzierten postsynaptischen Potentiale im Hippocampus durch cholinerge Antagonisten vollständig blockiert werden. Dies belegt die weitgehend spezifische Expression der Proteine ChR2-eYFP in cholinergischen Projektionsneuronen des MSDB.

Die Spezifität bei der Transduktion Cre exprimierender, PV<sup>+</sup> Neurone war mit 67 % hingegen geringer. Dieses Ergebnis war überraschend, da durchgeführte Patch-Clamp Ableitungen der eYFP<sup>+</sup>, putativ PV<sup>+</sup> Neurone dieser Mauslinie ein charakteristisches, für GABAerge Neurone beschriebenes elektrophysiologisches Verhalten zeigten. Die ektope Expression von eYFP kann dabei potentiell durch Veränderungen der Expressionsstärke von Parvalbumin erklärt werden. Wie auch für andere Gene bekannt, könnte auch eine transiente Expression während der Entwicklung vermutet werden, welche später sistiert (Borgius et al., 2010; Gong et al., 2007). Zudem ist auch eine spontane Inversion des ChR2-eYFP Fusionsgens in PV<sup>-</sup> Neuronen zu vermuten. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die immunhistochemische Markierung PV<sup>+</sup> Neurone des MSDB ein weniger intensives Fluoreszenzsignal als im Hippocampus hervorrief, potentiell bedingt durch ein geringeres Parvalbumin-Expressionslevel. Somit könnte die Anzahl der PV<sup>+</sup> Neurone im MSDB-, und damit die Spezifität ihrer Transduktion, unterschätzt worden sein. Weitere Doppelfärbungen sollten durchgeführt werden, um die Identität der transduzierten eYFP<sup>+</sup>, jedoch PV-negativen Neurone näher zu definieren. Dazu würden immunhistochemische Färbungen gegen das Enzym Glutamat-Decarboxylase (GAD), ChAT bzw. den vesiculären Glutamattransporter (Vglut) gehören. Hierbei werden durch die Färbung gegen das GABA-synthetisierende Enzym GAD alle GABAergen-, bzw. durch die Färbung gegen Vglut die glutamatergen septalen Neurone markiert (Takamori et al., 2000). In Verbindung mit der anti-eYFP Färbung können somit die PV<sup>-</sup>, eYFP<sup>+</sup> Neurone als nicht PV-haltige GABAerge,

cholinerge bzw. glutamaterge Neurone identifiziert werden. Allerdings ist sicher, dass die detektierten transduzierten, PV<sup>+</sup> Neurone im MSDB weder der cholinergen, noch der glutamatergen Neuronenpopulationen zugeordnet werden können, da Parvalbumin in diesen Neuronenpopulationen nicht exprimiert wird (Freund, 1989; Kiss et al., 1990b).

Die Analysen zeigten außerdem, dass nur knapp die Hälfte der Cre exprimierenden Zellen bei der Virusinjektion transduziert wurden (43 % der ChAT<sup>+</sup>-, bzw. 39 % der PV<sup>+</sup> Neurone). Somit scheint die Cre vermittelte Recombination in einigen Neuronen nicht stattgefunden zu haben. Dies ist insbesondere für die verwendete PV-Cre Mauslinie anzunehmen, da hier laut Angabe des Züchters die Cre vermittelte Recombination nicht in 100 %, sondern nur in >90 % der Cre exprimierenden Neurone erfolgt (Jackson Laboratory, 2014: JAX<sup>®</sup> Mice Strains. <http://jaxmice.jax.org/strain/008069.html>, Zugriffsdatum: 01.04.2014). Folglich hätte es trotz Aufnahme des rAAV in bis zu 10 % der PV<sup>+</sup> Neurone nicht zur Expression von ChR2-eYFP-, und konsekutiv zur Fluoreszenzmarkierung kommen können. Zudem kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass bei den anti-ChAT-, bzw. anti-PV-Färbungen Zellen unspezifisch markiert wurden. In diesem Fall wäre es durch eine falsch-positive Zuordnung einer fluoreszierenden Zelle zur cholinergen, bzw. PV<sup>+</sup> Neuronenpopulation zur einer scheinbar geringeren Transduktionsrate gekommen.

## **4.2 Areal- und laminaspezifische Verteilung septaler Projektionsfasern im Hippocampus**

**4.2.1 Methodische Aspekte.** Zur Verteilungsanalyse der Projektionsaxone transduzierter cholinerg, bzw. PV<sup>+</sup> Neuronenpopulationen des MSDB wurden deren eYFP<sup>+</sup> Fortsätze im Hippocampus mittels einer anti-eYFP Färbung markiert. Dieser Ansatz war nötig, da sich die endogene eYFP Fluoreszenz für die Markierung dünner axonaler Projektionen als zu wenig intensiv herausgestellt hat. Es resultierte eine deutliche Fluoreszenzmarkierung dieser eYFP<sup>+</sup> Projektionsfasern, welche anschließend in den hippocampalen Arealen und Laminae quantifiziert wurden. Trotz unterschiedlicher Fluoreszenzintensitäten der gefärbten Präparate ermöglichte dabei die individuell pro Präparat festgesetzte Helligkeitsschwelle die selektive Darstellung der eYFP<sup>+</sup> Projektionsaxone. Dies erlaubte die spezifische Differenzierung zwischen Hinter-

grundstrukturen und eYFP-markierten Fasern und somit deren automatisierte Quantifikation. In einigen Fällen unterschied sich die Fluoreszenzintensität jedoch auch innerhalb eines Präparats trotz identischem Verfahren bei der Akquirierung der Aufnahmen (Laserstärke, Sensibilität der Strahlungsdetektoren, automatische Ausrichtung des Präparates zur Aufnahme der identischen Z-Ebene im Präparat). Um dem Rechnung zu tragen, wurde eine Auswertroutine entwickelt, welche die Helligkeitsschwelle individuell für jede Lamina festlegte. Dieses Verfahren wurde allerdings verworfen, da die Faserdetektion innerhalb eines hippocampalen Präparats unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden sollte. Durch die Anwendung einer einheitlichen Helligkeitsschwelle konnte eine leichte Über-, bzw. Unterschätzung der realen Faserflächen in stärker, bzw. schwächer fluoreszierenden Bereichen in Einzelfällen allerdings nicht verhindert werden.

Im Rahmen der Faserdetektion wurden zudem nur Afferenzen in den Laminae der Areale CA1, CA3 und des Gyrus dentatus quantifiziert. Das CA2 Areal wurde in die vorliegenden Untersuchungen nicht miteinbezogen, da eine eindeutige Arealattribution dieses kleinen Areals, insbesondere bei den ventralen Präparaten, schwierig war. Zudem wird die Existenz der CA2 Region auch teilweise in Frage gestellt (Amaral und Lavenex, 2007).

4.2.2 Ergebnisse für cholinerge Projektionen. Es wurde festgestellt, dass die cholinergen Afferenzen im dorsalen- und im ventralen Hippocampus keine areale Präferenz bei der Innervation der somato-dendritischen Regionen der Prinzipalzellen aufweisen. Somit kann angenommen werden, dass die Prinzipalzellen in keinem hippocampalen Areal präferentiell durch cholinerge Projektionsfasern kontaktiert werden. Dies bestätigt die bereits zuvor bestehende Annahme, dass sich die cholinergen Projektionen diffus in allen hippocampalen Arealen verteilen (Descarries et al., 1997; Vizi und Kiss, 1998).

Innerhalb der hippocampalen Areale konnte hingegen im dorsalen Hippocampus ein präferentielles Innervationsmuster im Gyrus dentatus und in der CA3 Region nachgewiesen werden. Es wurde deutlich, dass die cholinergen Projektionsfasern hierbei vorrangig in den oberflächlichen Laminae dieser Areale, i. e. im Stratum moleculare, bzw. im Stratum lacunosum-moleculare verlaufen. Im ventralen Hippocampus war

dieses Innervationsmuster teilweise ebenfalls zu erkennen, allerdings im CA3 Areal nicht statistisch signifikant. Dieses beobachtete Verteilungsmuster stimmt dabei teilweise nicht mit den geschilderten Ergebnissen früherer Studien überein, welche eine präferentielle Verteilung cholinerg Fasern im Stratum oriens und –radiatum, bzw. im Hilus beschrieben haben (Freund und Antal, 1988; Frotscher und Léránth, 1985). Jedoch basiert die Identifikation cholinerg Projektionsfasern in diesen Studien auf morphologisch-anatomischen, bzw. immunocytochemischen Kriterien (Freund und Antal, 1988; Frotscher und Léránth, 1985). Somit kann angenommen werden, dass die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Identifikation der Afferenzen mittels des genetischen Ansatzes potentiell exaktere Ergebnisse liefert.

Der beobachtete Faserverlauf lässt darauf schließen, dass die cholinergen Afferenzen im Stratum moleculare Körnerzellen des Gyrus dentatus-, und im Stratum lacunosum-moleculare die Pyramidenzellen des CA3 Areals dendritisch kontaktieren (Amaral und Lavenex, 2007; Frotscher und Leranath, 1985). Auch kann eine Innervation von Astrozyten in diesem Bereich angenommen werden (Araque et al., 2002). Zudem ist auffällig, dass sich der Verlauf der cholinergen Afferenzen innerhalb des Gyrus dentatus und des CA3 Areals größtenteils mit dem Verlauf entorhinaler Afferenzen deckt, welche dort die Dendriten der Körner-, bzw. Pyramidenzellen innervieren (Amaral und Lavenex, 2007). Dabei ist das Zusammenwirken des afferenten cholinergen- und entorhinalen Systems bereits beschrieben worden (Rouse et al., 1998). Hierbei scheint Acetylcholin durch eine differenzierte Aktivierung präsynaptischer mAChR an entorhinalen Fasern, bzw. postsynaptischer mAChR an Dendriten der Körnerzellen, die synaptische Transmission zwischen den Fasern des tractus perforans und den Prinzipalzellen modulieren zu können (Rouse et al., 1998). Experimentell erhöhte dabei Acetylcholin die Exzitabilität der Körnerzellen auf eintreffende Signale des entorhinalen Cortex, was funktionell den extrinsischen, sensorischen Informationsfluss der entorhinalen Afferenzen an die Prinzipalzellen verstärkt und somit zusätzlich den Theta Rhythmus beeinflussen könnte (Rouse et al., 1998). Dies tritt typischerweise bei experimenteller Exposition des Versuchstieres gegenüber unbekanntem Stimuli, bzw. bei der Informationscodierung auf (Acquas et al., 1996; Douchamps et al., 2013). Diese postulierte Interaktion wurde in Studien bestätigt, welche zeigen konnten, dass Acetylcholin bei Lernvorgängen an der Modulation synaptischer Antworten innerhalb der CA3 Region beteiligt ist (Villarreal et

al., 2007). Ob diese Effekte jedoch neben der Beeinflussung der synaptischen Transmission zwischen entorhinalen Afferenzen und Dendriten der Pyramidenzellen durch weitere Mechanismen entstehen, wird in weiteren Studien untersucht werden müssen.

Für das CA1 Areal des ventralen Hippocampus ergaben sich zudem Hinweise auf eine präferentielle Innervation des Stratum pyramidale, was auf eine somatische Innervation der dortigen Pyramidenzellen durch cholinerge Afferenzen hinweist. Dies ist im Einklang mit Versuchsungen, welche symmetrische Kontaktstellen zwischen cholinergen Projektionsfasern und den Somata der Pyramidenzellen nachweisen konnten (Frotscher und Léránth, 1985). Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass in dieser Lamina teilweise eine verstärkte Hintergrundfärbung in den Präparaten beobachtet wurde, so dass bei der helligkeitsbasierten Quantifikation der Fasern deren Flächen potentiell überschätzt wurden.

Grundsätzlich muss allerdings betont werden, dass sich aus den durchgeführten Analysen des hippocampalen Faserverlaufs cholinergere Afferenzen nur Hinweise über putativ innervierte Zellstrukturen ergeben. Dies liegt daran, dass (i) die Untersuchung des Faserverlaufs markierter eYFP<sup>+</sup> Projektionsfasern keinen Aufschluss über die Existenz von axonalen Terminalien an den cholinergen Afferenzen zulässt und (ii) das putativ freigesetzte Acetylcholin über Volumentransmission auch Zellen, welche sich nicht in direkter Nähe der Afferenzen befinden, erreichen könnte. Die Analysen erlauben folglich morphologische Annahmen über das Innervationsverhalten hippocampaler Strukturen durch cholinerge Projektionsfasern, so dass das Spektrum putativ cholinerg innervierter Zellstrukturen groß bleibt. Aufbauend auf diesen strukturellen Analysen können funktionelle Untersuchungen das zelluläre Interaktionsprofil näher definieren (s. Ausblick).

4.2.3 Ergebnisse für GABAerge Projektionen. Die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung der Faserverteilung GABAerger Afferenzen zeigte, dass die Projektionsfasern vorrangig in den tiefen Schichten der Areale verlaufen, i. e. in den Strata oriens und –pyramidale des CA3 und CA1 Areals, bzw. im Hilus innerhalb des Gyrus dentatus. Diese Beobachtung wurde in der statistischen Auswertung allerdings nur für den dorsalen Hippocampus bestätigt, was teilweise durch stärkere Unterschiede in der



Fluoreszenzintensität der Präparate des ventralen Hippocampus erklärt werden kann. Im Vergleich zu den cholinergen Afferenzen scheinen die GABAergen Projektionsfasern im Hippocampus folglich nicht nur andere Zelltypen zu innervieren, sondern größtenteils auch ein gegensätzliches Verteilungsmuster aufzuweisen (Amaral und Lavenex, 2007). Die Auswertung zeigte zudem, dass GABAerge Afferenzen im dorsalen Hippocampus vorrangig die somato-dendritischen Regionen der Pyramidenzellen des CA1 und CA3 Arealis innervieren. Dieses Ergebnis war allerdings hinsichtlich des Faserverlaufs innerhalb des Gyrus dentatus nicht überraschend, da dort nur wenige Projektionsfasern im Stratum moleculare und –granulosum detektiert wurden. Dieses Ergebnis ist jedoch nicht als Hinweis auf eine präferentielle Innervation der Pyramidenzellen des CA1 und CA3 Arealis zu werten, da GABAerge Projektionsfasern die hippocampalen Prinzipalzellen nicht direkt innervieren (Freund und Antal, 1988).

Hingegen ergeben sich aus der Analyse des Faserverlaufs Hinweise auf das laminäre Innervationsmuster hippocampaler Interneurone durch GABAerge Afferenzen. Gemessen an der Innervation markierter Interneurone bestätigen dabei die Ergebnisse aus Vorarbeiten die präferentielle Innervation des Stratum oriens und des Hilus innerhalb des dorsalen Hippocampus (Amaral und Lavenex, 2007; Freund und Antal, 1988). Die beobachtete, geringe Faserdichte innerhalb des Stratum moleculare, bzw. lacunosum-moleculare ist ebenfalls im Einklang mit der Vorarbeit von Freund und Antal (1988), welche kaum Kontaktstellen zwischen den Afferenzen und den Interneuronen in diesen Bereichen fanden.

Währenddessen lassen Aussagen über die laminäre Innervation durch GABAerge Projektionsfasern keine eindeutigen Aussagen über die zelluläre Innervation von dort befindlichen Interneuronen zu. Daher wurden im nächsten Teil der Arbeit putative Kontaktstellen zwischen den eYFP-markierten GABAergen Projektionsfasern und GABAergen, PV<sup>+</sup> Interneuronen fluoreszenzmikroskopisch detektiert, um das neuronale Zusammenspiel näher zu untersuchen.

### **4.3 Putative Kontaktstellen zwischen hippocampalen GABAergen Interneuronen und GABAergen Afferenzen aus dem MSDB**

4.3.1 Methodische Aspekte. Es sollte die somatische Innervation PV<sup>+</sup> Interneurone des Hippocampus durch GABAerge Projektionsneurone der PV<sup>+</sup> Subpopulation des MSDB nachgewiesen werden. Nach Markierung dieser Strukturen mittels einer immunhistochemischen anti-PV/anti-eYFP Doppelfärbung wurden Schichtaufnahmen der hippocampalen Präparate an einem konfokalen Mikroskop angefertigt. Hierbei gewährleistete die Funktionsweise des konfokalen Mikroskops, dass die in einer Z-Aufnahme dargestellten Strukturen auch tatsächlich in einer Ebene lagen. Zur Identifikation somatischer Kontaktstellen wurden die optischen Anschnitte der Interneurone zunächst semiautomatisch detektiert. Dies führte zu einer zuverlässigen Identifikation der Zellanschnitte und zur Markierung ihrer individuellen Konturen. In Folge wurden die unmittelbar die Somakonturen begrenzenden Zellmarkierungen um 1 µm erweitert, um in diesen erweiterten Somabereichen potentiell verlaufende eYFP<sup>+</sup> Afferenzen zu detektieren und quantifizieren. Dabei wurde wie bei der laminären Faserquantifikation eine feste Helligkeitsschwelle zur Ausblendung des Hintergrunds angewandt, um anschließend die automatisierte Quantifikation der perisomatischen eYFP<sup>+</sup> Pixelfläche zu ermöglichen. Nach Bestimmung dieser und weiterer Werte für jeden detektierten Zellanschnitt einer Schnittebene, wurden im nächsten Analysenschritt markierte Zellanschnitte unterschiedlicher Schnittebenen dahingehend untersucht, ob sie Anschnitte einer identischen Zelle darstellten. Dieser Schritt war notwendig, um die Fläche der perisomatisch verlaufenden Afferenzen für eine Gesamtzelle-, und nicht nur für einen einzelnen Zellanschnitt anzugeben. Damit zwei Zellanschnitte zu einer Gesamtzelle zusammengefasst werden konnten, mussten (i) sie sich in zwei aufeinanderfolgenden Z-Stapelaufnahmen befinden und (ii) der Abstand zwischen ihren Mittelpunkten kleiner sein als ihre gemittelten radii. Die Notwendigkeit des ersten Kriteriums ist naheliegend, da Anschnitte einer identischen Zelle in direkt aneinandergrenzenden Schichtebenen liegen müssen. Das zweite Kriterium berücksichtigt zudem, dass die Mittelpunkte optischer Anschnitte einer Zelle abhängig von der Zellmorphologie leicht variieren können. Dabei wurde der maximal tolerierte Abstand zwischen den Zellanschnitten abhängig von deren Größe festgesetzt, so dass bei größeren Anschnitten ein größerer Abstand akzeptiert wurde. Dieses Verfahren berücksichtigte die individuelle Morphologie

der detektierten Interneurone besser als ein einheitlicher Maximalabstand zwischen detektierten Zellanschnitten. Nach Zusammenfassung der Zellanschnitte zu Gesamtzellen wurde die durchschnittliche Größe der detektierten Anschnitte einer Zelle bestimmt. Zudem wurde durch Aufsummierung der Umfänge dieser Zellanschnitte angegeben, wie groß die detektierten Zelloberflächen der Interneurone waren. Hierbei ist die Berechnung einer Oberfläche aus addierten Umfängen zunächst irritierend; da diese Umfänge jedoch die Circumferenz des Interneurons in einer Schichtdicke von 1  $\mu\text{m}$  angeben, stellt deren Aufsummierung eine Annäherung an die detektierte Zelloberfläche dar. Schließlich wurde durch Addition der perisomatischen, eYFP<sup>+</sup> Faserflächen der Quotient aus der Gesamtfaserfläche/kalkulierter Zelloberfläche gebildet. Somit wurde ermittelt, welcher Anteil der Somaoberfläche eines Interneurons sich in direktem Kontakt mit GABAergen Projektionsfasern befand. Aus dieser anteiligen, putativ innervierten Zelloberfläche wurde auf die Anzahl putativer Kontaktstellen zwischen den hippocampalen Interneuronen und GABAergen Afferenzen geschlossen.

4.3.2 Ergebnisse. Zunächst wurde gezeigt, dass sich die durchschnittlichen Anschnittsflächen detektierter Interneurone nicht zwischen den hippocampalen Arealen unterschieden und näherungsweise gleich große Zelloberflächen von Interneuronen in den respektiven Arealen detektiert worden waren. Letzteres war bedeutend für die Bewertung der kalkulierten Anzahl putativer Kontaktstellen, da diese aus dem Quotienten der perisomatischen Faserfläche zur jeweiligen Zelloberfläche angenähert wurde. Hätte hingegen die Größe detektierter Zelloberflächen zwischen den Arealen variiert, hätte diese Berechnung, etwa bei in Wahrheit gleicher Faserflächen und Anzahl putativer Kontaktstellen, für eine größere Zelloberfläche ein kleineres Ergebnis ergeben.

Zusammen mit den Ergebnissen des zweiten Teils der Arbeit konnte gezeigt werden, dass GABAerge Projektionsfasern präferentiell in den tiefen Schichten des Hippocampus verlaufen und dort gemittelt rund 80 % der PV<sup>+</sup> Interneurone somatisch putativ kontaktieren. Dies ist im Einklang mit Ergebnissen der Vorarbeit von Freund und Antal (1988), in welcher ebenfalls GABAerge Kontaktstellen an der Mehrzahl der GABAergen Interneurone beschrieben wurden. Markant ist dabei die fast exakte Übereinstimmung

des hier beschriebenen Anteils putativ kontaktierter Interneurone im CA3 Areal mit den Ergebnissen aus jener Studie (85 % vs. 84 % der Interneurone, Freund und Antal, 1988). Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass die vorherige Studie GABAerge Interneurone der PV<sup>+</sup> und Calbindin<sup>+</sup> Subpopulation umfasste (Freund und Antal, 1988). Anders hingegen als durch Freund und Antal (1988) beschrieben, ergeben die vorliegenden Ergebnisse keinen Anhalt für eine geringere Kontaktierung von Interneuronen des CA1 Areals.

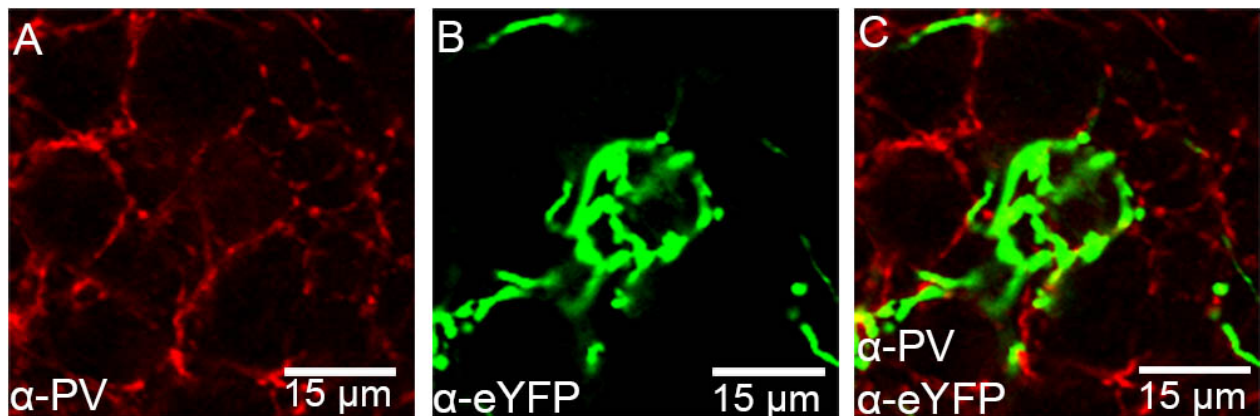
Die fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesenen, putativen Kontaktstellen stellen das morphologische Korrelat der septohippocampalen Interaktion zwischen der PV-haltigen Subpopulation GABAerger Neurone des MSDB und den PV<sup>+</sup> Interneuronen des Hippocampus dar. Dies bestätigt somit die bereits zuvor bestehende Kenntnis der spezifischen Inhibition hippocampaler Interneurone durch die Aktivität GABAerger Projektionsneurone des MSDB (Freund und Antal, 1988, Tóth et al., 1997). Gemessen an der relativen Anzahl putativ kontaktierter Interneurone kann somit ein starker Einfluss der Projektionsneurone auf die Aktivität der hippocampalen Interneurone angenommen werden. Dies unterstützt die ebenfalls bereits bekannte These, dass der präzise getimete Input des MSDB zur thetaphasenspezifischen Aktivitätsregulierung der Interneurone und somit der hippocampalen Prinzipalzellen beiträgt (Borhegyi et al., 2004; Cutsuridis und Hasselmo, 2012; Klausberger und Somogyi, 2008).

Zudem wurde beobachtet, dass der Anteil putativ innervierter Interneurone innerhalb des Gyrus dentatus offenbar geringer ist als in den anderen Arealen (70 % vs. 85 %, bzw. 86 %). Des Weiteren bildeten die Projektionsfasern signifikant weniger putative Kontaktstellen mit Interneuronen innerhalb des Gyrus dentatus als im CA3 Areal (6,7 % vs. 13,4 % putativ innervierte Zelloberfläche). Dabei kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass dieses Ergebnis die Folge einer Überschätzung der perisomatischen eYFP<sup>+</sup> Faserfläche in der CA3 Region ist, welche durch eine stärkere Hintergrundfärbung in diesem Bereich hätte entstehen können. Es wurden tatsächlich bei der (subjektiven) Betrachtung der gefärbten Hirnschnitte am Fluoreszenzmikroskop, bzw. der konfokalen Aufnahmen eine höhere Dichte perisomatischer Fasern in der CA3 Region beobachtet. Dieses Ergebnis lässt weitere Hypothesen über die Interaktion zwischen GABAergen Projektionsneuronen des MSDB und hippocampalen Inter-

neuronen zu: Existiert eine areale Präferenz der GABAergen Beeinflussung hippocampaler Interneurone, ähnlich der hypothetischen Innervationspräferenz bestimmter PV<sup>+</sup> Interneurontypen durch ebendiese Projektionen (Borhegyi et al., 2004)? Welche funktionelle Bedeutung könnte der potentiell geringere Einfluss GABAerger Afferenzen auf Interneurone innerhalb des Gyrus dentatus, im Vergleich zu Interneuronen innerhalb des CA, besonders des CA3 Areals haben?

Zur Beantwortung dieser Fragen sollte die durchgeführte morphologische Untersuchung der septohippocampalen Interaktion mittels immunhistochemischer Charakterisierung GABAerger Interneurone durch weitere Zellmarker erweitert werden. Dies ist daher indiziert, da (i) die durchgeführte Antikörperfärbung gegen das Protein Parvalbumin nur eine partielle Differenzierung der GABAergen Subtypen hippocampaler Interneurone ermöglicht (Klausberger und Somogyi, 2008) und (ii) vielfältig GABAerge Projektionsfasern detektiert wurden, welche vermutlich zelluläre Circumferenzen umgaben, diese „potentiellen“ Zellen jedoch durch die Parvalbumin-Färbung nicht markiert wurden (Abb. 25). Sehr wahrscheinlich handelte es sich bei diesen „potentiellen“ Zellen ebenfalls um GABAerge, jedoch PV-negative Interneurone, deren GABAerge Entität durch Färbung gegen GAD überprüft werden könnte. Darüber hinaus könnten Färbungen gegen weitere, spezifisch exprimierte Markerproteine die GABAergen Interneurone weiter charakterisieren. Zu diesen Markerproteinen gehören neben weiteren calciumbindenden Proteinen wie Calbindin oder Calretinin, Proteine welche an der interzellulären Signalweitergabe beteiligt sind, wie Somatostatin, Cholecystokinin, bzw. Neuropeptid Y (Gonzalez-Burgos und Lewis, 2008).

Mithilfe dieser Färbungen könnte das zelluläre Terminationsmuster der GABAergen Projektionsfasern noch spezifischer beschrieben werden und zusammen mit funktionellen Untersuchungen (s. Ausblick) die zelluläre Interaktion zwischen Projektionsneuronen des MSDB und Interneuronen des Hippocampus besser verstanden werden.



**Abb. 25: Darstellung GABAerger Projektionsfasern aus dem MSDB, welche im Hippocampus eine PV-negative Zelle vermutlich innervieren.** Hochauflösende, konfokale Aufnahmen des hippocampalen CA3 Areals einer Maus, welche durch eine virale Transduktion die Proteine ChR2-eYFP spezifisch in PV<sup>+</sup> Projektionsneuronen des MSDB exprimiert. Gezeigt ist eine immunhistochemische anti-PV/anti-eYFP Färbung, welche **(A)** GABAerge Fortsätze hippocampaler Interneurone, bzw. **(B)** GABAerge, eYFP<sup>+</sup> Afferenzen des MSDB markiert. **C** zeigt die Überlagerung der beiden Kanäle. Es ist zu erkennen, dass die GABAergen Afferenzen wahrscheinlich ein hippocampales Interneuron perisomatisch kontaktieren, welches jedoch nicht das Protein PV nicht exprimiert und somit durch die in A gezeigte Antikörperfärbung nicht markiert wird.

Im Allgemeinen muss jedoch betont werden, dass durch die spezifische Markierung von Neuronen, bzw. Neuronenfortsätzen mittels immunhistochemischer Färbungen nur Annahmen über das tatsächliche, funktionelle Interaktionsmuster der beteiligten Strukturen gemacht werden können. Auch wenn die beschriebene Existenz neuronaler Kontaktstellen zwischen den perisomatisch verlaufenden Projektionsfasern und den Interneuronen sehr wahrscheinlich ist, kann auch der durchgeführte Nachweis der Synapsen mittels der Färbung gegen Synapsin deren Existenz nicht absolut eindeutig nachweisen. Die Existenz dieser Kontaktstellen muss folglich in elektronenmikroskopischen, bzw. funktionellen Untersuchungen (s.u.) nachgewiesen werden.

#### 4.4 Ausblick

Die Untersuchung der funktionellen Bedeutung von Neuronenpopulationen des MSDB für die Aktivität des hippocampalen Neuronennetzwerkes stellt seit über 50 Jahren ein bisher nicht ausgeschöpftes Forschungsfeld der Neurowissenschaften dar. Dabei wurde mittels einer Vielzahl von Methoden versucht, die zellulären Interaktionen zwischen diesen zentralnervösen Strukturen aufzudecken. Die Untersuchung ihrer morphologisch-anatomischen Charakteristika ließen dabei, wie in der vorliegenden Arbeit, strukturelle Schlüsse über das neuronale Zusammenspiel zu. Auf diese Kenntnisse aufbauend, ermöglichen elektrophysiologische Untersuchungen einen Einblick in die funktionelle Interaktion der beteiligten Neuronen auf zellulärer- und Netzwerkebene. Hierbei erlauben insbesondere optogenetische Methoden eine minimal-invasive, selektive Aktivitätssteuerung definierter Neuronenpopulationen in Verbindung mit elektrophysiologischer Messung von postsynaptischen Potentialen in spezifischen Neuronen. Dabei basieren auch die Versuche der vorliegenden Arbeit auf einem Ansatz, welcher die funktionelle Manipulation septohippocampaler Projektionssysteme durch die genetisch definierte Expression des lichtsensitiven Kationenkanals Channelrhodopsin-2 ermöglicht. Mithilfe dieses Ansatzes können die cholinergen, bzw. GABAergen Projektionsneurone des MSDB durch Applikation von Licht definierter Wellenlänge selektiv angeregt- und somit die physiologischen Effekte der synaptischen Freisetzung von Acetylcholin, bzw. GABA im Hippocampus untersucht werden. Zudem können durch die zunehmende Umsetzbarkeit dieser Versuche in vivo die Auswirkungen der selektiven Aktivierung oder Hemmung dieser Projektionsneurone auf das Verhalten des Tieres in bestimmten Situationen mit hoher zeitlicher Präzision analysiert werden. In Verbindung mit den dargestellten Erkenntnissen über den Verlauf und das Terminationsmuster der Projektionsfasern ermöglichen diese optogenetischen Untersuchungen ein Verständnis der funktionellen Bedeutung der cholinergen und GABAergen septohippocampalen Projektionsneurone für die hippocampale Neuronenaktivität. Neben der morphofunktionellen Untersuchung der cholinergen und GABAergen Neuronenpopulationen sollten analoge Versuche zur näheren Charakterisierung der glutamatergen Neuronenpopulation des MSDB und ihrer hippocampalen Projektionsaxone durchgeführt werden. Diese Untersuchungen bergen potentiell ein weites Spektrum neuer Erkenntnisse, da über die strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser vor erst rund 10 Jahren

beschriebenen Neuronenpopulation noch nicht viel bekannt ist (Sotty et al., 2003). Solche Analysen könnten, analog zu der verwendeten Methode in der vorliegenden Arbeit, auf viraler Transduktion einer Vglut2-Cre Maus basieren, was zur Expression der Proteine ChR2-eYFP in glutamatergen Neuronen des MSDB führen würde (Borgius et al., 2010). Hierbei stellt Vglut2 einen vesiculären Glutamattransporter dar, welcher ubiquitär und ausschließlich in glutamatergen Neuronen, bzw. in Neuronen, welche Glutamat als Co-Transmitter freisetzen, exprimiert ist (Borgius et al., 2010). Somit könnten die morphologischen Eigenschaften des glutamatergen Projektionssystems spezifisch charakterisiert-, bzw. mittels optogenetischer Stimulation die funktionellen Effekte im Hippocampus analysiert werden. Diese Untersuchungen würden neue Erkenntnisse über das spezifische Verteilungs- und Terminationsmuster, bzw. die strukturelle Dynamik dieser Neuronenpopulation bringen.

#### **4.5 Klinische Relevanz**

Da die Aktivität des septohippocampalen Systems für die funktionelle Integrität des hippocampalen Neuronennetzwerks essentiell ist, bedingen Störungen dieser Fasersysteme eine pathologische Veränderung in hippocampal-vermittelten Kognitionsprozessen. Dabei ist für spezifische pathologische Zustände, wie beispielsweise den Morbus Alzheimer, bekannt, dass der Untergang cholinergischer Zellen des MSDB das zelluläre Korrelat der auftretenden kognitiven Defizite darstellt (Schliebs und Arendt, 2011). Jedoch konnte auch für altersbedingte Kognitionseinschränkungen ohne spezifischen Krankheitswert gefunden werden, dass diesen Störungen eine Einschränkung der cholinergen Zellfunktion zugrunde liegt (Schliebs und Arendt, 2011).

Auch die anatomische und funktionelle Untersuchung der verschiedenen Typen der GABAergen Interneurone, sowohl im Hippocampus als auch in anderen Bereichen des ZNS, wird ein besseres Verständnis des individuellen Beitrags dieser Zelltypen zur Generierung synchroner neuronaler Aktivität ermöglichen. Hierbei ist insbesondere für die PV<sup>+</sup> Subpopulation der GABAergen Interneurone bekannt, dass die Störung ihrer neuronalen Aktivität Erkrankungen wie Schizophrenie bedingen (Gonzalez-Burgos und Lewis, 2008).

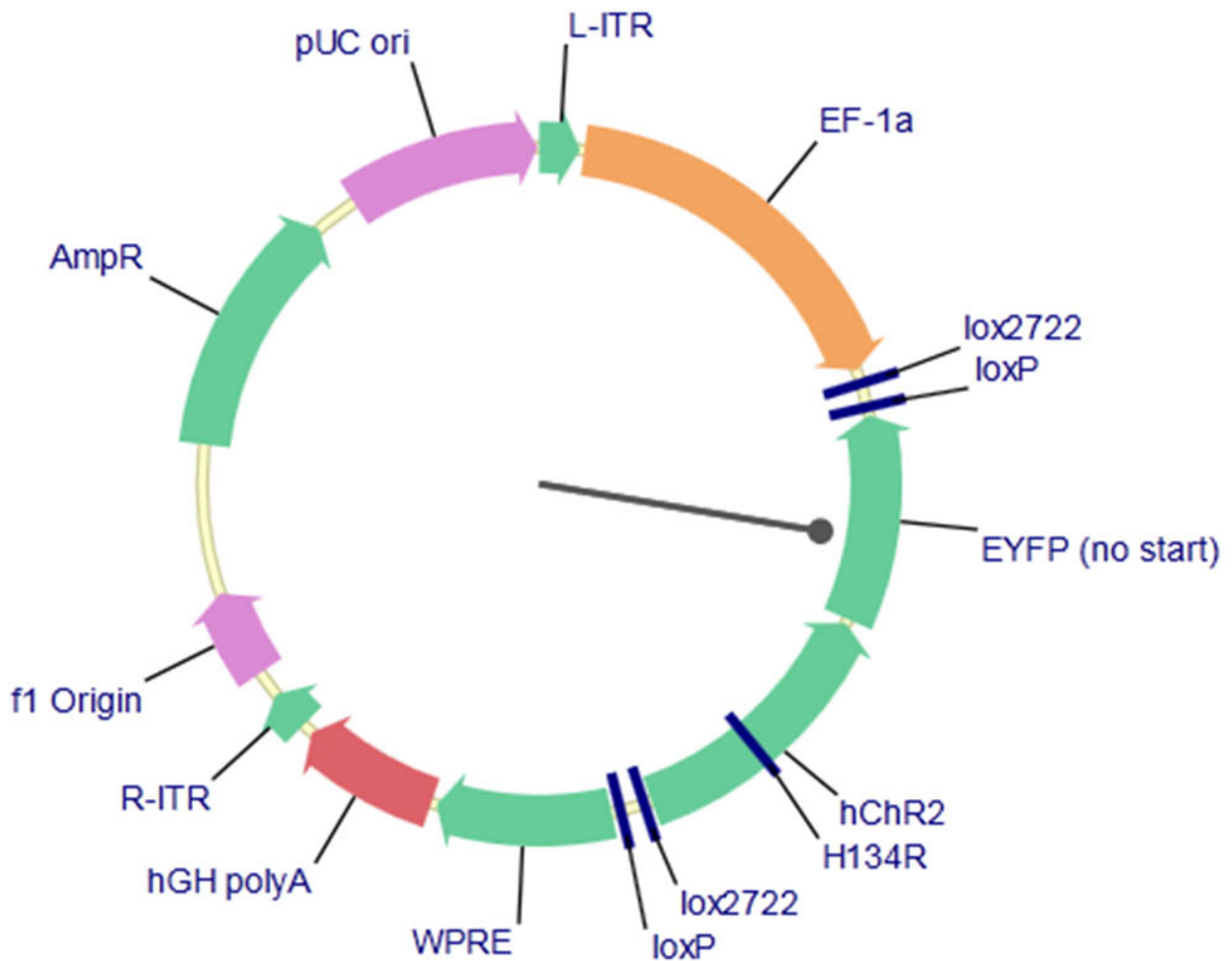


## 5. Zusammenfassung

Der Hippocampus hat eine zentrale funktionelle Rolle beim Lernen, dem Abruf von Gedächtnisinhalten und der räumlichen Orientierung. Diese Kognitionsprozesse basieren auf einem komplexen Zusammenspiel einer Vielzahl erregender und hemmender hippocampaler Neurone und assoziierten Strukturen. Dabei ist seit geraumer Zeit bekannt, dass Projektionsneurone des medialen Septum-diagonalen Band von Broca Komplex (MSDB) im basalen Vorderhirn wesentlich zur Funktionalität dieses hippocampalen Neuronennetzwerks beitragen. Diese modulatorischen Projektionsneurone des MSDB können nach dem freigesetzten Neurotransmitter in eine cholinerge, GABAerge und glutamaterge Untergruppe unterteilt werden und projizieren über ein septohippocampales Fasersystem in den Hippocampus. Bisher angewandte anatomische Tracingmethoden zur Untersuchung ihrer Faserverteilung und der hippocampalen Zielstrukturen erlaubten jedoch keine eindeutige Unterscheidung der drei Projektionssysteme, bzw. der hippocampalen Innervationsziele. Eine von unserer Arbeitsgruppe angewandte genetische Tracingmethode ermöglicht hingegen eine spezifische Markierung definierter Neuronentypen des MSDB und ihrer septohippocampalen Projektionen mittels viraler Transduktion transgener Mauslinien. Die vorliegende Arbeit konnte mittels immunhistochemischer Färbungen und konfokaler, fluoreszenzmikroskopischer Mikroskopie zeigen, dass (1) der genetische Ansatz zur spezifischen Transduktion und Markierung cholinerg, bzw. GABAerger Neuronenpopulationen des MSDB führte, (2) deren axonale Projektionen ein areal- und lamina-spezifisches Verteilungsmuster im Hippocampus aufweisen und (3) GABAerge Projektionsneurone putativ GABAerge Interneurone im Hippocampus kontaktieren und dabei präferentiell Interneurone des CA3 Areals im Vergleich zum Gyrus dentatus innervieren. Diese Ergebnisse bestätigen und erweitern unsere Kenntnisse über die septohippocampale Interaktion. Aufbauend auf diesen morphologisch-anatomischen Analysen ermöglichen weitergehende optogenetische Methoden mittels des identischen Versuchsansatzes eine spezifische Analyse der funktionellen, septohippocampalen Interaktion. Diese Kenntnisse werden wesentlich zu unserem Verständnis der funktionellen Grundlagen hippocampal-vermittelter Kognitionsprozesse und ihrer pathologischen Zustände, wie der Alzheimer'schen Demenz beitragen.

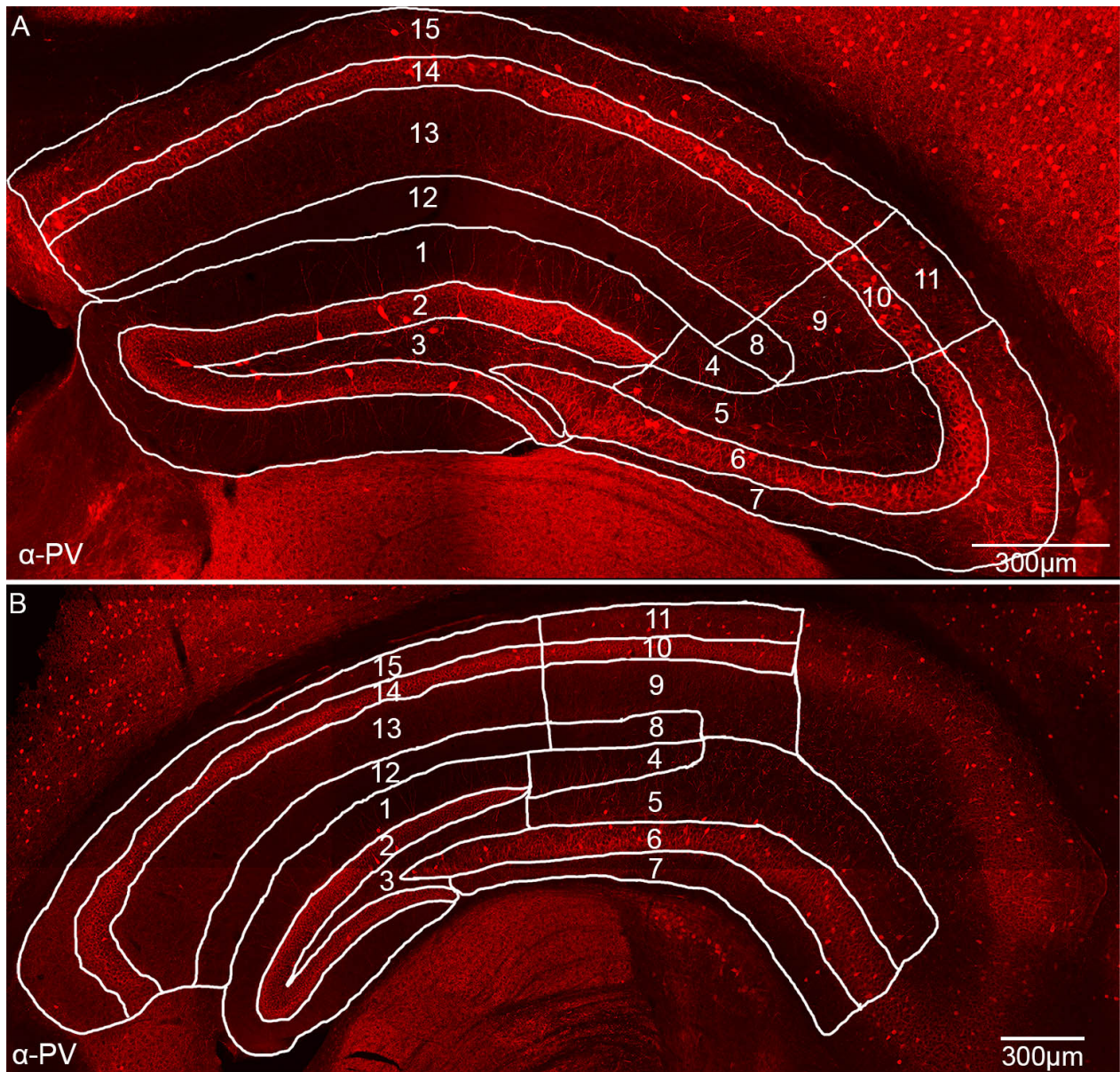
## 6. Anhang

### 6.1 Plasmid zur Herstellung des rAAV DIO Chr2-eYFP



**Abb. 26: Plasmid zur Herstellung des rAAV DIO Chr2-eYFP.** Bestandteile des Plasmids (im Uhrzeigersinn): Replikationsursprung des f1 Phagen (f1 Origin), Ampicillin-Resistenzgen (AmpR), Replikationsursprung des Plasmids (pUC ori), left-Inverted Terminal Repeat (L-ITR), human elongation factor-1 alpha (EF-1 $\alpha$ ), loxP-Sequenzen lox2722 und loxP, Enhanced Yellow Fluorescent Protein (EYFP), Channelrhodopsin-2 mit H134R Mutation (hChR2), woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element (WPRE), human Growth Hormone poly-Adenin Sequenz (hGH polyA), right-Inverted Terminal Repeat (R-ITR).  
Abbildung von: Deisseroth K, 2014: Optogenetics/sequence info. [http://www.everyvector.com/sequences/show\\_public/2491](http://www.everyvector.com/sequences/show_public/2491) (20.02.2014).

## 6.2. Arealeinteilung des Hippocampus



**Abb. 27: Arealeinteilung des Hippocampus.** Dargestellt sind repräsentative konfokale Aufnahmen eines coronar angeschnittenen dorsalen (A), bzw. ventralen Hippocampus (B) der Positionen Bregma -2.0 mm, bzw. -2,8 mm. Durch eine immunhistochemische anti-PV Färbung der Präparate wurden GABAerge Interneurone der PV<sup>+</sup> Subpopulation und deren Fortsätze in rot markiert. Die manuelle Arealeinteilung der gefärbten Präparate war Voraussetzung für die automatisierte Verteilungsanalyse von afferenten Fasersystemen in den hippocampalen Arealen und Laminae. Die Arealeinteilung wurde angelehnt an Paxinos und Franklin, 2008: 1, Stratum moleculare; 2, Str. granulosum; 3, Hilus; 4, CA3-Stratum lacunosum -moleculare (SLM); 5, CA3-Stratum radiatum (Str. rad.); 6, CA3-Stratum pyramidale (Str. pyr.); 7, CA3-Stratum oriens (Str. or.); 8, CA2-SLM; 9, CA2-Str. rad.; 10, CA2-Str. pyr.; 11, CA2-Str.or.; 12, CA1-SLM; 13, CA1-Str. rad.; 14, CA1-Str. pyr.; 15, CA1-Str. or.

### 6.3. Auswertroutinen

#### Manuelle Quantifikation immunhistochemisch gefärbter Projektionsneurone des MSDB Skripttyp: ImageJ Macro

```
// Diese Prozedur benötigt eine Aufnahme, die aus zwei Farbkanälen besteht (hier:
// anti-ChAT/anti-eYFP oder anti-PV/anti-eYFP). Der Benutzer wird aufgefordert,
// einen Bereich in der Aufnahme auszuwählen (hier: das MSDB). Anschließend
// sollen gruen-, bzw. rot fluoreszierende Zellen manuell markiert werden. Dabei
// werden im Skript Zellen, die rot und gruen fluoreszieren, als co-faerbende Zellen
// bezeichnet.
```

```
macro Manuelle_Quantifikation_fluoreszierender_Zellen_im_MSDB
{
// Ermittlung des Dateinamens, sowie des übergeordneten Ordners und Erstellung
// eines neuen Ordners für die Ergebnisse
title=getTitle;
path=getInfo("image.directory");
File.makeDirectory(path+"manual analysis");
path_Analysis=path+"manual analysis";

// Setzen des Maßstabs
run("Set Scale...", "distance=1024 known=1270.566 pixel=1 unit=µm");

// Löschen von Einträgen im ROI Manager, falls vorhanden
roiManager("Reset");

// Setzung des Bereiches für die Quantifikation (MSDB)
setTool("Freehand");
waitForUser("Markiere den Bereich, der dem MSDB entspricht");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 0);
```

```
roiManager("Rename", "ROI Mediales Septum");
roiManager("Save", path_Analysis+"\\ROI_Mediales_Septum.zip");

// Bestimmung von Hoehe und Breite des Bereichs, Anlegen einer neuen Datei
run("Measure");
List.setMeasurements;
MS_width=List.getValue("Width");
MS_height=List.getValue("Height");
roiManager("Select", 0);
run("Copy");
newImage("Mediales Septum", "RGB", MS_width+100, MS_height+100, 1);
run("Paste");

// Setzen des Maßstabs
run("Set Scale...", "distance=1024 known=1270.566 pixel=1 unit=µm");

// Neuarrangierung und Speichern von Fenstern
run("Split Channels");
selectWindow("Mediales Septum (blue)");
run("Close");
selectWindow("Mediales Septum (red)");
selectWindow("Mediales Septum (green)");
run("Merge Channels...", "c1=[Mediales Septum (red)] c2=[Mediales Septum
    (green)] create");
saveAs("Tiff", path_Analysis+"\\Mediales Septum");
title_MS=getTitle;
selectWindow(title);
run("Close");
```

```
// -----  
// Manuelle Markierung von co-faerbenden Zellen  
// -----  
  
// Löschen von Einträgen im ROI Manager  
roiManager("Reset");  
  
// Benutzeraufforderung, co-faerbende Zellen zu markieren  
run("Channels Tool...");  
run("ROI Manager...");  
setTool("point");  
roiManager("Show All");  
waitForUser("Markiere co-faerbende Zellen");  
  
// Zaehlen, Neubenennung und Speichern der markierten Zellen  
colabeling_cells=roiManager("count");  
  
for(i=0 ; i < colabeling_cells; i++)  
{  
    roiManager("select", i);  
    roiManager("Rename", "colabeling_cell_"+i+1);  
}  
roiManager("Save", path_Analysis+"\\colabeling_cells.zip");  
  
// Ergebnisausgabe  
print("Anzahl cofaerbender Zellen: "+colabeling_cells);
```

```

// -----
// Manuelle Markierung von ausschließlich eYFP+ Zellen
// -----

// Benutzeraufforderung, ausschließlich eYFP+ Zellen zu markieren
Stack.setActiveChannels("01");
setTool("point");
roiManager("Show All");           // um co-faerbende Zellen zu zeigen
waitForUser("Markiere ausschließlich eYFP+ Zellen");

// Löschen der markierten co-faerbenden Zellen im ROI Manager
for(i=0; i < colabeling_cells; i++)
{
    roiManager("Select", 0);
    roiManager("Delete");
}

// Speichern und Ergebnisausgabe
eYFP_cells=roiManager("count");
for(i=0 ; i < eYFP_cells; i++)
{
    roiManager("select", i);
    roiManager("Rename", "only_eYFP+_cells"+i+1);
}
roiManager("Save", path_Analysis+"\\only_eYFP+_cells.zip");
print("insgesamt eYFP+ Zellen:      "+eYFP_cells+colabeling_cells);

```

```

// -----
// Manuelle Markierung von ausschließlich ChAT+, bzw. PV+ Zellen
// -----

// Löschen von Einträgen im ROI Manager
roiManager("Reset");

// Benutzeraufforderung, ausschließlich ChAT/PV+ Zellen zu markieren
Stack.setActiveChannels("10");
roiManager("Open", path_Analysis+"\\colabeling_cells.zip");
setTool("point");
roiManager("Show All");           // um co-faerbende Zellen zu zeigen
waitForUser("Markiere ausschließlich rot fluoreszierende Zellen");

// Löschen der markierten co-faerbenden Zellen im ROI Manager
for(i=0; i < colabeling_cells; i++)
{
  roiManager("Select", 0);
  roiManager("Delete");
}

// Speichern der Ergebnisse
Cy3_cells=roiManager("count");
for(i=0 ; i < Cy3_cells; i++)
{
  roiManager("select", i);
  roiManager("Rename", "Cy3_cells"+i+1);
}
roiManager("Save", path_Analysis+"\\Cy3_cells.zip");

```



```
// Zeigen eines Fensters, welches den Benutzer zur Eingabe der Zelllinie auffordert
```

```
var mouse_line;
```

```
label=newArray(2);
```

```
default=newArray(2);
```

```
label[0]="ChAT-cre";
```

```
label[1]="PV-cre";
```

```
default[0]=false;
```

```
default[1]=false;
```

```
Dialog.create("Welche Mauslinie?");
```

```
Dialog.addCheckboxGroup(2, 1,label,default);
```

```
Dialog.show();
```

```
is_ChAT = Dialog.getCheckbox();
```

```
is_PV = Dialog.getCheckbox();
```

```
if((is_ChAT)==1)
```

```
{
```

```
mouse_line="ChAT+";
```

```
}
```

```
else
```

```
{
```

```
if((is_PV)==1)
```

```
{
```

```
mouse_line="PV+";
```

```
}
```

```
else
```

```
{
```

```
mouse_line="keine Mauslinie ausgewählt";
```

```
}
```

```
}
```

```

// Finale Ergebnisausgabe
print("insgesamt "+mouse_line+" Zellen:      "+Cy3_cells+colabeling_cells);
print("\n-> "+colabeling_cells+" von "+Cy3_cells+colabeling_cells+" "+mouse_line+"
      Zellen ( "+(colabeling_cells/(Cy3_cells+colabeling_cells))*100+"% )
      exprimieren das Fluoreszenzprotein.");
print("-> "+colabeling_cells+" von "+eYFP_cells+colabeling_cells+" eYFP+ Zellen (
      "+(colabeling_cells/(eYFP_cells+colabeling_cells))*100+"% ) sind
      "+mouse_line+".");
waitForUser("Kontrolle der Ergebnisse");

// Speichern der Ergebnisse und Schließen der Fenster
selectWindow("Log");
saveAs("Text", path_Analysis+"\\Result containing");
run("Close");
selectWindow("Results");
run("Close");
selectWindow(title_MS);
run("Close");
selectWindow("ROI Manager");
run("Close");
}

```

Quantifikation septaler Projektionsfasern in hippocampalen Arealen und Laminae

Skripttyp: ImageJ Macro

// Diese Prozedur benoetigt eine hippocampale Aufnahme, die zwei Farbkanaele  
 // (anti-PV/anti-eYFP) umfasst. Eine Arealeinteilung im zip-Format muss sich im  
 // selben Ordner befinden. Die Aufnahme muss eine Groesse von 2048x2048 Pixeln  
 // haben, wobei ein Pixel 0,62µm entspricht.

```
macro Quantifikation_eYFP_Fasern_in_hippocampalen_Arealen
{
  // Erhebung von Dateiinformatioren und Erstellung eines Ordners für die
  // Ergebnisse
  title_Stack=getTitle;
  path=getInfo("image.directory");
  print(File.nameWithoutExtension);

  if(File.exists(path+"Analysis")==0)
  {
    File.makeDirectory(path+"Analysis");
  }
  else
  {
    break;          // Dieser Befehl existiert nicht. Er unterbricht aber die Programm-
  }                // ausfuehrung, was ein Datenuberschreiben verhindert

  pathanalysis=path+"\\Analysis";          // Variable fuer neuen Ordner
  file_ROIs=path+File.nameWithoutExtension+".zip"; // Dateipfad der zip-Datei mit
                                                // der Arealeinteilung

  // Oeffnen des gruenen Kanals
  run("Stack to Images");
  selectWindow(title_Stack+" (red)");
  run("Close");
```

```
run("Split Channels");
selectWindow(title_Stack+" (green) (red)");
run("Close");
selectWindow(title_Stack+" (green) (blue)");
run("Close");
title=getTitle();

// Ausgabe der Ergebnisparameter
print("\nArea;Faseranteil");

// Setzen des Maßstabs
run("Set Scale...", "distance=1 known=0.62 pixel=1 unit=µm");

// Speichern der Arealeinteilung im Ergebnisordner und Angabe der Arealanzahl
roiManager("Reset");
roiManager("Open", file_ROIs);
roiManager("Select All");
roiManager("Save", pathanalysis+"\\"+File.nameWithoutExtension+".zip");
ROI_entities=roiManager("count");

// Auswahl des gesetzten Hintergrundbereichs, welcher der letzte in der Liste sein
// muss und Bestimmung dessen Fluoreszenzintensität
roiManager("Select", ROI_entities-1);
run("Set Measurements...", " mean standard redirect=None decimal=2");
run("Measure");
List.setMeasurements;
ROI_mean=List.getValue("Mean");
ROI_stddev=List.getValue("StdDev");
```

```

// Setzen der Helligkeitsschwelle abhaengig von der Fluoreszenz des
// Hintergrundbereichs
s = 3.6;
x = (ROI_mean + s* ROI_stddev);
setAutoThreshold("Default dark");
setThreshold(x,254);
run("Convert to Mask");

// Speichern der Aufnahme mit gesetzter Helligkeitsschwelle
saveAs("Tiff", pathanalysis+"\\"+File.nameWithoutExtension+" Auswertung");

// Löschen von Eintraegen im ROI Manager
roiManager("Reset");

// Analyse jeden Areal
for(j=0; j<ROI_entities-1; j++)          // ein Schleifendurchlauf ist fuer jedes Areal
{
roiManager("Open", file_ROIs);
roiManager("Select", j);

// Erhebung des Arealnamens
name_of_ROI = call("ij.plugin.frame.RoiManager.getName", j);

// Bestimmung der Flaechе des Areal
run("Set Measurements...", "area redirect=None decimal=2");
run("Measure");
List.setMeasurements;
ROI_total_area = getResult("Area");
slice_total_ROI_area +=ROI_total_area;

// Bestimmung der eYFP+ Faserflaeche
run("Set Measurements...", "area redirect=None decimal=2");

```

```

run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing
    display clear add");
number = nResults;
List.setMeasurements;
var eYFP_Area=0;

for(i=0; i<number; i++)
{
    eYFP_Area +=getResult("Area",i);
}
slice_total_eYFP_area +=eYFP_Area;

// Berechnung der Faserflaeche/Arealflaeche (Flaechenanteil der Fasern)
var eYFP_rel = eYFP_Area/ROI_total_area;

// Ergebnisausgabe
print(name_of_ROI+";"+eYFP_rel);
roiManager("Reset");
}

// Berechnung und Ausgabe des durchschnittlichen Flächenanteils der Fasern im
// Praeparat
eYFP_proportion_whole_slice = slice_total_eYFP_area / slice_total_ROI_area;
print("\neYFP Durchschnittsfaseranteil; "+eYFP_proportion_whole_slice);

// Speichern des 'Results'-Fensters
selectWindow("Log");
saveAs("Text", pathanalysis+"\\Results "+title_Stack);

// Schließen der Fenster
selectWindow("Results");
run("Close");

```

```
selectWindow("Log");  
run("Close");  
selectWindow("ROI Manager");  
run("Close");  
selectWindow(File.nameWithoutExtension+" Auswertung");  
run("Close");  
}
```

Quantifikation perisomatisch verlaufender Afferenzen an InterneuronenSkripttyp: ImageJ Makro

```
// Diese Prozedur benoetigt eine hippocampale Z-Stapelaufnahme, bestehend aus
// Einzelebenen (hier 15) mit jeweils zwei Kanaelen (hier anti-PV/anti-eYFP).
// Diese muessen jeweils eine Groesse von 1024x1024 Pixeln haben, wobei ein Pixel
// 317µm entspricht. Nach semiautomatischer Zelldetektion werden die markierten
// Zellbereiche vergroessert und darin die Faserflaeche perisomatisch verlaufender
// eYFP+ Afferenzen bestimmt. Zudem werden fuer jeden detektierten Zellanschnitt
// noch weitere Daten erhoben.
```

```
macro Quantifikation_perisomatischer_Afferenzen_an_Interneuronen
```

```
{
```

```
// -----
```

```
// Detektion von PV+ Interneuronen
```

```
// -----
```

```
// Erhebung von Dateiinformatonen und Erstellung eines Ordners für die
Ergebnisse
```

```
title_stack=getTitle;
```

```
path=getInfo("image.directory");
```

```
analysed_area=File.getName(path); // Erhebung der analysierten Region ueber
```

```
// den Dateinamen (zuvor manuell festgelegt)
```

```
if(File.exists(path+"\\Analyse")==0)
```

```
{
```

```
File.makeDirectory(path+"Basket Analyse");
```

```
}
```

```
else
```

```
{
```

```
break; // Dieser Befehl existiert nicht. Er unterbricht aber die Programm-
```

```
} // ausfuehrung, was ein Datenuberschreiben verhindert
```



```

pathanalysis=path+"\\Basket Analyse";           // Variable fuer neuen Ordner

// Trennung der Kanaele, Setzen des Maßstabs
run("Split Channels");
selectWindow(title_stack+" (red)");           // Roter Kanal
run("Red");
title_Cy3=getTitle();
run("Set Scale...", "distance=1024 known=317 pixel=1 unit=µm");
selectWindow(title_stack+" (green)");         // Gruener Kanal
run("Green");
title_Cy2=getTitle();
run("Set Scale...", "distance=1024 known=317 pixel=1 unit=µm");

selectWindow(title_stack+" (blue)");          // Blauer Kanal
run("Close");                                 // wird geschlossen

// Erhebung der Anzahl der Einzelebenen in der Stapelaufnahme
selectWindow(title_Cy3);
number_slices = nSlices();

// Ausgabe der Ergebnisparameter
print ("Layer ROI Green_Area Cell_Area xPOs yPos Cell_perim");

// Beginn der Analyse einzeln fuer jede Ebene
for(l=1; l<number_slices+1 ; l++)
{
roiManager("Reset");
selectWindow(title_Cy3);
roiManager("Show None");                     // um keine Markierungen aus
                                              // der letzten Ebene zu zeigen

roiManager("Show All");

```

```

// Kopieren der Ebene in ein neues Fenster
newImage("ROI_Cy3", "8-bit", 1024, 1024, 1);
selectWindow(title_Cy2);                                // damit die richtige Ebene im
                                                         // gruenen Kanal angezeigt wird

setSlice(l);
selectWindow(title_Cy3);
setSlice(l);
run("Copy");
selectWindow("ROI_Cy3");
run("Paste");
run("8-bit");
run("Clear Outside");
run("Set Scale...", "distance=1024 known=317 pixel=1 unit=µm");

// Setzen einer Helligkeitsschwelle und Veraenderung des Aussehens der
// Zellanschnitte
run("Auto Local Threshold", "method=Bernsen radius=15 parameter_1=0
    parameter_2=0 white stack");
run("Despeckle");
run("Dilate");
run("Dilate");
run("Erode");
run("Erode");

// Detektion und Markierung der Zellanschnitte
run("Analyze Particles...", "size=80-600 circularity=0.05-1 show=Nothing display
    clear include add");

// Benutzeraufforderung, die Zellmarkierungen zu kontrollieren
selectWindow(title_Cy2);
roiManager("Show All");
selectWindow(title_Cy3);

```

```
roiManager("Show All");
waitForUser("Kontrolle der ROIs");

selectWindow("ROI_Cy3");
run("Close");

// -----
// Analyse der Zellanschnitte
// -----

// Analyse, falls mind. 1 Zelle gefunden wurde
if(roiManager("Count")>0)
{
    // Zählen und Speichern der markierten Zellanschnitte
    ROI_entities = roiManager("count");
    roiManager("save", pathanalysis+"\\ROIs "+I+".zip");

    // Anzeigen der Zellanschnitte im neuen Fenster und Vergrößerung der
    // Zellmarkierungen
    newImage("Mask_of_selected_ROIs", "8-bit", 1024, 1024, 1);

    for(m=0; m<ROI_entities; m++)
    {
        roiManager("Select", m);
        run("Fill");
    }

    selectWindow("Mask_of_selected_ROIs");
    run("Select All");
    run("Invert");
    run("Dilate");
    run("Dilate");
}
```

```
run("Dilate");
run("Dilate");
run("Analyze Particles...", "size=0-10000 circularity=0-1 show=Masks clear
    include add");

// Speichern der vergroesserten Zellmarkierungen
roiManager("save", pathanalysis+"\\ROIs "+I+"_gross.zip");
roiManager("Reset");

// Schließen der Fenster
selectWindow("Mask_of_selected_ROIs");
run("Close");
selectWindow("Mask of Mask_of_selected_ROIs");
run("Close");

// Kopieren des gruenen Kanals in neues Fenster
newImage("ROI_Cy2", "8-bit", 1024, 1024, 1);
run("Set Scale...", "distance=1024 known=317 pixel=1 unit=µm");
selectWindow(title_Cy2);
setSlice(I);
run("Copy");
selectWindow("ROI_Cy2");
run("Paste");
run("8-bit");
run("Clear Outside");
run("Invert");

// Setzen eines Helligkeitsschwellenwerts fuer die Faserquantifikation
setThreshold(95,180);
run("Convert to Mask");
```

```

// Analyse jeder Zelle in aktueller Ebene
for(i=0; i<ROI_entities; i++)
{
  selectWindow("ROI_Cy2");
  roiManager("Open", pathanalysis+"\\ROIs "+i+".zip")
  run("Set Measurements...", "area centroid perimeter redirect=None
    decimal=2");
  roiManager("select", i);
  run("Measure");
  List.setMeasurements;           // Erhebung von:
  cell_area = getResult("Area"); // Zellanschnittsflaeche
  cell_perim = getResult("Perim."); // Zellumfang
  cell_x_position = getResult("X"); // x-Koordinate
  cell_y_position = getResult("Y"); // y-Koordinate

  // SchlieÙe Zellmarkierungen und oeffne die vergroesserten Zellmarkierungen
  // fuer die perisomatische Faserquantifikation
  roiManager("Reset");
  roiManager("open", pathanalysis+"\\ROIs "+i+"_gross.zip");
  roiManager("select", i);
  run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Masks
    display clear include");

  // Addition der eYFP+ Einzelfaserfläachen eines Zellbereiches
  GFP_area = 0;

  for(k=0; k<nResults; k++)
  {
    GFP_area += getResult("Area", k);
  }
}

```

```

// Ausgabe der Ergebnisse fuer jede detektierte Zelle der Ebene
print (l+" "+i+1+" "+GFP_area+" "+cell_area+" "+cell_x_position+"
      "+cell_y_position+" "+cell_perim);

// Schließen des Fensters
roiManager("Reset");      // um ROI Manager wieder zu leeren
selectWindow("Mask of ROI_Cy2");
run("Close");
}

// Schließen des Fensters
selectWindow("ROI_Cy2");
run("Close");
roiManager("Show All");
}
}

// Speichern der Ergebnisdatei und Schließen der restlichen Fenster
selectWindow("Log");
saveAs("Text", pathanalysis+"\\Ergebnis");
run("Close");
selectWindow(title_Cy3);
run("Close");
selectWindow(title_Cy2);
run("Close");
selectWindow("Results");
run("Close");
selectWindow("ROI Manager");
run("Close");
}

```

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1 Anatomie des Hippocampus
- Abb. 2 Der virale DNA Vektor
- Abb. 3 Reaktionsprinzip des Cre/loxP Systems nach Aufnahme des viralen DNA Vektors in Cre exprimierende Neurone des MSDB
- Abb. 4 Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung
- Abb. 5 Vereinfachte Darstellung der Funktionsweise des konfokalen Mikroskops
- Abb. 6 Diffusion des rAAV nach dessen Injektion in das MSDB einer Maus, welche das Enzym Cre-Recombinase in cholinergen Neuronen exprimiert
- Abb. 7 Diffusion des rAAV nach dessen Injektion in das MSDB einer Maus, welche das Enzym Cre-Recombinase in PV<sup>+</sup> Neuronen exprimiert
- Abb. 8 Schematische Darstellung der anatomischen Strukturen eines coronaren Hirnschnitts auf Höhe des MSDB einer Maus
- Abb. 9 Spezifität und Effizienz der Transduktion cholinergischer Neurone des MSDB mittels des rAAV
- Abb. 10 Spezifität und Effizienz der Transduktion PV<sup>+</sup> Neurone des MSDB mittels des rAAV
- Abb. 11 Selektive Darstellung von eYFP<sup>+</sup> Projektionsfasern aus dem MSDB im Hippocampus
- Abb. 12 Immunhistochemische Färbung cholinergischer Projektionsfasern aus dem MSDB im dorsalen Hippocampus einer viral transduzierten Maus
- Abb. 13 Verteilung cholinergischer Projektionsfasern aus dem MSDB im dorsalen Hippocampus
- Abb. 14 Immunhistochemische Färbung cholinergischer Projektionsfasern aus dem MSDB im ventralen Hippocampus einer viral transduzierten Maus
- Abb. 15 Verteilung cholinergischer Projektionsfasern aus dem MSDB im ventralen Hippocampus
- Abb. 16 Immunhistochemische Färbung GABAerger Projektionsfasern aus dem MSDB im dorsalen Hippocampus einer viral transduzierten Maus
- Abb. 17 Verteilung GABAerger Projektionsfasern aus dem MSDB im dorsalen Hippocampus

- Abb. 18 Immunhistochemische Färbung GABAerger Projektionsfasern aus dem MSDB im ventralen Hippocampus einer viral transduzierten Maus
- Abb. 19 Verteilung GABAerger Projektionsfasern aus dem MSDB im ventralen Hippocampus
- Abb. 20 Detektion putativer Kontaktstellen zwischen hippocampalen GABAergen Interneuronen und GABAergen Afferenzen aus dem MSDB
- Abb. 21 Darstellung putativer Kontaktstellen zwischen einem hippocampalen GABAergen Interneuron und GABAergen Afferenzen aus dem MSDB
- Abb. 22 Nachweis von Kontaktstellen zwischen hippocampalen GABAergen Interneuronen und GABAergen Afferenzen aus dem MSDB mittels einer immunhistochemischen anti-Synapsin 1, 2 Färbung
- Abb. 23 Anschnittsflächen und Zelloberflächen detektierter hippocampaler Interneurone
- Abb. 24 Putative Kontaktstellen zwischen hippocampalen GABAergen Interneuronen und GABAergen Afferenzen aus dem MSDB
- Abb. 25 Darstellung GABAerger Projektionsfasern aus dem MSDB, welche im Hippocampus eine PV-negative Zelle vermutlich innervieren
- Abb. 26 Plasmid zur Herstellung des rAAV DIO ChR2-eYFP
- Abb. 27 Arealeinteilung des Hippocampus
- 
- Tab. 1 Anteile cholinерger Faserflächen an laminären Gesamtflächen des dorsalen Hippocampus
- Tab. 2 Anteile cholinерger Faserflächen an laminären Gesamtflächen des ventralen Hippocampus
- Tab. 3 Anteile GABAerger Faserflächen an laminären Gesamtflächen des dorsalen Hippocampus
- Tab. 4 Anteile GABAerger Faserflächen an laminären Gesamtflächen des ventralen Hippocampus



## 8. Literaturverzeichnis

Acquas E, Wilson C, Fibiger HC. Conditioned and unconditioned stimuli increase frontal cortical and hippocampal acetylcholine release: effects of novelty, habituation, and fear. *J Neurosci* 1996; 16: 3089–3096

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*. Oxford – New York: Oxford University Press, 2007: 37-60

Araque A, Martín ED, Perea G, Arellano JI, Buño W. Synaptically released acetylcholine evokes Ca<sup>2+</sup> elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 2002; 22: 2443–2450

Armstrong DM, Saper CB, Levey AI, Wainer BH, Terry RD. Distribution of cholinergic neurons in rat brain: demonstrated by the immunocytochemical localization of choline acetyltransferase. *J Comp Neurol* 1983; 216: 53-68

Blasco-Ibáñez JM, Freund TF. Synaptic input of horizontal interneurons in stratum oriens of the hippocampal CA1 subfield: structural basis of feed-back activation. *Eur J Neurosci* 1995; 7: 2170-2180

Blitzer RD, Gil O, Landau EM. Cholinergic stimulation enhances long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1990; 119: 207-210

Bohenzky RA, LeFebvre RB, Berns KI. Sequence and symmetry requirements within the internal palindromic sequences of the adeno-associated virus terminal repeat. *Virology* 1988; 166: 316–327

Borgius L, Restrepo CE, Leao RN, Saleh N, Kiehn O. A transgenic mouse line for molecular genetic analysis of excitatory glutamatergic neurons. *Mol Cell Neurosci* 2010; 45: 245–257

Borhegyi Z, Varga V, Szilágyi N, Fabo D, Freund TF. Phase segregation of medial septal GABAergic neurons during hippocampal theta activity. *J Neurosci* 2004; 24: 8470–8479

Brandon MP, Koenig J, Leutgeb JK, Leutgeb S. New and distinct hippocampal place codes are generated in a new environment during septal inactivation. *Neuron* 2014; 82: 789-796

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

Colom LV, Castaneda MT, Reyna T, Hernandez S, Garrido-Sanabria E. Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse* 2005; 58: 151-164

Cutsuridis V, Hasselmo M. GABAergic contributions to gating, timing, and phase precession of hippocampal neuronal activity during theta oscillations. *Hippocampus* 2012; 22: 1597–1621

Descarries L, Gisiger V, Steriade M. Diffuse transmission by acetylcholine in the cns. *Prog Neurobiol* 1997; 53: 603-625

Douchamps V, Jeewajee A, Blundell P, Burgess N, Lever C. Evidence for encoding versus retrieval scheduling in the hippocampus by theta phase and acetylcholine. *J Neurosci* 2013; 33: 8689–8704

Dutar P, Bassant MH, Senut MC, Lamour Y. The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol Rev* 1995; 75: 393-427

Freund TF, Antal M. GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 1988; 336: 170-173

Freund TF. GABAergic septohippocampal neurons contain parvalbumin. *Brain Res* 1989; 478: 375–381

Freund TF, Buzsáki G. Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 1996; 6: 347-470

Frotscher M, Léránth C. Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 1985; 239: 237-246

Gong S, Doughty M, Harbaugh CR, Cummins A, Hatten ME, Heintz N, Gerfen CR. Targeting Cre recombinase to specific neuron populations with bacterial artificial chromosome constructs. *J Neurosci* 2007; 27: 9817–9823

Gonzalez-Burgos G, Lewis DA. GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2008; 34: 944–961

Goutagny R, Jackson J, Williams S. Self-generated theta oscillations in the hippocampus. *Nat Neurosci* 2009; 12: 1491-1493

Griffith WH, Matthews RT. Electrophysiology of AChE-positive neurons in basal forebrain slices. *Neurosci Lett* 1986; 71: 169-174

Groenewegen HJ, Russchen FT. Organization of the efferent projections of the nucleus accumbens to pallidal, hypothalamic, and mesencephalic structures: a tracing and immunohistochemical study in the cat. *J Comp Neurol* 1984; 223: 347–367

Hangya B, Borhegyi Z, Szilágyi N, Freund TF, Varga V. GABAergic neurons of the medial septum lead the hippocampal network during theta activity. *J Neurosci* 2009; 29: 8094-8102

Huh CYL, Goutagny R, Williams S. Glutamatergic neurons of the mouse medial septum and diagonal band of Broca synaptically drive hippocampal pyramidal cells: relevance for hippocampal theta rhythm. *J Neurosci* 2010; 30: 15951-15961

Hyman JM, Wyble BP, Goyal V, Rossi CA, Hasselmo ME. Stimulation in Hippocampal Region CA1 in Behaving Rats Yields Long-Term Potentiation when Delivered to the Peak of Theta and Long-Term Depression when Delivered to the Trough. *J Neurosci* 2003; 23: 11725-11731

Kiss J, Patel AJ, Baimbridge KG, Freund TF. Topographical localization of neurons containing parvalbumin and choline acetyltransferase in the medial septum-diagonal band region of the rat. *Neuroscience* 1990; 36: 61–72

Klausberger T, Somogyi P. Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations. *Science* 2008; 321: 53-57

Klein R, Ruttkowski B, Knapp E, Salmons B, Günzburg WH, Hohenadl C. WPRE-mediated enhancement of gene expression is promoter and cell line specific. *Gene* 2006; 372: 153–161

Knapp JA, Morris NP, Henderson Z, Matthews RT. Electrophysiological characteristics of non-bursting, glutamate decarboxylase messenger RNA-positive neurons of the medial septum/diagonal band nuclei of guinea-pig and rat. *Neuroscience* 2000; 98: 661-668

Lee MG, Chrobak JJ, Sik A, Wiley RG, Buzsáki G. Hippocampal theta activity following selective lesion of the septal cholinergic system. *Neuroscience* 1994; 62: 1033-1047

van Loo KMJ, Schaub C, Pernhorst K, Yaari Y, Beck H, Schoch S, Becker AJ. Transcriptional regulation of T-type calcium channel CaV3.2: bi-directionality by early growth response 1 (Egr1) and repressor element 1 (RE-1) protein-silencing transcription factor (REST). *J Biol Chem* 2012; 287: 15489–15501

Lubenov EV, Siapas AG. Hippocampal theta oscillations are travelling waves. *Nature* 2009; 459: 534-539

Lund A, Knudsen SM, Vissing H, Clark B, Tommerup N. Assignment of human elongation factor 1alpha genes: EEF1A maps to chromosome 6q14 and EEF1A2 to 20q13.3. *Genomics* 1996; 36: 359–361

Manseau F, Danik M, Williams S. A functional glutamatergic neurone network in the medial septum and diagonal band area. *J Physiol* 2005; 566: 865-884

Manseau F, Goutagny R, Danik M, Williams S. The hippocamptoseptal pathway generates rhythmic firing of GABAergic neurons in the medial septum and diagonal bands: an investigation using a complete septohippocampal preparation in vitro. *J Neurosci* 2008; 28: 4096-4107

Navarrete M, Perea G, Fernandez de Sevilla D, Gómez-Gonzalo M, Núñez A, Martín ED, Araque A. Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol* 2012; 10: e1001259

Parikh V, Kozak R, Martinez V, Sarter M. Prefrontal acetylcholine release controls cue detection on multiple timescales. *Neuron* 2007; 56: 141-154

Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2008

Petsche H, Stumpf C. The origin of theta-rhythm in the rabbit hippocampus. *Wien Klin Wochenschr* 1962; 74: 696-700

Rouse ST, Gilmore ML, Levey AI. Differential presynaptic and postsynaptic expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptors at the perforant pathway/granule cell synapse. *Neuroscience* 1998; 86: 221–232

Saito YC, Tsujino N, Hasegawa E, Akashi K, Abe M, Mieda M, Sakimura K, Sakurai T. GABAergic neurons in the preoptic area send direct inhibitory projections to orexin neurons. *Front Neural Circuits* 2013; 7: 192

Schliebs R, Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 2011; 221: 555–563

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

Sotty F, Danik M, Manseau F, Laplante F, Quirion R, Williams S. Distinct electrophysiological properties of glutamatergic, cholinergic and GABAergic rat septohippocampal neurons: novel implications for hippocampal rhythmicity. *J Physiol* 2003; 551: 927-943

Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 2000; 407: 189-194

Teles-Grilo Ruivo LM, Mellor JR. Cholinergic modulation of hippocampal network function. *Front Synaptic Neurosci* 2013; 5: 2

Tóth K, Borhegyi Z, Freund TF. Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *J Neurosci* 1993; 13: 3712-3724

Tóth K, Freund TF, Miles R. Disinhibition of rat hippocampal pyramidal cells by GABAergic afferents from the septum. *J Physiol* 1997; 500: 463-474

Varga V, Hangya B, Kránitz K, Ludányi A, Zemankovics R, Katona I, Shigemoto R, Freund TF, Borhegyi Z. The presence of pacemaker HCN channels identifies theta rhythmic GABAergic neurons in the medial septum. *J Physiol* 2008; 586: 3893-3915

Villarreal DM, Gross AL, Derrick BE. Modulation of CA3 afferent inputs by novelty and theta rhythm. *J Neurosci* 2007; 27: 13457-13467

Vizi ES, Kiss JP. Neurochemistry and Pharmacology of the Major Hippocampal Transmitter Systems: Synaptic and Nonsynaptic Interactions. *Hippocampus* 1998; 8: 566-607

Winson J. Loss of hippocampal theta rhythm results in spatial memory deficit in the rat. *Science* 1978; 201: 160-163

Yoder RM, Pang KCH. Involvement of GABAergic and cholinergic medial septal neurons in hippocampal theta rhythm. *Hippocampus* 2005; 15: 381-392

## 9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen meiner Dissertation beigetragen haben.

Zunächst gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Heinz Beck für die Überlassung des Dissertationsthemas, die großzügige Unterstützung und die Möglichkeit, Einblicke in die neurowissenschaftliche Forschung zu erhalten.

Für die stete Betreuung möchte ich mich bei Herrn Milan Pabst bedanken, der mir wesentlich bei den Experimenten, der Auswertung und der Verfassung dieser Arbeit zur Seite stand.

Auch Herrn Dr. Mischa Uebachs und Herrn Holger Dannenberg gilt mein Dank für die Unterstützung beim Programmieren der Auswertprozeduren und die gemeinsame Reflexion der Ergebnisse. Für die stete Hilfe bei der Umsetzung der Färbungen möchte ich mich ebenfalls bei Frau Margit Reitze und Frau Olivia Steffan bedanken. Insbesondere richtet sich mein Dank auch an alle weiteren Mitglieder der Arbeitsgruppe für die angenehme gemeinsame Zeit im Labor.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich zudem bei der BONFOR-Kommission für die Bereitstellung des Forschungsstipendiums, welches mir ermöglicht hat, drei Freisemester zu nehmen, um mich ganz auf die Forschungsarbeit zu konzentrieren.

Schließlich danke ich herzlich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während des Studiums und der Dissertation jederzeit großartig unterstützt haben.