

Aus dem Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Elektrophysiologische und morphologische Charakterisierung
subikulärer Pyramidenzellen und Untersuchungen zur Rolle des
NMDA-Rezeptors bei der Kurzzeitplastizität an der
CA1-Subikulum-Synapse der Maus

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Yona Petra Antonia Pößnecker
aus Ulm

Datum der Promotion: 04.03.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	IX
Abstract	X
1 Einleitung	1
1.1 Die hippocampale Formation.....	1
1.1.1 Anatomische Grundlagen	1
1.1.2 Schaltkreise in der hippocampalen Formation.....	3
1.1.3 Funktionen der hippocampalen Formation	4
1.2 Das Subikulum	6
1.2.1 Subikulum, Präsubikulum, Parasubikulum.....	6
1.2.2 Afferente und efferente Verbindungen des Subikulums	7
1.2.3 Funktionen und pathophysiologische Bedeutung des Subikulums.....	9
1.3 Subikuläre Pyramidenzellen	11
1.3.1 Burstende und regulär feuervernde Zellen	11
1.3.2 Elektrophysiologische Eigenschaften	13
1.3.3 Zelltypspezifische Verteilung	13
1.3.4 Zelluläre Morphologie	14
1.3.5 Konnektivität und extrahippokampale Projektionen	15
1.3.6 Zelltypspezifische molekulargenetische Marker	16
1.4 Neuronale Plastizität.....	17
1.4.1 Grundprinzipien der glutamatergen synaptischen Transmission	17
1.4.2 Synaptische und nicht-synaptische Plastizität	18
1.4.3 Kurzzeitplastizität	19
1.4.4 Langzeitplastizität	20
1.4.5 Neuronale Plastizität an der CA1-Subikulum-Synapse.....	23

2 Fragestellung	26
3 Materialien und Methoden.....	27
3.1 Versuchstiere	27
3.2 Herstellung und Lagerung von Hirnschnittpräparaten.....	27
3.3 Anwendung der Patch-Clamp-Technik	28
3.3.1 Grundlagen und Prinzipien der Patch-Clamp-Technik	28
3.3.2 Aufbau des Messstandes	31
3.3.3 Erreichen der <i>whole-cell</i> -Konfiguration.....	32
3.4 Elektrophysiologische Untersuchungen	33
3.4.1 Messprotokolle	33
3.4.2 Erfassung und Auswertung der elektrophysiologischen Messdaten	36
3.5 Zellmorphologische Untersuchungen.....	43
3.5.1. Füllung der subikulären Pyramidenzellen mit Biocytin	43
3.5.2. Fixation der Hirnschnittpräparate und immunhistochemische Färbung	43
3.5.3. Erfassung und Auswertung der zellmorphologischen Daten.....	43
3.6 Statistische Auswertung.....	46
3.7 Verwendete Lösungen und Pharmaka.....	48
3.8 Liste verwendeter Materialien	51
4 Ergebnisse.....	53
4.1 Zelltypspezifisches Entladungsverhalten subikulärer Pyramidenzellen	53
4.2 Membraneigenschaften.....	55
4.2.1 Aktive Membraneigenschaften	56
4.2.2 Passive Membraneigenschaften	59
4.3 Spontanaktivität.....	68
4.4 Dendritische Morphologie	72
4.4.1 Sholl-Analyse apikaler und basaler Dendriten.....	73
4.4.2 Weitere Parameter der dendritischen Morphologie	76
4.5 Korrelationsanalyse, Clusteranalysen und Hauptkomponentenanalysen	78

4.5.1 Korrelationsanalyse	78
4.5.2 Clusteranalysen, Hauptkomponentenanalysen	83
4.6 Synaptische Kurzzeitplastizität an der CA1-Subikulum-Synapse.....	88
4.6.1 Kurzzeitplastizität bei burstenden und regulär feuernenden Zellen	88
4.6.2 Bedeutung postsynaptisch lokalisierter NMDA-Rezeptoren	90
4.6.3 Bedeutung prä- und postsynaptischer NMDA-Rezeptoren.....	97
4.7 Untersuchungen zu NMDA-Rezeptor-Subtypen an der CA1-Subikulum-Synapse burstender Zellen.....	102
4.7.1 Auswirkungen einer pharmakologischen NMDA-Rezeptor-Blockade auf die synaptische Transmission an der CA1-Subikulum-Synapse	102
4.7.2 Auswirkungen von AP5 und Ifenprodil auf NMDA-Rezeptor-Ströme.....	106
4.8 Feldpotentialmessungen zur Untersuchung der Auswirkungen einer pharmakologischen Blockade von NMDA-Rezeptoren an Schaffer-Kollateral-CA1-Synapsen.....	108
5 Diskussion	111
5.1 Zelltypspezifisches Entladungsverhalten subikulärer Pyramidenzellen	111
5.2 Membraneigenschaften	112
5.3 Spontanaktivität	114
5.4 Dendritische Morphologie.....	114
5.5 Korrelationsanalyse, Clusteranalysen und Hauptkomponentenanalysen	116
5.6 Synaptische Kurzzeitplastizität an der CA1-Subikulum-Synapse.....	118
5.7 Untersuchungen zu NMDA-Rezeptor-Subtypen an der CA1-Subikulum-Synapse burstender Zellen.....	120
Literaturverzeichnis	XI
Eidesstattliche Versicherung	XXIII
Lebenslauf	XXIV
Publikationsliste.....	XXIV
Danksagung.....	XXVI

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mäusegehirn, Hippokampus und horizontaler Hirnschnitt.....	1
Abbildung 2: Zeichnungen von Camillo Golgi aus dem Jahr 1886.....	3
Abbildung 3: Projektionen in den entorhinalen Kortex und hippocampale Verbindungen.....	4
Abbildung 4: Mikrophotographie der hippocampalen Formation.....	7
Abbildung 5: Subikuläre Afferenzen und Efferenzen.....	8
Abbildung 6: Entladungsmuster subikulärer Pyramidenzelltypen	11
Abbildung 7: Subikuläre Pyramidenzelltypen	14
Abbildung 8: LTP im Subikulum bei BURST und REG	25
Abbildung 9: Vereinfachtes Schaltbild einer Patch-Clamp-Vorverstärkereinheit.....	29
Abbildung 10: Schematische Darstellung der verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen.....	30
Abbildung 11: Schematische Darstellung eines Patch-Clamp-Messtandes.....	32
Abbildung 12: Parameter der aktiven Membraneigenschaften I	37
Abbildung 13: Parameter der aktiven Membraneigenschaften II	38
Abbildung 14: Parameter der aktiven Membraneigenschaften III	39
Abbildung 15: Parameter der passiven Membraneigenschaften.....	40
Abbildung 16: Parameter bei Feldpotentialen	42
Abbildung 17: Parameter der Sholl-Analyse	44
Abbildung 18: Entladungsverhalten BURST und REG.....	53
Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung BURST und REG	54
Abbildung 20: Inter-Aktionspotential-Intervalle bei BURST und REG	55
Abbildung 21: Aktionspotential-Frequenzen.....	56
Abbildung 22: Aktionspotentialeigenschaften.....	57
Abbildung 23: Sag- und Rebound-Potentiale	59
Abbildung 24: Passive Membraneigenschaften	60
Abbildung 25: Vergleich zwischen verschiedenen intra- und extrazellulären Lösungen I.....	62
Abbildung 26: Vergleich zwischen verschiedenen intra- und extrazellulären Lösungen II.....	64
Abbildung 27: Messungen der Spontanaktivität bei BURST und REG	68
Abbildung 28: Spontanaktivität bei BURST und REG.....	69
Abbildung 29: Häufigkeitsverteilung und Verteilungskurven der Parameter der Spontanaktivität	71

Abbildung 30: Z-Projektionen und Dendritenrekonstruktionenvon BURST und REG	73
Abbildung 31: Sholl-Diagramme bei BURST und REG	74
Abbildung 32: Sholl-Parameter apikaler und basaler Dendriten bei BURST und REG	75
Abbildung 33: Weitere Parameter der dendritischen Morphologie bei BURST und REG	76
Abbildung 34 Korrelationsanalyse nach Spearman	79
Abbildung 35: Hauptkomponenten- und Clusteranalyse I	84
Abbildung 36: Hauptkomponenten- und Clusteranalyse II	84
Abbildung 37: Hauptkomponenten- und Clusteranalyse III	85
Abbildung 38: Hauptkomponenten- und Clusteranalyse IV	86
Abbildung 39: Hauptkomponenten- und Clusteranalyse V	86
Abbildung 40: Hauptkomponenten- und Clusteranalyse VI	87
Abbildung 41: PTP bei BURST und REG	90
Abbildung 42: Versuchsanordnung <i>caged</i> MK801	91
Abbildung 43: Auswirkungen der Applikation von UV-Licht	92
Abbildung 44: Untersuchungen zur Wirksamkeit von intrazellulärem MK801	95
Abbildung 45: PTP unter NMDA-R-Blockade durch intrazelluläres MK801	97
Abbildung 46: PTP unter NMDA-R-Blockade durch AP5 I	99
Abbildung 47: PTP unter NMDA-R-Blockade durch AP5 II	101
Abbildung 48: NMDA-Rezeptor-Blocker	102
Abbildung 49: Synaptische Transmission unter NMDA-R-Blockade durch AP5	103
Abbildung 50: Synaptische Transmission unter NMDA-R-Blockade durch Ifenprodil	104
Abbildung 51: Synaptische Transmission unter NMDA-R-Blockade durch DQP	105
Abbildung 52: Vergleich AP5, Ifenprodil und DQP	105
Abbildung 53: <i>Repatch</i> -Experimente unter NMDA-R-Blockade durch AP5 und Ifenprodil	108
Abbildung 54: Feldpotentialmessungen in der CA1-Region	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten artifiziellen cerebrospinalen Lösungen	48
Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Kalium-Gluconat-Lösung.....	49
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Cäsium-Gluconat-Lösung.....	49
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten pharmakologisch aktiven Substanzen	50
Tabelle 5: Rheobase und Aktionspotential-Frequenzen.....	65
Tabelle 6: Aktionspotentialeigenschaften	66
Tabelle 7: Sag- und Rebound-Potentiale	67
Tabelle 8: Passive Membraneigenschaften.....	67
Tabelle 9: Parameter der Spontanaktivität	70
Tabelle 10: Parameter apikaler und basaler Dendriten	77
Tabelle 11: Korrelationstabelle mit Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman I	80
Tabelle 12: Korrelationstabelle mit Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman II	81
Tabelle 13: Korrelationstabelle mit Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman III	82

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	Artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure
AMPA-R	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure-Rezeptoren
AP5	D-(-)-2-Amino-5-Phosphonopentansäure
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BURST	Burstende subikuläre Pyramidenzellen
CA	Cornu ammonis
CA1	Cornu ammonis Areal 1
CA2	Cornu ammonis Areal 2
CA3	Cornu ammonis Areal 3
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CC-Modus	Stromklemm-Modus
CV	Variationskoeffizient
EK	Entorhinaler Kortex
EPSC	Exzitatorische postsynaptische Ströme
EPSP	Exzitatorische postsynaptische Potentiale
fEPSP	Exzitatorische postsynaptische Feldpotentiale
FI-Kurve	Frequenz-Strom-Kurve
FWHMA	<i>Full Width at Half-Maximum Amplitude</i>
GD	Gyrus dentatus
HCN-Kanal	<i>Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated Channel</i>
HFS	Hochfrequenzstimulation
IAP1	Inter-Aktionspotential-Intervall
IEI	Inter-Event-Intervall
IV-Kurve	Strom-Spannungs-Kurve
Kainat-R	Kainat-Rezeptoren
K-Gluconat	Kalium-Gluconat-Lösung

LEK	Lateraler entorhinaler Kortex
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
MEK	Medialer entorhinaler Kortex
NBQX	2,3-Dihydroxy-6-Nitro-7-Sulfamoyl-Benzochinoxalin-2,3-Dion
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDA-R	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren
PAS	Parasubikulum
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Hauptkomponente
PKA	Proteinkinase A
PPD	Doppelpulsabschwächung
PPF	Doppelpulsverstärkung
PRS	Präsubikulum
PTP	Posttetanische Potenzierung
REG	Regulär feuernde subikuläre Pyramidenzellen
RMP	Ruhemembranpotential
sACSF	Sucrosebasierte artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
sEPSC	Spontane exzitatorische postsynaptische Ströme
STDP	<i>Spike-Timing-Dependent-Plasticity</i>
SUB	Subikulum
VC-Modus	Spannungsklemm-Modus
VGLUT2	Vesikulärer Glutamattransporter 2

Zusammenfassung

Das Subikulum stellt den größten Ursprung efferenter Projektionen aus der hippocampalen Formation dar und fungiert so als Schnittstelle der Informationsverarbeitung zwischen dem Hippokampus und kortikalen sowie subkortikalen Strukturen. Bei den subikulären Pyramidenzellen lassen sich entsprechend ihres Entladungsverhaltens zwei Zelltypen unterscheiden. Sogenannte burstende Zellen feuern in Folge einer depolarisierenden Strominjektion zwei oder mehr Aktionspotentiale in kurzen zeitlichen Abständen, während regulär feuernde Zellen mit einem einzelnen Aktionspotential reagieren. Inwieweit es sich bei burstenden und regulär feuernden Zellen um zwei distinkte Zelltypen handelt, die sich - über das charakteristische Entladungsverhalten hinaus - in morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften unterscheiden, ist nicht abschließend geklärt. Unterschiede zwischen burstenden und regulär feuernden Zellen konnten in der Vergangenheit unter anderem in Bezug auf die Mechanismen der NMDA-Rezeptor-abhängigen Langzeitpotenzierung an der CA1-Subikulum-Synapse nachgewiesen werden. Ob sich zwischen den beiden subikulären Pyramidenzelltypen Unterschiede in der Ausprägung von Kurzzeitplastizität zeigen, ist bisher nicht untersucht worden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Patch-Clamp-Technik genutzt, um das Entladungsverhalten von Pyramidenzellen in Hirnschnitten von Mäusen zu charakterisieren, Spontanaktivität abzuleiten sowie Ausprägungen der posttetanischen Potenzierung an der CA1-Subikulum-Synapse zu erfassen. Letzteres erfolgte in Anwesenheit verschiedener pharmakologischer NMDA-Rezeptor-Blocker, um eine Beteiligung spezifischer NMDA-Rezeptor-Subtypen zu untersuchen und Rückschlüsse auf deren prä- oder postsynaptische Lokalisation ziehen zu können. Einzelzellefärbungen wurden durchgeführt, um die dendritische Morphologie von burstenden und regulär feuernden Zellen zu untersuchen.

Das Entladungsverhalten von insgesamt 369 subikulären Pyramidenzellen wurde erfasst, wobei 77,5% als burstende und 22,5% als regulär feuernde Zellen klassifiziert wurden. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass sich burstende und regulär feuernde Zellen in einigen, die aktiven und passiven Membraneigenschaften betreffenden Parametern, jedoch nicht in den erhobenen Parametern der dendritischen Morphologie oder der Spontanaktivität signifikant unterscheiden. In Bezug auf die posttetanische Potenzierung als eine Form der Kurzzeitplastizität wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gefunden. Darüber hinaus hatte die pharmakologische Blockade von NMDA-Rezeptoren bei beiden Typen subikulärer Pyramidenzellen keinen Einfluss auf die Ausprägung der posttetanischen Potenzierung, führte jedoch zu einer relevanten Verminderung der synaptischen Transmission. Letzteres konnte in burstenden Zellen auf die Blockade postsynaptisch lokalisierter GluN2A- und GluN2B-Untereinheiten enthaltende NMDA-Rezeptor-Subtypen zurückgeführt werden.

Diese Arbeit liefert eine umfassende Charakterisierung von subikulären Pyramidenzellen hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen und morphologischen Eigenschaften. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse, dass sich die posttetanische Potenzierung an der CA1-Subikulum-Synapse burstender und regulär feuernder Zellen nicht maßgeblich unterscheidet und dass diese spezifische Form der Kurzzeitplastizität unabhängig von einer Aktivierung prä- oder postsynaptischer NMDA-Rezeptoren ist.

Abstract

The subiculum represents the largest origin of efferent projections from the hippocampal formation and thus acts as an interface of information processing between the hippocampus and cortical as well as subcortical structures. Among subicular pyramidal cells, two cell types can be distinguished according to their discharge behavior. As a result of depolarizing current injection bursting cells fire two or more action potentials at short temporal intervals, whereas regular firing cells respond with a single action potential. Whether bursting and regular firing cells are two distinct cell types differing in morphological and electrophysiological properties - beyond the characteristic discharge behavior - has not been conclusively determined. Differences between bursting and regular firing cells have been demonstrated in the past with respect to mechanisms of NMDA receptor dependent long-term potentiation at the CA1-subiculum synapse. However, differential expression of short-term plasticity in these two subicular pyramidal cell types has not yet been investigated.

In this work the patch-clamp technique was used to characterize the discharge behavior of pyramidal cells in mouse brain slices and to record the spontaneous activity as well as the post-tetanic potentiation at CA1-subiculum synapses. The latter was done in the presence of various pharmacological NMDA receptor blockers to investigate specific NMDA receptor subtypes and to draw conclusions about their pre- or postsynaptic localization. Single cell stainings were performed to explore the dendritic morphology of both cell types.

The discharge behavior of a total of 369 subicular pyramidal cells was recorded with 77,5% classified as bursting and 22,5% as regular firing cells. In summary, bursting und regular firing cells differed significantly in some parameters related to membrane properties, but not in dendritic morphology or spontaneous activity. With respect to post-tetanic potentiation as a phenomenon of short-term plasticity, no differences were found between the groups. Furthermore, pharmacological blockade of NMDA receptors in both types of subicular pyramidal cells had no effect on the expression of post-tetanic potentiation but led to a relevant reduction in synaptic transmission. In bursting cells this was most likely due to blockade of postsynaptically localized GluN2A- and GluN2B-subunit-containing NMDA receptor subtypes.

This work provides a comprehensive characterization of subicular pyramidal cells in terms of their electrophysiological and morphological properties. Moreover, the results indicate that there is no difference between bursting and regular firing cells in the post-tetanic potentiation at the CA1-subiculum synapse and that this specific form of short-term plasticity is independent of pre- or postsynaptic NMDA receptor activation.

1 Einleitung

1.1 Die hippocampale Formation

1.1.1 Anatomische Grundlagen

Der Hippokampus liegt bilateral im medialen Temporallappen der Großhirnrinde. Er grenzt an das inferiore Horn des lateralen Ventrikels und reicht mit seiner länglich-geschwungenen Form bis zum kaudalen Ende des Corpus callosum (Balken). Seinen Namen verdankt der Hippokampus (griechisch *hippo*: Pferd und griechisch *campos*: Seeungeheuer) der Ähnlichkeit seiner Form mit einem Seepferdchen.¹

Beim Menschen befindet sich die hippocampale Formation, verlagert durch den Zuwachs des Neokortex, baso-medial im Temporallappen. Der murine Hippokampus erstreckt sich hingegen von rostro-medial nach ventro-lateral, zeigt ein wesentlich größeres relatives Volumen und ist in seiner Orientierung, verglichen mit dem menschlichen Hippokampus, um 90 Grad gedreht (Abbildung 1).¹⁻⁴

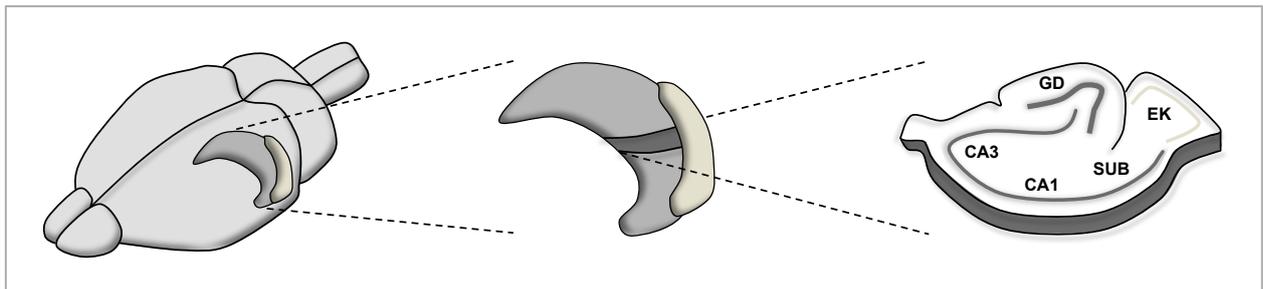


Abbildung 1 Mäusegehirn, Hippokampus und horizontaler Hirnschnitt. Schematische Darstellung eines Mäusegehirns (linker Abschnitt), des isolierten Hippokampus mit entorhinalen Kortex (mittlerer Abschnitt) und eines horizontalen Schnittes durch den Hippokampus (rechter Abschnitt). In Letzterem sind die einzelnen Bereiche der Hippokampusformation beschriftet: Gyrus dentatus (GD), Cornu ammonis Areal 1 und Areal 3 (CA1, CA3) und Subikulum (SUB). Ferner ist die Lage des entorhinalen Kortex (EK) markiert.

Die von Camillo Golgi (1843-1926), einem italienischen Mediziner und Histologen, im Jahre 1885 veröffentlichte Schrift „*Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso*“ gilt als eines der wichtigsten, bis dato veröffentlichten Werke über die Struktur des Nervensystems.⁵ Auf Grundlage der von Golgi selbst entwickelten Silbernitrat-Färbung (Golgi-Färbung) fertigte er Zeichnungen an, die neuronale Strukturen mit einem beeindruckenden Detailreichtum zeigten und einen Meilenstein in der Erforschung neuronaler Anatomie darstellten. 1906 erhielt Golgi für seine Untersuchungen zur feingeweblichen Anatomie des Nervensystems gemeinsam mit Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin.

Abbildung 2 zeigt Modifizierungen zweier berühmter Arbeiten Golgis von 1886, auf denen Neuronen und ihre Ausläufer innerhalb der hippocampalen Formation zu sehen sind. Unter anderem waren es die Zeichnungen von Golgi, die die Grundlage für die Unterscheidung verschiedener Areale innerhalb der hippocampalen Formation bildeten.^{5,6} Unter zytoarchitektonischen Gesichtspunkten lassen sich innerhalb der hippocampalen Formation drei Bereiche unterscheiden: Gyrus dentatus, Cornu ammonis (Ammonshorn) und Subikulum (Abbildung 2). Anhand der unterschiedlichen Größe von Pyramidenzellen im Cornu ammonis lässt sich dieses weiter in drei Areale untergliedern, die als CA1, CA2 und CA3 bezeichnet werden.⁷ Die einzelnen Bereiche der hippocampalen Formation unterscheiden sich maßgeblich bezüglich ihrer histologischen und neurochemischen Eigenschaften sowie ihrer neuronalen Konnektivität.^{1,4,8}

Die ventrikuläre Oberfläche der hippocampalen Formation zeigt eine dünne Schicht myelinisierter Fasern, die in ihrer Gesamtheit als Alveus bezeichnet werden. Diese vereinigen sich zunächst in die Fimbria hippocampi. Unterhalb des Corpus callosum gehen die hippocampalen Faserstränge schließlich in die Faserstruktur des Fornix cerebri über.^{1,4,8}

Histologisch weist der Hippokampus, im Gegensatz zu dem sechsschichtigen Isokortex der phylogenetisch jüngeren Anteile der Großhirnrinde, eine dreischichtige allokortikale Struktur auf. Ein Allokortex findet sich bei entwicklungs geschichtlich älteren Hirnarealen wie der hippocampalen Formation (dann bezeichnet als Archikortex) sowie dem Riechhirn.^{8,9} Die laminare Organisation ähnelt sich grundsätzlich in allen Bereichen der hippocampalen Formation. Die im Gyrus dentatus tiefer gelegene und im Cornu ammonis an den Alveus angrenzende Schicht ist polymorph und beinhaltet die basalen Dendriten der Prinzipalzellen, afferente und efferente Faserstränge sowie Interneurone. Im Gyrus dentatus bildet diese den sogenannten Hilus, im Cornu ammonis und dem Subikulum wird sie Stratum oriens genannt. Das Stratum oriens ist im Subikulum nur sehr schwach ausgebildet und oft nicht eindeutig abgrenzbar. Oberhalb dieser Schicht befindet sich eine zellreiche Schicht aus Prinzipalzellen und hemmenden GABAergen Interneuronen. Im Gyrus dentatus besteht diese aus Körnerzellen (Stratum granulosum), in Cornu ammonis und Subikulum aus Pyramidenzellen (Stratum pyramidale). Die dritte Archikortexschicht, das Stratum moleculare, enthält die apikalen Dendriten der Prinzipalzellen und zahlreiche Axone. Im Cornu ammonis kann das Stratum moleculare weiter in Stratum lucidum (nur in CA3), Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare unterteilt werden. Das Stratum pyramidale des Subikulums ist, verglichen mit der CA1-Region, weiter und zellulär weniger dicht gepackt und enthält große, gleichförmige Somata subikulärer Pyramidenzellen.^{8,10}

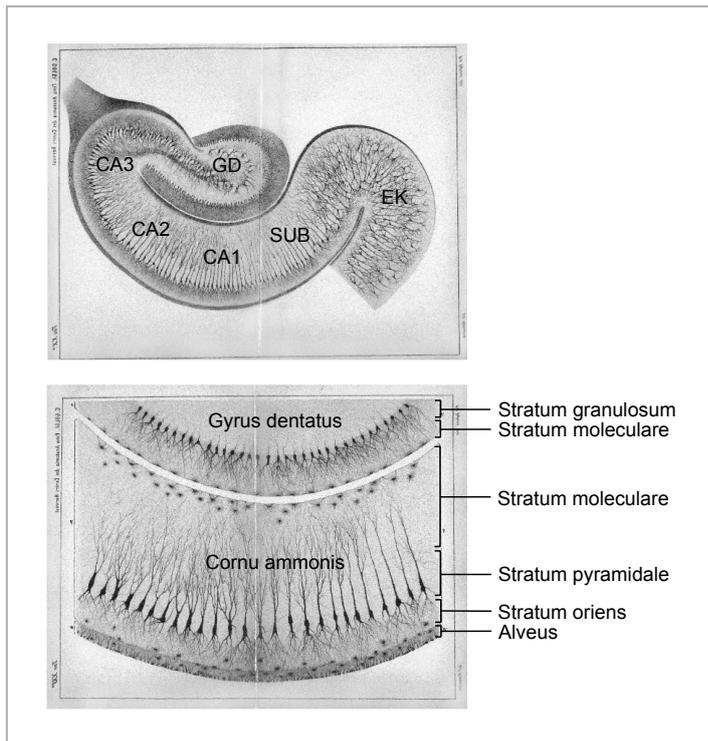


Abbildung 2

Zeichnungen von Camillo Golgi (1843-1926) aus dem Jahr 1886. Beschriftungen wurden nachträglich hinzugefügt. Oben: „PLATE XX“. Schnitt durch die mit Silbernitrat gefärbte hippocampale Formation einer neugeborenen Katze. Beschriftet sind die Bereiche der hippocampalen Formation: Gyrus dentatus (GD), Cornu ammonis Areal 1-3 (CA1, CA2, CA3) und Subikulum (SUB). Ferner ist die Lage des entorhinalen Kortex (EK) markiert. Unten: „PLATE XXI“. Teilansicht eines Schnitts durch die mit Silbernitrat gefärbte hippocampale Formation eines Kaninchens. Beschriftungen markieren die Lage des Alveus, die Dreischichtung im Cornu ammonis sowie zwei der drei Schichten des Gyrus dentatus. Modifiziert nach Bentivoglio und Swanson (2001) „*On the fine structure of the pes Hippocampi major (with plates XIII-XXIII)*“.5

1.1.2 Schaltkreise in der hippocampalen Formation

Die intrinsischen hippocampalen Verschaltungen stellen sich als unidirektionale, erregende, glutamaterge Neuronenkette dar. Wie in Abbildung 3 vereinfacht dargestellt, verläuft der Informationsfluss in der Hippokampusformation vom entorhinalen Kortex zum Gyrus dentatus über das Cornu ammonis zum Subikulum. Das afferente System der hippocampalen Formation wird durch den Gyrus dentatus repräsentiert. Die Körnerzellen des Gyrus dentatus werden über den von Sternzellen des entorhinalen Kortex ausgehenden Tractus perforans erregt. Sie projizieren mit ihren als Moosfasern bezeichneten Axonen zu den Pyramidenzellen der CA3-Region. Axone der CA3-Pyramidenzellen ziehen als Schaffer-Kollaterale zu den CA1-Pyramidenzellen. Das Subikulum erhält wiederum Projektionen von Pyramidenzellen der CA1-Region. Subikuläre Pyramidenzellen senden ihrerseits exzitatorische Projektionen aus, mit denen sie zum einen wieder in den entorhinalen Kortex, zum anderen zu verschiedenen kortikalen und subkortikalen Regionen gelangen. Somit stellt das Subikulum als Ausgangsstruktur der hippocampalen Formation den efferenten Anteil des Systems dar.^{1,4,8,11,12}

Neben dem beschriebenen primären Schaltkreis durch die hippocampale Formation bestehen zusätzlich direkte Projektionen aus dem entorhinalen Kortex in alle Areale der hippocampalen Formation.^{4,13} Eine Übersicht über den Informationsfluss innerhalb der hippocampalen Formation sowie eine Auswahl afferenter extrahippokampaler Projektionen in den entorhinalen Kortex kann Abbildung 3 entnommen werden.

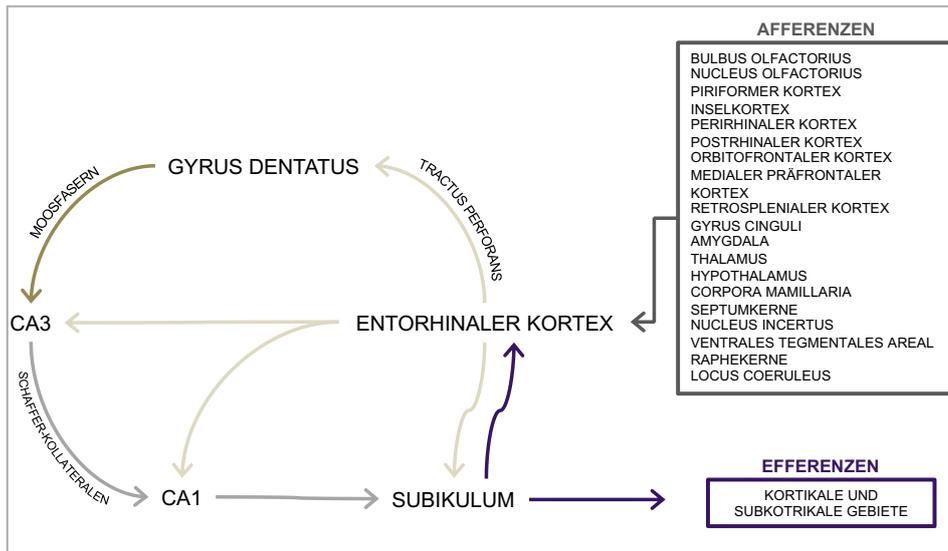


Abbildung 3 Projektionen in den entorhinalen Kortex und hippocampale Verbindungen. Abbildung zeigt eine schematische Darstellung ausgewählter Projektionen in den entorhinalen Kortex sowie afferente und efferente Verbindungen innerhalb der hippocampalen Formation. Der entorhinale Kortex wird von Afferenzen zahlreicher kortikaler und subkortikaler Gebiete erreicht. Geschwungene Pfeile deuten wichtige Projektionen innerhalb der hippocampalen Formation unter Einbeziehung des entorhinalen Kortex an: Tractus perforans, Moosfasern, Schaffer-Kollaterale. Das Subikulum bildet als Ausgangsstruktur der hippocampalen Formation eine wichtige Schnittstelle zu kortikalen und subkortikalen Gebieten.

1.1.3 Funktionen der hippocampalen Formation

Spätestens seit dem 1957 erschienenen Bericht von William Scoville und Brenda Milner über den Patienten Henry Molaison (auch bekannt als Patient H.M.) weiß man, dass es bei Entfernung oder Zerstörung beider Hippokampi zu ausgeprägten Gedächtnisstörungen kommt. Henry Molaison litt seit seiner Kindheit an rezidivierenden tonisch-klonischen epileptischen Anfällen, deren Ursprung der amerikanische Neurochirurg William Scoville in den medialen Temporallappen beider Hemisphären vermutete. Nach chirurgischer Entfernung dieser traten zwar keine epileptischen Anfälle mehr auf, jedoch zeigte Molaison eine starke anterograde und zeitlich abgestufte retrograde Amnesie. Hier wurde deutlich, dass der Hippokampus eine zentrale Rolle für die Gedächtnisfunktion des Gehirns spielen muss.¹⁴⁻¹⁶

Während das Kurzzeitgedächtnis eine Leistung des präfrontalen und posterior-parietalen Kortex zu sein scheint, wird dem Hippokampus eine Beteiligung am Speicherungsprozess von Informationen im Langzeitgedächtnis zugeschrieben. Die Überführung von Informationen vom Kurz- in das Langzeitgedächtnis wird als Gedächtniskonsolidierung bezeichnet.^{16,17} Es lassen sich grundsätzlich zwei Formen des Langzeitgedächtnisses unterscheiden: Das deklarative (explizite) Gedächtnis und das nicht-deklarative (implizite) Gedächtnis. Dem nicht-deklarativen Gedächtnis wird eine Bedeutung für weitgehend unbewusste Phänomene wie Habituation,

Sensibilisierung, Konditionierung und prozeduralem Lernen zugeschrieben. Das deklarative Gedächtnis speichert vor allem bewusste Informationen, die als Wissen oder Erinnerung abgerufen werden können. Es kann weiter in zwei Komponenten aufgeteilt werden: Ein episodisches Gedächtnis (autobiographisches Wissen, Erinnerung an Erlebnisse) und ein semantisches Gedächtnis (Faktenwissen, Wissen um die Bedeutung von Worten).^{16,18,19}

Der Hippokampus gilt als das anatomische Korrelat der Gedächtniskonsolidierung deklarativer, insbesondere episodischer Gedächtnisinhalte. Eine Schädigung des Hippokampus führt zu einer anterograden Amnesie mit dem Verlust der Fähigkeit neue Informationen in das Langzeitgedächtnis einzuspeisen.^{18,20,21} Diskutiert wird eine mögliche der Rolle hippocampalen Formation für die komplexe Organisation und Konsolidierung von Erlebnissen insbesondere im Kontext assoziativer, räumlicher und zeitlicher Faktoren.²² Die hippocampale Formation fungiert womöglich als eine Art temporärer Speicher für neue Informationen. Es wird vermutet, dass der Neokortex den endgültigen Speicherort für deklarative Gedächtnisinhalte darstellt.^{16,18,19}

Kortikale und hippocampale Netzwerkoszillationen spielen eine wichtige Rolle bei der Kodierung, Konsolidierung und dem Abrufen von Gedächtnisinhalten. Sie werden nach ihren Frequenzen kategorisiert und bestimmte Frequenzen konnten mit spezifischen Verhaltenszuständen in Verbindung gebracht werden. Als gedächtnisrelevante Aktivitätsmuster innerhalb der hippocampalen Formation finden sich Netzwerkoszillationen im Theta-Frequenzbereich (ca. 5-10 Hz), Gamma-Frequenzbereich (ca. 30-100 Hz) sowie *Sharp-Wave*-assoziierte *Ripple*-Oszillationen (ca. 120-220 Hz). Nach einer 1989 von György Buzsáki vorgeschlagenen Zwei-Stufen-Hypothese (engl. *two-step hypothesis of memory*) erfolgt die Integration neuer Informationen während Theta-Oszillationen und die anschließende Konsolidierung von Gedächtnisinhalten unter *Sharp-Wave*-assoziierten *Ripple*-Oszillationen.²³⁻²⁶

Ferner wurde eindrucksvoll gezeigt, dass der Hippokampus bei der Kodierung und Prozessierung von räumlichen Informationen, die für die Orientierung im Raum und Steuerung von Bewegungen bedeutsam sind, involviert ist. Die hippocampalen Neurone erfassen und verarbeiten räumliche Informationen innerhalb von Netzwerken spezifischer Zellen (*place cells*, *grid cells*, *border cells*, *head-direction cells*), die die unterschiedlichen räumlichen Informationen in eine Art räumliche Karte integrieren. Die Organisation von und der Zugriff auf räumliche Informationen ermöglicht zum einen die Formierung eines Ortsgedächtnisses und zum anderen die Verknüpfung von episodischen Erinnerungen an ihren räumlichen Kontext.^{22,27-30}

Neben diesen bereits länger bekannten Funktionen wird in neueren Veröffentlichungen beschrieben, dass eine anatomische und funktionelle Verbindung der hippocampalen Formation zu Schaltstellen des mesolimbischen Belohnungssystems wie zum Beispiel dem Nucleus accumbens besteht. Der Hippokampus scheint also auch an den neurobiologischen Prozessen, die der Kodierung von Erwartung, Bewertung und Motivation zugrunde liegen, beteiligt zu sein.^{31,32}

Ferner wird vermutet, dass Teile der hippocampalen Formation bei der neurobiologischen Antwort auf Stressoren, der Konditionierung von Furcht sowie dem resultierenden Furcht-assoziierten Verhalten eine steuernde Funktion übernehmen. Plausibel erscheint dies aufgrund der engen Verbindungen zwischen der hippocampalen Formation (insbesondere dem Subikulum) und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse.^{32,33}

Den genannten Funktionen der hippocampalen Formation ist gemein, dass sie eine dynamische und modellierbare Verarbeitung erfordern und somit im Grunde neuronale Lernvorgänge darstellen. Synaptische Plastizität - die aktivitätsabhängige Veränderung der synaptischen Übertragungsstärke - der hippocampalen Verschaltungen und ihrer extrahippocampalen Projektionen könnte das neurophysiologische Korrelat dieser neuronalen Lernvorgänge darstellen.^{16,34-37}

1.2 Das Subikulum

1.2.1 Subikulum, Präsubikulum, Parasubikulum

Der Begriff „subikulärer Komplex“ wird von einigen Autoren verwendet, um verschiedene, relativ kleine, kortikale Felder zusammenzufassen, die sich zwischen der CA1-Region und dem entorhinalen Kortex (ventral) beziehungsweise dem retrosplenialen Kortex (dorsal) befinden: Subikulum, Präsubikulum und Parasubikulum.^{8,38}

Das Subikulum unterscheidet sich maßgeblich von den anderen Regionen, die unter dem Begriff des subikulären Komplexes vereint werden. Unterschiede in der laminaren Architektur und der Konnektivität dieser Areale haben schließlich zum einen dazu geführt, dass das Subikulum eher der hippocampalen Formation zugeordnet wird, zum anderen, dass das Präsubikulum und das Parasubikulum mit dem entorhinalen Kortex, dem perirhinalen Kortex und dem postrhinalen Kortex als „parahippocampale Region“ gruppiert wird. Der Übergang der CA1-Region zum Subikulum ist durch die Verbreiterung und Auflockerung des Stratum pyramidale gekennzeichnet. Die Grenze des Subikulums zum Präsubikulum wird durch eine präsubikulär auftretende, zusätzliche oberflächliche laminare Schicht markiert.^{8,39}

Abbildung 4 zeigt die Mikrofotographie eines horizontalen Hirnschnittes, auf welchem die Bereiche der hippocampalen Formation sowie Teile der benachbarten parahippocampalen Region markiert sind.

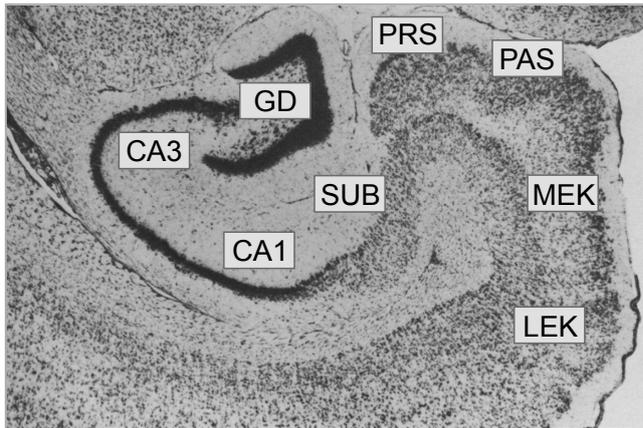


Abbildung 4

Mikrographie der hippocampalen Formation. Mikrographie eines mit Thionin gefärbten horizontalen Hirnschnitts durch die hippocampale Formation einer Ratte. Beschriftet sind die Bereiche der hippocampalen Formation: Gyrus dentatus (GD), Cornu ammonis Areal 1 (CA1) und Areal 3 (CA3), Subikulum (SUB) sowie benachbarte parahippokampale Kortices: Präsubikulum (PRS), Parasubikulum (PAS), medialer und lateraler entorhinaler Kortex (MEK, LEK). Modifiziert nach Amaral und Witter (1989) „*The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data*“.⁴

1.2.2 Afferente und efferente Verbindungen des Subikulums

Das Subikulum erhält eine Vielzahl intrahippokampaler sowie extrahippokampaler Eingänge, stellt den größten Ursprung efferenter Projektionen aus der hippocampalen Formation und fungiert so als Schnittstelle der Informationsverarbeitung zwischen dem Hippokampus und kortikalen sowie subkortikalen Strukturen.^{1,4,8}

Bei den afferenten Projektionen, die das Subikulum von Pyramidenzellen der CA1-Region erhält, gibt es eine Besonderheit: Die Projektionen sind entlang einer proximal-distalen Achse beider Regionen organisiert. Proximal (an das CA3-Areal angrenzend) gelegene CA1-Pyramidenzellen projizieren dabei in einer weiten Schleife über den Alveus und den tiefen Anteil des Stratum oriens zum distalen Subikulum, während distal (an das Subikulum angrenzend) lokalisierte CA1-Pyramidenzellen über das Stratum oriens zum proximalen Subikulum ziehen (Abbildung 5).^{40,41}

Weiterhin erhält das Subikulum direkte exzitatorische Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex. Der laterale entorhinale Kortex projiziert dabei zum proximalen Subikulum, wohingegen der mediale entorhinale Kortex Projektionen zum distalen Subikulum sendet.^{1,42} Neben den Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex erhält das Subikulum exzitatorische Afferenzen aus weiteren kortikalen Regionen wie dem perirhinalen Kortex und dem retrosplenialen Kortex. Außerdem wurden zahlreiche Eingänge in das Subikulum beschrieben, deren Ursprünge in subkortikalen Gebieten liegen. Zu nennen sind hier die Amygdala, der Thalamus, die Corpora mamillaria, die Septumkerne, der Nucleus incertus, das ventrale tegmentale Areal, der Locus coeruleus, die Raphe-Kerne sowie die Substantia nigra (Abbildung 5).^{32,39,43}

Subikuläre Pyramidenzellen senden ihrerseits exzitatorische Projektionen zu diversen kortikalen und subkortikalen Regionen. Ferner konnten direkte Projektionen von subikulären Pyramidenzellen in die CA1-Region nachgewiesen werden, was für eine bidirektionale Verbindung dieser zwei Areale spricht.⁴⁴⁻⁴⁷ Die kortikalen und subkortikalen Zielstrukturen der

orbitofrontalen Kortex, der Amygdala und dem Nucleus accumbens befanden sich im proximalen Subikulum, während im distalen Subikulum lokalisiert Pyramidenzellen zum Präsubikulum, dem medialen entorhinalen Kortex, dem retrosplenialen Kortex und dem Hypothalamus projizierten.^{48,49} Weiterhin wurde eine komplexe ventral-dorsale Segregation subikulärer Efferenzen und vor allem auch der afferenten Projektionen in das Subikulum beschrieben.^{32,39,43,51} Aus der Organisation subikulärer Projektionen entlang von anatomischen Achsen lässt sich schlussfolgern, dass die mit den verschiedenen Projektionen verknüpften, hippokampalen beziehungsweise subikulären Schlüsselfunktionen ebenfalls eine topographische Organisation aufweisen könnten.^{32,43,48,49,52}

1.2.3 Funktionen und pathophysiologische Bedeutung des Subikulums

Die Diversität und Komplexität der afferenten und efferenten Projektionen legt nahe, dass dem Subikulum keine einzelne spezifische Funktion zugeordnet werden kann. Vielmehr scheint das Subikulum durch seine besondere Lage innerhalb der hippokampalen Formation eine Schnitt- und Schaltstelle dieser Einheit zu sein.

Von Shane O'Mara et al. (2001) wurde vorgeschlagen, dass eine Schlüsselfunktion des Subikulums darin liegen könnte, die durch Inhibition im Gyrus dentatus stark gefilterten Signale für die kortikale und subkortikale Weiterleitung zu amplifizieren.⁵³ Ein von Shane O'Mara et al. (2005, 2009) entwickeltes Modell - „*model of subicular function(s)*“ - stellt eine Verknüpfung zwischen den möglichen Funktionen des Subikulums und der Topographie von afferenten und efferen Projektionen her.^{32,50} Die Funktion des dorsalen Subikulums wird hier in Anlehnung an Ergebnisse von Läsionsstudien vor allem bei der Integration von räumlichen und bewegungsassoziierten Informationen sowie der Gedächtnisfunktion gesehen.^{32,54,55} Das ventrale Subikulum hingegen nimmt in diesem Modell hauptsächlich inhibitorischen Einfluss auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und wirkt damit hemmend auf Stress-Reaktionen.^{32,33,56}

In einer aktuellen Veröffentlichung konnte mittels optogenetischer Methoden gezeigt werden, dass das dorsale Subikulum, beziehungsweise der Pfad zwischen CA1-Areal, dorsalem Subikulum und medialem entorhinalen Kortex insbesondere für den Abruf von episodischen Gedächtnisinhalten essenziell ist.⁵⁷ Ähnliche Überlegungen lassen sich auch in Bezug auf die unterschiedlichen Zielregionen anstellen, die Gruppierungen subikulärer Pyramidenzellen entlang der proximal-distalen Achse des Subikulum aufweisen.^{43,48,49} Mark Cembrowski et al. (2018) konnten mittels akutem zelltypspezifischem neuronalen *Silencing* von proximal oder distal lokalisierten Pyramidenzellen zeigen, dass die distale Population subikulärer

Pyramidenzellen wesentlich für die Gedächtnisbildung während einer räumlichen Arbeitsgedächtnisaufgabe (engl. *spatial working memory task*) ist.⁴⁹

Jenseits dieser vergleichsweise theoretischen Implikationen wird von einer Beteiligung des Subikulums an der Pathogenese verschiedener neurologisch-psychiatrischer Erkrankungen beim Menschen ausgegangen. Vielfach diskutiert wurde und wird eine pathophysiologische Beteiligung des Subikulums bei der Alzheimer-Erkrankung. Beispielsweise zeigten histologische *post mortem* Gewebeuntersuchungen von an Alzheimer-Demenz erkrankten Patienten im Subikulum ausgeprägte Zellverluste, vergesellschaftet mit einer großen Dichte extrazellulärer Ablagerungen von Beta-Amyloid.⁵⁸⁻⁶⁰ Ferner wurde im Rahmen von *Neuroimaging-Studien* gesehen, dass sich die progressive Atrophie des Hippokampus bei Patienten mit Alzheimer-Demenz interessanterweise am frühesten im Subikulum manifestiert.⁶¹ Die funktionelle Isolierung des Subikulums von seinen intra- und extrahippokampalen Afferenzen zum einen, sowie von seinen kortikalen und subkortikalen Zielregionen zum anderen, könnte das strukturelle Korrelat der klinischen Erscheinung der Alzheimer-Erkrankung sein.^{59,60}

Weiterhin wird eine Beteiligung des Subikulums an der Initiierung von epileptischen Anfällen im Rahmen von Temporallappenepilepsien angenommen.⁶²⁻⁶⁶ Das Subikulum wurde ferner als eine der Regionen identifiziert, die im Rahmen von Schizophrenien prominente zytoarchitektonische Veränderungen und eine aberrante funktionelle Konnektivität aufweisen. Es wird vermutet, dass diese Veränderungen zur psychotischen und kognitiven Symptomatologie der Störung beitragen.⁶⁷⁻⁷⁰ Außerdem sind Veränderungen von hippokampaler Form und Volumen häufig beobachtete strukturelle Anomalien bei schweren depressiven Störungen. Im Rahmen von *Neuroimaging-Studien* wies hierbei insbesondere das Subikulum starke strukturelle Veränderungen auf.⁷¹⁻⁷³ Darüber hinaus wird in aktuellen Veröffentlichungen darauf hingewiesen, dass das ventrale Subikulum eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Abhängigkeitserkrankungen zu spielen scheint.^{31,74-76}

Um die Bedeutung des Subikulums sowohl im Rahmen physiologischer als auch pathophysiologischer Prozesse zu verstehen, ist es wichtig, Erkenntnisse über die Organisation, die Eigenschaften und das Zusammenspiel von Netzwerken, Zellen, Rezeptoren, Transmittern, Modulatoren und Genen im Subikulum zu gewinnen.

1.3 Subikuläre Pyramidenzellen

1.3.1 Burstende und regulär feuernde Zellen

Bei den Pyramidenzellen im Subikulum von Nagetieren und Menschen lassen sich entsprechend ihres elektrophysiologischen Entladungsverhaltens zwei Zelltypen unterscheiden. Sogenannte burstende Zellen (engl. *burst-firing cells*, *busting cells*, *intrinsically bursting cells*, BURST) feuern in Folge einer kurzen orthodromen/antidromen Stimulation oder depolarisierenden Strominjektion zwei oder mehr Aktionspotentiale in kurzen zeitlichen Abständen, während regulär feuernde Zellen (engl. *regular-firing cells*, *regular spiking cells*, REG) auf dieselbe Stimulation mit einem einzelnen Aktionspotential reagieren.⁷⁷⁻⁸³

Im Rahmen lang andauernder Strominjektionen zeigen BURST im Anschluss an die initiale selbstlimitierende burstende Entladung einzelne Aktionspotentiale oder weitere burstende Entladungen, gefolgt von einzelnen Aktionspotentialen, wobei sich die Frequenz proportional zur Stärke der Strominjektion verhält.^{80-82,84,85} Aus diesem Grund kann bei BURST weiter zwischen BURST mit lediglich einer burstenden Entladung (schwach burstende Zellen, engl. *weak bursting cells*) und BURST mit der Fähigkeit, mehrere burstende Entladungen zu generieren (stark burstende Zellen, engl. *strong bursting cells*), unterschieden werden.^{46,77,78} Bei REG zeigen sich bei lang andauernder Strominjektion mehrere Einzelentladungen in Form klar voneinander abgrenzbarer Aktionspotentiale, deren Frequenz ebenfalls von der Stärke der Strominjektionen abhängig ist.^{47,78,81,86,87} Beispiele für die zelltypspezifischen elektrophysiologischen Entladungsmuster finden sich in Abbildung 6.

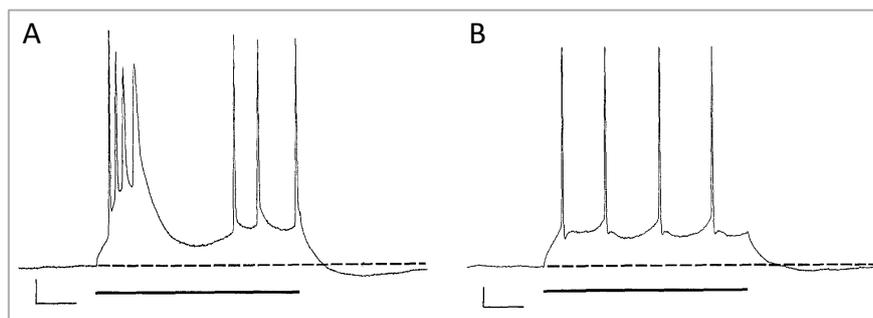


Abbildung 6 Entladungsmuster subikulärer Pyramidenzelltypen. Entladungsverhalten burstender (A) und regulär feuernder (B) subikulärer Pyramidenzellen als Reaktion auf eine depolarisierende Strominjektion von 50 pA (durchgezogene Linie). Gestrichelte Linie zeigt das Ruhemembranpotential. Maßstabsleisten: 10 mV, 20 ms. Modifiziert nach Taube (1993) „*Electrophysiological properties of neurons in the rat subiculum in vitro*“.⁷⁹

Die gängige Meinung ist, dass die beiden Zelltypen nicht ineinander konvertieren können.^{87,88} Anzumerken ist jedoch, dass in der Vergangenheit Veränderungen des Entladungsverhaltens bei Depolarisation des Membranpotentials beobachtet wurden: Depolarisationsbedingt kam es

bei BURST zu einem Entladungsmuster ähnlich dem von REG anstelle der zuvor beobachteten burstenden Entladungen.^{77,80,82,83} Dieses Phänomen konnte in anderen Studien jedoch nicht reproduziert werden.^{78,89} Außerdem wurde berichtet, dass REG unter repetitiver somatischer Stimulation fähig waren burstende Entladungen zu generieren. Diese burstenden Entladungen zeigten sich, im Gegensatz zu denen der BURST, gegen Ende des somatischen Stimulationsprotokolls.^{88,90}

Konversionsähnliche Phänomene wurden auch im Rahmen von Untersuchungen der dem burstenden Entladungsverhalten zugrundeliegenden Mechanismen beobachtet. Sie traten zum Beispiel auf, wenn Ionenkanäle geblockt wurden, die wahrscheinlich an der Initiierung, Aufrechterhaltung oder Terminierung des burstenden Entladungsverhaltens beteiligt sind.^{78,91-93}

Für die Entstehung burstender Entladungen sind vermutlich mehrere Ionenkanäle, darunter spannungsgesteuerte Calcium-Kanäle, verantwortlich. Grundsätzlich wird angenommen, dass ein durch ein vorausgehendes Aktionspotential aktivierter Calciumionen-Strom eine Depolarisation des Membranpotentials verursacht. Dadurch kann es bei Schwellenüberschreitung zur Auslösung von konsekutiven Aktionspotentialen kommen.^{92,93}

Zunächst wurden Calcium-Schweifströme (engl. *calcium tail currents*) durch hochspannungsaktivierte Calcium-Kanäle (vor allem vom R-Typ) in der Nähe des Somas als grundlegende Komponente der Nachdepolarisation identifiziert, die das burstende Entladungsverhalten auslöst.⁹² In einer Veröffentlichung von 2017 legte eine Gruppe von Wissenschaftlern unter Zuhilfenahme pharmakologischer, molekularer und genetischer Untersuchungsmethoden die essenzielle Rolle von niederspannungsaktivierten Calcium-Kanälen vom T-Typ für die Initiierung burstenden Entladungsverhaltens im Subikulum dar.⁹³

Die genaue funktionelle Bedeutung des burstenden Entladungsverhaltens im Subikulum ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Es wird davon ausgegangen, dass die durch das burstende Entladungsverhalten erhöhte Wahrscheinlichkeit der präsynaptischen Freisetzung von Neurotransmittern zu einer Verstärkung der Informationsweiterleitung führt.⁹⁴⁻⁹⁶ Außerdem wird angenommen, dass multiple Aktionspotentiale aus burstenden Entladungen in die Dendriten zurücklaufen (engl. *backpropagating actionpotentials*) und dort stärker Einfluss auf synaptische Integration und synaptische Plastizität nehmen könnten als ein einzelnes Aktionspotential.^{78,97}

Neben der funktionellen Relevanz des unterschiedlichen Entladungsverhaltens von BURST und REG stellt sich die Frage, ob diese Heterogenität das Vorhandensein verschiedener Zelltypen oder die Existenz lediglich eines einzelnen Zelltyps mit variabler Erregbarkeit widerspiegelt.^{78,86,88,98,99} Aktuelle Veröffentlichungen favorisieren zunehmend eine Aufteilung subikulärer Pyramidenzellen in distinkte Subpopulationen unter Berücksichtigung ihrer topographischen, funktionellen und elektrophysiologischen Charakteristika.^{48,49,88,100}

1.3.2 Elektrophysiologische Eigenschaften

Einzelne oder multiple Aktionspotentiale sind das Endprodukt synaptischer Integration, also der Verarbeitung eingehender Informationen auf synaptischer Ebene. Dieser Verarbeitungsprozess wird zum einen durch aktive, zum anderen durch passive Membraneigenschaften beeinflusst und kann so elektrophysiologisch untersucht werden.⁷⁸ Passive Membraneigenschaften bezeichnen dabei die „Kabeleigenschaften“ (engl. *cable properties*) von neuronalen Membranen, in denen sich die Kapazitäten und Widerstände dieser widerspiegeln. Aktive Membraneigenschaften beinhalten hingegen Prozesse an der neuronalen Membran für welche beispielsweise die Aktivierung spannungs- oder ligandengesteuerter Ionenkanäle eine Rolle spielt.¹⁶ Es besteht Uneinigkeit darüber, ob die beiden Zelltypen - jenseits des charakterisierenden burstenden oder regulär feuernenden Entladungsverhaltens - Unterschiede in ihren aktiven oder passiven elektrophysiologischen Eigenschaften aufweisen. In einigen Veröffentlichungen konnten zelltypspezifische Unterschiede beschrieben werden.^{48,85,88,98} Andere Autoren konnten hingegen keine signifikanten Unterschiede zwischen BURST und REG in Bezug auf die aktiven und passiven Membraneigenschaften finden.^{46,78,79,101} Der reproduzierbarste elektrophysiologische Unterschied bleibt also zunächst das Vermögen Aktionspotentiale in einem charakteristischen zeitlichen Muster zu feuern.

1.3.3 Zelltypspezifische Verteilung

Ein weitgehender Konsens besteht darin, dass die Anzahl an BURST im Subikulum gegenüber der Anzahl an REG überwiegt. Das genaue Verhältnis betreffend finden sich große Varianzen zwischen verschiedenen Veröffentlichungen.^{46-48,53,78-82,93,98,99,102} Interessanterweise zeigen BURST und REG eine unterschiedliche Verteilung innerhalb des Subikulums. Es wurde gezeigt, dass das Verhältnis von BURST zu REG entlang der proximal-distalen Achse des Subikulums (bezogen auf die Entfernung zum CA1-Areal) zunimmt.^{48,78,86,98} In der Vergangenheit gab es ferner Hinweise darauf, dass sich die zwei Klassen subikulärer Pyramidenzellen hinsichtlich ihrer Lage innerhalb des Stratum pyramidale unterscheiden. BURST wurden hierbei häufiger in den tiefen Schichten des Stratum pyramidale (näher am Alveus) detektiert, während der Anteil an REG in den oberflächlichen Schichten der Zellschicht (näher an der Fissura hippocampalis) größer war.^{47,77,84,98} In anderen Veröffentlichungen ließ sich dieser Zusammenhang jedoch nicht bestätigen.^{48,78,86} Ob solche Gradienten sowohl im ventralen als auch dorsalen Hippokampus existieren oder ob die Verteilung von BURST und REG entlang der dorsal-ventralen Achse variiert, ist noch nicht abschließend geklärt. Auch wenn sich noch keine klaren topographischen Trennlinien ziehen lassen, scheint das Vorkommen von BURST und REG zumindest entlang der proximal-distalen Achse organisiert zu sein.

1.3.4 Zelluläre Morphologie

Die Prinzipalzellen des Subikulums sind vergleichsweise groß und weisen die für ihren Zelltyp charakteristische Pyramidenform auf. Das triangulär geformte Soma entlässt kurze basale Dendriten, die im tiefen Anteil des Stratum pyramidale terminieren sowie lange apikale Dendriten, die sich im Stratum moleculare ausbreiten und teilweise bis zur Fissura hippocampalis reichen (Abbildung 7).^{46,47,79,98} An apikalen und basalen Dendriten wurden dendritische *Spines* – kleine, dendritische Membranvorwölbungen, die die postsynaptischen Komponenten exzitatorischer Synapsen darstellen – beobachtet.^{46,47,77,98} Es wurde außerdem gezeigt, dass die Axone subikulärer Pyramidenzellen zum einen innerhalb des Subikulums in die zellreiche Schicht und zu den apikalen Dendriten projizieren, zum anderen das Subikulum über den Alveus in Richtung ihrer Zielregionen verlassen.^{46,47,103} In den meisten bisherigen Veröffentlichungen wiesen das Soma, die Dendriten und die Axone von BURST und REG ähnliche morphologische Charakteristika auf.^{46,47,77-79,82,98,101,103,104} Einige andere Autoren fanden hingegen Hinweise auf zelltypspezifische Unterschiede in der apikalen Dendritenmorphologie.^{47,88,98}

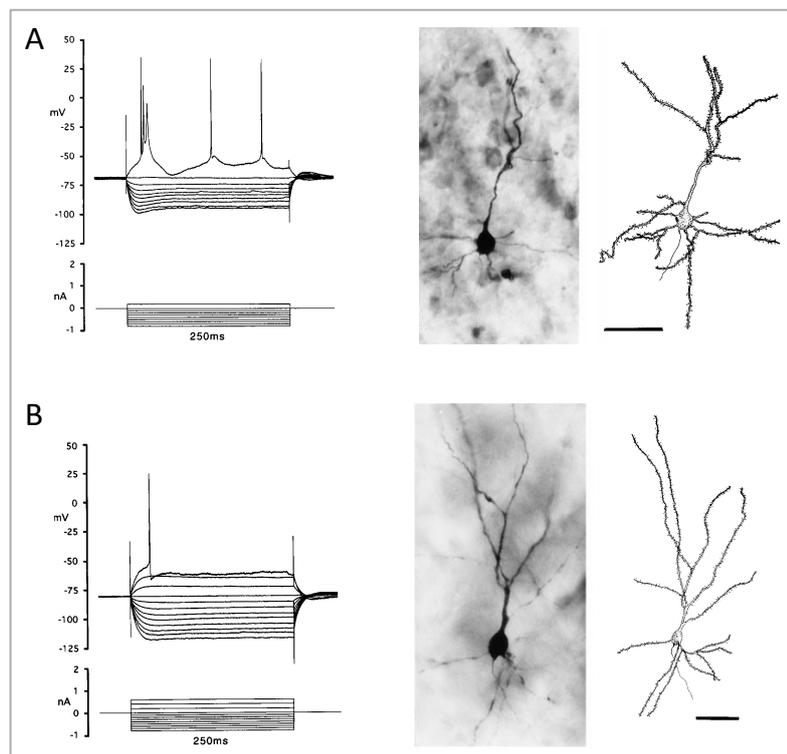


Abbildung 7 Subikuläre Pyramidenzelltypen. Entladungsverhalten burstender (A) und regulär feuernder (B) subikulärer Pyramidenzellen sowie Mikrophotographie und Camera-Lucida-Zeichnung der gleichen Pyramidenzelle. Modifiziert nach Greene und Totterdell (1997) „Morphology and distribution of electrophysiologically defined classes of pyramidal and nonpyramidal neurons in rat ventral subiculum in vitro“.⁹⁸

1.3.5 Konnektivität und extrahippokampale Projektionen

Zum einen stellt sich die Frage, inwieweit BURST und REG untereinander und mit Interneuronen lokal im Subikulum vernetzt sind, zum anderen ob sich Unterschiede in den extrahippokampalen Projektionsgebieten der beiden Zelltypen finden lassen.

Eine aktuelle Studie weist darauf hin, dass die beiden subikulären Zelltypen unterschiedlich in das lokale und neuronale Netzwerk integriert sind. Claudia Böhm et al. (2015) zeigten mittels multipler Patch-Clamp-Messungen erstens, dass BURST mit BURST und REG mit REG rekurrent verbunden sind und zweitens, dass eine unidirektionale Verbindungen von REG zu BURST besteht. Bemerkenswerterweise konnte keine Verbindungen von BURST zu REG beobachtet werden. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass Interneurone und REG in beide Richtungen stärker miteinander verbunden waren als Interneurone und BURST.¹⁰⁵

Interessant ist auch, dass BURST wesentlich stärker als REG an der oszillatorischen Netzwerkaktivität im Subikulum zu partizipieren scheinen.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸ Die geringere Beteiligung von REG an den Netzwerkrythmen könnte sich unter anderem durch die stärkere inhibitorische Verbindung zwischen Interneuronen und REG erklären lassen.^{105,109}

Bezogen auf die extrahippokampalen Projektionsgebiete des Subikulums konnte nachgewiesen werden, dass verschiedenen Zielregionen in unterschiedlichen Anteilen von Projektionen BURST und REG erreicht werden. Damit einhergehend wurde beobachtet, dass sich die kortikalen und subkortikalen Zielregionen von BURST und REG maßgeblich unterscheiden. Es wurde gezeigt, dass BURST vor allem zum medialen entorhinalen Kortex, dem Präsubikulum, dem retrosplenialen Kortex sowie dem Hypothalamus projizieren. Projektionen der REG erreichen vor allem den lateralen entorhinalen Kortex, den orbitofrontalen Kortex, die Amygdala und den Nucleus accumbens. Hier zeigen sich bei Rückbesinnung auf die Verteilung der zwei subikulären Pyramidenzelltypen innerhalb des Subikulums Übereinstimmungen mit der zuvor beschriebenen proximal-distalen Topographie der efferenten Projektionen.^{48,49} Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass jede Zielregion in Abhängigkeit der Lage der zu ihr projizierenden Zellen und Verteilung von BURST und REG innerhalb des Subikulums, Eingänge von unterschiedlichen Anteilen an BURST und REG erhält. Dies suggeriert einen durch das Subikulum organisierten parallelen Informationsfluss aus der hippocampalen Formation.^{48,49}

Aus den Informationen über die unterschiedlichen Projektionsgebiete subikulärer Pyramidenzellen lassen sich Vermutungen bezüglich ihrer Funktionen aufstellen: BURST projizieren in Regionen, die vor allem bei der Prozessierung räumlicher Informationen involviert sind, während REG in Regionen projizieren, die vor allem bei der Verarbeitung von nicht-räumlichen kontextualen und objekt-bezogenen Informationen eine Rolle spielen.^{88,109,110}

1.3.6 Zelltypspezifische molekulargenetische Marker

Lange Zeit gab es keine topographischen oder zelltypspezifischen genetischen Marker für Pyramidenzellen im Subikulum.

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Fibronectin-1-Expression einen Marker für Pyramidenzellen im dorsalen Subikulum darstellt. Eine auf das dorsale Subikulum beschränkte Cre-Expression wurde hier genutzt, um die Rolle des dorsalen Subikulums bei der Gedächtnisbildung und dem Abruf von Gedächtnisinformationen zu erforschen.⁵⁷ Eine andere Studie zeigte, dass sich Unterschiede in der Genexpression zwischen Pyramidenzellen im distalen und proximalen dorsalen Subikulum finden. Beispielsweise exprimieren subikuläre Pyramidenzellen im proximalen Subikulum Neuronatin, während eine Neurotensin-Expression in distalen subikulären Pyramidenzellen detektiert wurde.⁴⁹ Derzeit ist nicht bekannt, ob diese Marker-Gene zelltypspezifische Expression in subikulären Pyramidenzellen zeigen. Es muss angemerkt werden, dass im Rahmen einer weiteren Transkriptom-Analyse einzelner Pyramidenzellen im Subikulum keine Unterschiede in der Anzahl der exprimierten Gene und keine validen zelltypspezifischen Marker-Gene gefunden werden konnten.¹¹¹

In einer aktuellen Veröffentlichung meiner Arbeitsgruppe konnte von Christian Wozny et al. (2018) gezeigt werden, dass das Gen, welches für den vesikulären Glutamattransporter 2 (VGLUT2) kodiert, ein spezifisches Marker-Gen für BURST im Subikulum darstellt. Dabei wurde eine virale Genübertragung von Cre-abhängigen Channelrhodopsin-2-Expressions-Konstrukten auf VGLUT2-Cre-Mäuse genutzt.¹¹² Eine zelltypspezifische Expression von VGLUT2 konnte angenommen werden, da VGLUT2/Channelrhodopsin-2 exprimierende subikuläre Pyramidenzellen in der elektrophysiologischen Charakterisierung hauptsächlich ein burstendes Entladungsverhalten zeigten.^{108,112} Dieser molekulargenetische Marker konnte bereits für die optogenetische Untersuchung von zelltypspezifischen Projektionen in den medialen entorhinalen Kortex eingesetzt werden.¹¹² Ferner wurde er verwendet, um die zelltypspezifische Relevanz von BURST im Subikulum für die Ausbreitung von *Sharp-Wave-Ripple*-Oszillationen zwischen dem CA1-Areal und dem retrosplenialen Kortex zu untersuchen.¹⁰⁸

1.4 Neuronale Plastizität

1.4.1 Grundprinzipien der glutamatergen synaptischen Transmission

Synaptische Transmission bezeichnet den Prozess der Erregungsübertragung zwischen zwei Neuronen über eine chemische Synapse. Nahe des Zellkörpers generierte Aktionspotentiale gelangen zu Axonterminalen und vermitteln dort die Öffnung spannungsgesteuerter Calciumkanäle. Der Anstieg von Calciumionen in der Synapse vermittelt die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt durch Fusion von Transmittervesikeln mit der präsynaptischen Membran. Neurotransmitter diffundieren durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran und binden an spezifische Zielrezeptoren, wodurch es auf direktem (ionotroper Zielrezeptor) oder indirektem (metabotroper Zielrezeptor) Weg zur Öffnung oder Schließung von Ionenkanälen kommt. Hierdurch können exzitatorische oder inhibitorische postsynaptische Potentiale generiert werden.^{1,16}

Der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Hippokampus – wie im gesamten zentralen Nervensystem – ist Glutamat. Glutamat aktiviert die drei Haupttypen ionotroper Glutamat-Rezeptoren, die essenziell für die synaptische Transmission an erregenden Synapsen sind: (I) α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionsäure-Rezeptoren (AMPA-R), (II) N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-R) und (III) Kainat-Rezeptoren (Kainat-R). Ferner kann die glutamaterge synaptische Transmission durch prä- oder postsynaptisch lokalisierte metabotrope Glutamat-Rezeptoren moduliert werden. An den meisten erregenden Synapsen in der hippokampalen Formation werden exzitatorische postsynaptische Potentiale von postsynaptisch lokalisierten AMPA-R und NMDA-R erzeugt. Die Rolle der Kainat-R bei der synaptischen Transmission ist weniger gut verstanden. AMPA-R haben vier Untereinheiten (GluA1-4), zeigen eine schnelle Kinetik und sind permeabel für Natrium-, Kalium- und teilweise auch Calciumionen.^{1,16} NMDA-R weisen ebenfalls mehrere Untereinheiten auf (GluN1, GluN2A-D, GluN3). Funktionelle NMDA-R sind Heterotetramere, die aus zwei GluN1- und typischerweise zwei GluN2-Untereinheiten bestehen. Durch das Vorhandensein verschiedener GluN2-Untereinheiten ergeben sich unterschiedliche Rezeptor-Subtypen, die sich im Hinblick auf das Vorkommen und die Rezeptorkinetik unterscheiden und die funktionellen Eigenschaften des Rezeptors bestimmen. Die Zusammensetzung der Untereinheit des NMDA-Rezeptors ist dynamisch; sie kann sich im Laufe der Entwicklung sowie im Rahmen von synaptischer Plastizität und anderen physiologischen und pathophysiologischen Prozesse verändern. NMDA-R zeigen eine langsamere Kinetik und ihre Kanalpore ist bei negativen Membranpotentialen durch Magnesiumionen blockiert. Wird die Magnesiumblockade durch Depolarisation gelöst, sind NMDA-R vor allem für Calcium- und auch Natrium- und Kaliumionen permeabel.^{1,16,113,114}

1.4.2 Synaptische und nicht-synaptische Plastizität

Unter neuronaler Plastizität wird die Fähigkeit von Synapsen, Neuronen, neuronalen Netzwerken oder auch ganzen Hirnarealen verstanden, auf bestimmte intrinsische und extrinsische Reize mit einer Anpassung ihrer Struktur, Arbeitsweise und Funktion zu reagieren. Diese Dynamik ist für eine unbeeinträchtigte Entwicklung und Weiterentwicklung des zentralen Nervensystems essenziell und bildet die neurophysiologische Grundlage für Prozesse wie Lernen und Gedächtnis. Insbesondere Plastizitätsprozessen in der hippokampalen Formation wird hier eine zentrale Rolle zugeschrieben. Neuronale Plastizität beinhaltet ein breites Spektrum an Veränderungen auf vielen verschiedenen Organisationsebenen des Nervensystems. Es kann unter anderem zwischen synaptischer Plastizität und nicht-synaptischer Plastizität unterschieden werden.^{34,35,115,116}

Synaptische Plastizität bezeichnet die aktivitätsabhängige Veränderung der synaptischen Übertragungsstärke zwischen zwei Nervenzellen. Sie beinhaltet zum einen präsynaptische Veränderungen (zum Beispiel durch eine direkte Modulation der Neurotransmitterausschüttung oder der ausgeschütteten Neurotransmittermenge), zum anderen Modifikationen der postsynaptischen Antwort (zum Beispiel durch Veränderungen der Rezeptordichte oder von Rezeptoreigenschaften). Die Veränderungen können präsynaptisch, postsynaptisch oder auf beiden Seiten der Synapse auftreten. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind vielfältig und zum Teil zellspezifisch. Je nach Dauer der synaptischen Veränderungen wird zwischen Kurz- und Langzeitplastizität unterschieden.^{34,115,117}

Nicht-synaptische Plastizität (intrinsische Plastizität) beinhaltet Veränderungen am Zellkörper, dem Axon oder den Dendriten, die zu Modifizierungen der intrinsischen Erregbarkeit einer individuellen Nervenzelle führen können. Zum Beispiel können Veränderungen von nicht-synaptischen Ionenkanälen und Ionenpumpen die Membraneigenschaften einer Nervenzelle und damit ihre Erregbarkeit, ihr Entladungsverhalten und ihre Signalweiterleitung beeinflussen. Die Rolle dieser Plastizitätsform ist bisher noch nicht abschließend verstanden.¹¹⁸⁻¹²¹

Erwähnt werden sollten auch zwei weitere Phänomene, die im Rahmen neuronaler Plastizität beobachtet werden können: Homöostatische Plastizität und Metaplastizität. Homöostatische Plastizität bezeichnet die Fähigkeit von Nervenzellen, ihre Erregbarkeit in Abhängigkeit von der Netzwerkaktivität zu regulieren. Die homöostatische Plastizität zeigt sich unter anderem darin, dass die synaptische Stärke aller Synapsen einer individuellen Nervenzelle in Abhängigkeit von Veränderungen ihres Aktivitätszustandes adjustiert werden kann (engl. *synaptic scaling*).^{117,122} Metaplastizität ist ein Begriff, der die Plastizität synaptischer Plastizität beschreibt. Er beschreibt das Phänomen, dass vorausgegangene Aktivitätszustände einer Nervenzelle - auch wenn diese selbst keine direkten plastizitären Veränderungen zu Folge hatten - Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit einer zukünftigen Plastizitätsinduktion nehmen können.^{117,123}

1.4.3 Kurzzeitplastizität

Formen der synaptischen Plastizität, bei denen die Veränderungen der synaptischen Übertragungsstärke für Millisekunden bis einige Minuten andauern, werden als Kurzzeitplastizität (engl. *short-term plasticity*) bezeichnet. Kurzzeitplastizität findet sich an den meisten exzitatorischen Synapsen und ermöglicht Zellen eine schnelle Reaktion auf erfolgte synaptische Aktivierung durch kurzfristige Modulation der weiteren synaptischen Transmission.^{117,124,125}

Phänomene, die der Kurzzeitplastizität zugeordnet werden können, sind unter anderem Doppelpulsverstärkung (engl. *paired-pulse facilitation*, PPF) und Doppelpulsabschwächung (engl. *paired-pulse depression*, PPD): Bei Stimulation der Präsynapse mit zwei Stimuli innerhalb eines kurzen Zeitintervalls führt der zweite Stimulus entweder zu einer Verstärkung (PPF) oder Abschwächung (PPD) der synaptischen Übertragungsstärke.^{117,124,125}

Die PPF zeigt sich meist bei Stimulationsintervallen zwischen 20-500 ms und nimmt in der Tendenz bei einer Erhöhung des Interstimulusintervalls ab. Die PPF beruht wahrscheinlich auf einer Anhebung der präsynaptischen Calciumkonzentration. Nach einer gängigen Hypothese („Restcalcium-Hypothese“) strömt Calcium im Rahmen der ersten Stimulation in die Präsynapse und bewirkt hier die Freisetzung von Transmittervesikeln. Wenn die zweite Stimulation die Präsynapse erreicht, ist die Calciumkonzentration durch das verbliebene residuale Calcium folglich erhöht. Die hohe Calciumkonzentration führt dann zu einer vermehrten Ausschüttung von Transmittervesikeln, wodurch die zweite synaptische Antwort verstärkt wird. Die Mechanismen, die zu PPF führen, sind vermutlich wesentlich komplexer und vielschichtiger als das hier beschriebene Modell. Zum Beispiel gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Proteinkinasen und calciumsensitiven Proteinen.^{117,124-128}

Eine PPD zeigt sich vor allem, wenn die beiden Stimuli in sehr kurzen Zeitabständen (zum Beispiel 20 ms) appliziert werden. Es wird angenommen, dass der PPD unter anderem ein verbrauchsbedingter Mangel an schnell aus dem Vorrat verfügbaren Transmittermolekülen (engl. *readily release pool*) an der Präsynapse, eine direkte Modulation der Exozytose von Transmittervesikeln oder die Inaktivierung von Calcium-Kanälen zugrunde liegt.^{117,124,125,129}

Ein weiteres Phänomen ist die posttetanische Potenzierung (engl. *post-tetanic potentiation*, PTP): Nach längerer hochfrequenter Stimulation (200-5000 ms, 10-200 Hz) kommt es zu einer starken, meist einige Minuten anhaltenden Potenzierung der synaptischen Antwort. Viele Hypothesen zum Mechanismus der PTP gehen davon aus, dass auch hier die präsynaptische Calcium-Dynamik eine wichtige Rolle spielt. Vermutungen gehen auch in Richtung einer direkten Modulation des Prozesses der Transmitterausschüttung durch Proteinkinasen und calciumsensitive Proteine. Die PTP hält länger an, wenn die Stimulationsfrequenz oder die Stimulationsdauer erhöht werden. Sie wird meist von einem Abfall der Doppelpulsratio (engl. *paired-pulse ratio*) - Antwort auf die 2. Stimulation / Antwort auf 1. Stimulation - begleitet, was

einen präsynaptischen Ursprung wahrscheinlich macht. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht bekannt.^{117,124,125,130}

Ob und in welchem Ausmaß eine spezifische Nervenzelle PPF, PPD oder PTP zeigt, ist nicht sicher vorherzusagen. Die Ausprägung von Kurzzeitplastizität kann von vielen Faktoren beeinflusst werden. Hierzu zählen Charakteristika der Nervenzelle/Nervenzellpopulation wie die Freisetzungswahrscheinlichkeit von Neurotransmittern (engl. *probability of neurotransmitter release*), die wiederum aktivitätsabhängig und anderweitigen modulatorischen Veränderungen unterliegt, sowie nicht zuletzt auch die Umgebungsbedingungen wie zum Beispiel die extrazelluläre Calciumkonzentration. Zu den Faktoren, die die präsynaptische Freisetzungswahrscheinlichkeit beeinflussen können, gehören beispielsweise die Anzahl der vorrätigen Vesikel, die Anzahl und Art spannungsabhängiger Calcium-Kanäle sowie die spezifischen Proteine, die die durch Calcium initiierte Transmitterausschüttung vermitteln.^{117,131-133} Neben der weitgehend gesicherten Beteiligung präsynaptischen Calciums wurde auch eine postsynaptische Beeinflussung von Kurzzeitplastizität, zum Beispiel durch retrograd wirkende Botenstoffe oder Desensibilisierung postsynaptischer Rezeptoren beschrieben.^{117,134-136} Die genaue Funktion der Kurzzeitplastizität ist noch nicht verstanden. Vermutet wird, dass sie als eine Art Filter bei der Verarbeitung eingehender Signale fungiert.^{131,137}

1.4.4 Langzeitplastizität

Der kanadische Psychologe Donald Hebb formulierte bereits 1949 in seinem Buch „*The Organization of Behavior: A Neuropsychological Theory*“ eine als Hebb'sche Lernregel bekannt gewordene Theorie zu den neurobiologischen Prinzipien des Lernens in neuronalen Verbänden. Er postulierte, dass die simultane Aktivierung von zwei in Verbindung stehenden Nervenzellen zu einer Verstärkung ihrer synaptischen Verbindung und damit ihrer synaptischen Stärke führt.¹³⁸ Das zelluläre Korrelat der Hebb'schen Lernregel – die Langzeitpotenzierung – wurde erstmals im Jahr 1973 von Tim Bliss und Terje Lømo an der Tractus-perforans-Körnerzell-Synapse im Gyrus dentatus beschrieben.¹³⁹

Durch Langzeitplastizität (engl. *long-term plasticity*) vermittelte Veränderungen der synaptischen Übertragungsstärke können in einem Zeitraum von mehreren Minuten bis zu Stunden und vermutlich auch noch länger bestehen. Dabei wird eine Verstärkung der synaptischen Übertragung als Langzeitpotenzierung (engl. *long-term potentiation*, LTP) und eine Abschwächung als Langzeitdepression (engl. *long-term depression*, LTD) bezeichnet.^{35,115} LTP und LTD beschreiben dabei das Phänomen der aktivitätsabhängigen Veränderung der synaptischen Stärke in die eine oder andere Richtung (LTP, LTD) und keine spezifischen Prozesse mit uniformen zugrundeliegenden Mechanismen. Es gibt also zum einen

verschiedene Formen synaptischer Langzeitplastizität und zum anderen viele Varianten von LTP und LTD, die nebeneinander und miteinander wirken. Die Richtung der Veränderung kann ferner durch zahlreiche Faktoren beeinflusst und umgekehrt werden.³⁵ Langzeitplastizität gilt als ein allgemein anerkanntes zelluläres Modell für Lernen und Gedächtnis, wobei den plastizitären Veränderungen innerhalb der hippokampalen Formation eine zentrale Rolle zukommt.^{34,35,115,140} Bei der LTP können eine von der Induktion durch den NMDA-R-abhängige und eine NMDA-R-unabhängige Form unterschieden werden. Die Aufrechterhaltung der Veränderungen der synaptischen Transmission über Stunden und Tage wird vor allem durch morphologische Anpassungsvorgänge und eine verstärkte Synthese relevanter Proteine (*de novo* Transkription und lokale dendritische Proteinsynthese) gewährleistet.^{117,141,142} Morphologische Anpassungsvorgänge, die im Rahmen von Langzeitpotenzierung auftreten, sind zum Beispiel eine Vergrößerung, Aussprossung und Spaltung dendritischer *Spines*.¹⁴³⁻¹⁴⁵

NMDA-Rezeptor-abhängige Langzeitpotenzierung

Die LTP wurde am umfangreichsten an der hippokampalen Schaffer-Kollateral-CA1-Synapse zwischen den Pyramidenzellen des CA3- und CA1-Areals untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Induktion von LTP in der Regel eine Aktivierung von postsynaptisch lokalisierten NMDA-R voraussetzt.¹⁴⁶ NMDA-R werden, wie schon erwähnt, durch extrazelluläre Magnesiumionen blockiert, welche sich unter Membrandepolarisation von ihrer Bindungsstelle am NMDA-R lösen.^{147,148} Diese Depolarisation kann zum Beispiel in Folge einer starken Aktivierung postsynaptisch lokalisierter AMPA-R, welche zu einem Einstrom von Natriumionen führt, erfolgen. Zu einer starken Aktivierung von AMPA-R kommt es zum Beispiel im Rahmen der simultanen Aktivierung multipler synaptischer Verbindungen. Der NMDA-R-vermittelte Calciumstrom leitet über eine Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II die Expressionsmechanismen der LTP ein.^{35,117,149-152} Zur Auslösung dieser Form der LTP im experimentellen Kontext eignet sich zum einen eine hochfrequente tetanische Stimulation und zum anderen ein gepaartes Protokoll (engl. *pairing-protocol*), bestehend aus einer direkten postsynaptischen Depolarisation zusammen mit einer niederfrequenten synaptischen Stimulation.¹¹⁷ Eine weitere Form ist die „*Spike-Timing-Dependent-Plasticity*“ (STDP), bei der die LTP-Induktion von der zeitlichen Abfolge von eingehenden und postsynaptisch induzierten Aktionspotentialen in einem engen Zeitfenster abhängig ist. An den meisten exzitatorischen Synapsen wird STDP-LTP durch ein präsynaptisch induziertes postsynaptisches Potential ausgelöst, welchem unmittelbar in die Dendriten zurücklaufende postsynaptische Aktionspotentiale folgen.¹⁵³

Interessanterweise spiegelt sich in der NMDA-R-abhängigen LTP die Hebb'sche Lernregel wider: Die Induktion einer LTP bedarf zum einen einer präsynaptischen Transmitterausschüttung (ausgelöst durch ein einkommendes Signal) und zum anderen einer

starken postsynaptischen Depolarisation (ausgelöst durch die simultane Aktivierung multipler Synapsen). Der NMDA-R wird in diesem Zusammenhang daher oft als „Koinzidenzdetektor“ (engl. *coincidence detector*) bezeichnet.^{1,117,154}

Für die Expressionsmechanismen NMDA-R-abhängigen LTP gibt es Hinweise für sowohl präsynaptischer (Erhöhung der Transmitterfreisetzung) als auch postsynaptische (Phosphorylierung und Einbau von AMPA-R) Mechanismen.^{35,117,149-152} Präsynaptische Mechanismen der LTP-Expression sind insbesondere deshalb interessant, da sie – angenommen die LTP wird postsynaptisch NMDA-R-abhängig induziert - eine retrograde Kommunikation erfordern.^{117,151} Als mögliche retrograd wirkende Botenstoffe werden unter anderem Endocannabinoide und der Wachstumsfaktor BDNF (engl. *brain-derived neurotrophic factor*) diskutiert.¹⁵⁵⁻¹⁶⁰ Ferner gibt es auch Evidenz für eine über präsynaptisch lokalisierte NMDA-R vermittelte Induktion präsynaptischer Formen von Langzeitplastizität.¹⁶⁰⁻¹⁶²

NMDA-Rezeptor-unabhängige Langzeitpotenzierung

An Synapsen verschiedener Hirnareale bestehen Nachweise für eine Form der LTP, die unabhängig von einer Aktivierung des NMDA-R zu sein scheint. Eine der ersten Beschreibungen einer solchen LTP-Form wurde an der hippokampalen Moosfaser-CA3-Synapse zwischen den Körnerzellen des Gyrus dentatus und den Pyramidenzellen der CA3-Region gemacht.¹⁶³ Dieser Form der LTP scheint alleinig oder überwiegend ein präsynaptischer Induktions- und Expressionsmechanismus zugrunde zu liegen. LTP kann hier experimentell durch repetitive hochfrequente Stimulation ausgelöst werden. Für die Induktion der NMDA-unabhängigen LTP wird neben einem rein präsynaptischen Mechanismus auch ein heterosynaptischer Mechanismus im Sinne einer Beteiligung retrograder Botenstoffe aus dem postsynaptischen Neuron diskutiert.¹⁶⁰ Die gängige Hypothese ist jedoch, dass durch eine präsynaptisch erhöhte Calciumkonzentration die Calcium/Calmodulin-abhängige Adenylylzyklase I aktiviert wird. Dies führt zu einem präsynaptischen Anstieg von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Die PKA bewirkt über eine Phosphorylierung transmissionsrelevanter präsynaptischer Substrate eine langanhaltenden Verstärkung der Transmitterausschüttung.^{164,165} Als transmissionsrelevante präsynaptische Substrate der PKA erwiesen sich zwei Proteine, die an der Exozytose von synaptischen Vesikeln beteiligt sind und bei denen ein *Gen-Knockout* die Expression von LTP verhinderte: Das synaptische Vesikelprotein Rab3A und sein Bindungspartner Rim1alpha, einem Protein aus der aktiven Zone.^{117,166-169}

Langzeitdepression

LTD bezeichnet eine lang andauernde Verminderung der synaptischen Übertragungsstärke und kann an fast allen exzitatorischen Synapsen beobachtet werden. Eine Induktion von LTD im experimentellen Kontext kann durch langandauernde niederfrequente Stimulation erreicht werden.^{35,170,171}

Bekannt ist, dass neben einer LTD, deren Induktion eine NMDA-R-Aktivierung benötigt, zahlreiche weitere Formen bestehen. Beispielsweise finden sich Formen von LTD, deren Induktion von einer Aktivierung metabotroper Glutamat-Rezeptoren oder präsynaptischer Endocannabinoid-Rezeptoren abhängig ist.^{35,117} Wie schon erwähnt, kann eine LTD auch im Rahmen von STDP-Protokollen in einem engen Zeitfenster induziert werden. An den meisten exzitatorischen Synapsen kann die STDP-LTD durch in die Dendriten zurücklaufende postsynaptische Aktionspotentiale ausgelöst werden, denen unmittelbar ein präsynaptisch induziertes postsynaptisches Potential folgt.¹⁵³ Insgesamt scheinen die Mechanismen der Induktion und Transduktion von LTD ähnlich divers und zellspezifisch zu sein, wie es bei der LTP der Fall ist. Als „Gegenspieler“ der LTP kommt es im Rahmen der LTD zu einer Dephosphorylierung postsynaptischer AMPA-R und ihrer Endozytose, wodurch die postsynaptische Empfindlichkeit gegenüber den präsynaptisch sezernierten Neurotransmittern herabgesetzt wird.¹¹⁷

1.4.5 Neuronale Plastizität an der CA1-Subikulum-Synapse

Die basale synaptische Transmission an der CA1-Subikulum-Synapse wird über die glutamaterge Aktivierung von AMPA-R und NMDA-R vermittelt.^{79,172} Es konnte beobachtet werden, dass die synaptischen Eingänge auf BURST, nicht aber auf REG eine Modulation durch präsynaptisch lokalisierte metabotrope Glutamat-Rezeptoren der Gruppe II erfahren.¹⁷³

Langanhaltende hochfrequente Stimulation der synaptischen Eingänge induziert synaptische LTP in subikulären Pyramidenzellen.^{101,174-177} Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung des Wachstumsfaktors BDNF an der Induktion von LTP in beiden Zelltypen.⁹⁰

Spannend ist, dass BURST und REG unterschiedliche Formen der LTP aufzuweisen scheinen (Abbildung 8).^{101,178} Christian Wozny (2008) et al. konnten zeigen, dass REG eine NMDA-R-abhängige LTP-Form ausprägen, bei der die postsynaptische Calciumkonzentration eine grundlegende Rolle spielt und die einen postsynaptischen Ursprung zu haben scheint. Die LTP der REG weist somit Ähnlichkeiten mit der an der Schaffer-Kollateral-CA1-Synapse beschriebenen LTP auf. Ferner konnten die Wissenschaftler bei BURST eine ebenfalls NMDA-R-abhängige LTP-Form mit einer Beteiligung präsynaptischen Calciums und vermutlich präsynaptischem Ursprung beobachten.¹⁰¹ Außerdem wurde gezeigt, dass es im Rahmen der

LTP bei BURST zu einer Aktivierung der Adenylylzyklase-cAMP-PKA-Kaskade kommt.¹⁷⁹ BURST scheinen also – die NMDA-R-Abhängigkeit außer Acht gelassen – eine präsynaptische LTP-Form zu exprimieren, die an die LTP der Moosfaser-CA3-Synapse erinnert.

Ob die an der LTP-Induktion von BURST und REG beteiligten NMDA-R demnach auch eine prä- oder postsynaptische Lokalisation aufweisen ist bisher nicht abschließend geklärt. In verschiedenen Hirnregionen konnten über präsynaptisch lokalisierte NMDA-R vermittelte präsynaptische Formen von LTP beobachtet werden.¹⁶⁰⁻¹⁶² Weiterhin erscheint auch eine retrograde Modulation der präsynaptischen Calciumkonzentration über postsynaptische NMDA-R, wie sie in der Vergangenheit für die Schaffer-Kollateral-CA1-Synapse modellhaft beschrieben wurde, denkbar.¹⁸⁰

Es ist anzunehmen, dass sich die Zusammensetzung des NMDA-R, bezogen auf die Untereinheiten, zwischen prä- und postsynaptisch lokalisierten NMDA-R unterscheidet.³⁶ In vielen kortikalen Arealen wurden präsynaptische NMDA-R, die eine GluN2B-Untereinheit enthalten gefunden.¹⁸¹⁻¹⁸³ Dieser Umstand könnte erklären, warum sich LTP im Subikulum durch hohe Konzentrationen des NMDA-R-Antagonisten AP5 (ähnliche Affinität zu GluN2A und GluN2B) inhibieren ließ, jedoch nicht durch den NMDA-R-Antagonisten CPP (größere Affinität zu GluN2A gegenüber GluN2B).^{36,101,174,176,177,184}

LTD kann im experimentellen Kontext durch niederfrequente Stimulation ausgelöst werden, wobei ein postsynaptischer Mechanismus unter Beteiligung postsynaptischen Calciums angenommen wird.^{35,185,186} Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass subikuläre Pyramidenzellen eine zelltypspezifische Antwort auf niederfrequente Stimulation zeigen. In BURST wurde durch niederfrequente Stimulation eine LTD ausgelöst, während bei REG als Antwort eine zeitlich verzögerte LTP auftrat. Die „Richtung“ der Plastizität konnte mittels pharmakologischer Manipulation umgekehrt werden: Nach Hemmung metabotroper Glutamat-Rezeptoren prägten auch REG eine LTD aus, während bei BURST nach NMDA-R-Blockade eine LTP zu beobachten war (bidirektionale Plastizität).¹⁸⁶ Ferner scheint eine Koaktivierung G-Protein-gekoppelter muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren für die Plastizitätsinduktion nach Niederfrequenzstimulation notwendig zu sein.^{185,187}

Erstaunlicherweise zeigte sich, dass LTP und LTD durch STDP im Subikulum, im Vergleich zu anderen exzitatorischen Synapsen, durch eine Anwendung der entgegengesetzten Induktionsprotokolle ausgelöst werden können. Ferner unterschieden sich die der STDP-LTD zugrundeliegenden Mechanismen zwischen den beiden subikulären Pyramidenzelltypen erheblich.¹⁸⁸

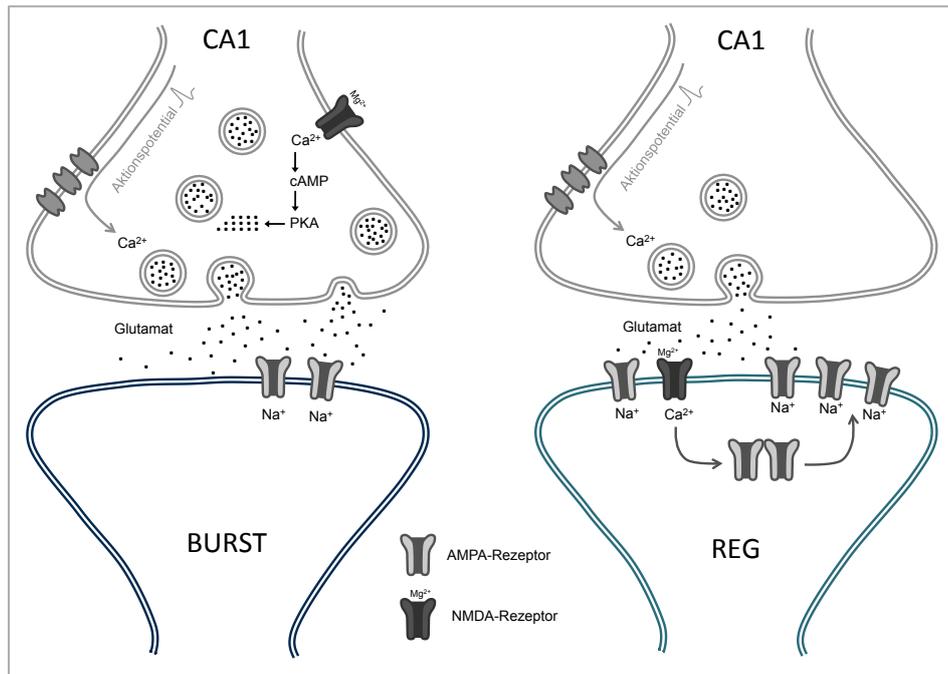


Abbildung 8 LTP im Subikulum bei BURST und REG. Schematische Übersicht über die zelltypspezifischen Mechanismen, die der Induktion und Expression von LTP an der CA1-Subikulum-Synapse burstender (BURST) und regulär feuender subikulärer Pyramidenzellen (REG) nach aktuellem Forschungsstand vermutlich zugrunde liegen. Ca^{2+} = Calcium, Na^+ = Natrium, Mg^{2+} = Magnesium, cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat, PKA = Proteinkinase A.

Ob sich zwischen den beiden subikulären Pyramidenzelltypen Unterschiede in der Ausprägung von Kurzzeitplastizität und ihren zugrunde liegenden Mechanismen finden, ist noch nicht ausreichend erforscht. Ein Unterschied im Ausmaß der PTP zwischen BURST und REG beobachtet werden: BURST prägen, verglichen mit REG, eine stärkere PTP aus.¹⁰¹ Dieser Effekt zeigte sich auch dann, wenn es in Folge der Stimulation zu einer Ausprägung von LTP kam.^{101,178} Ferner ergab sich im Rahmen der Induktion von LTP eine reduzierte PTP bei beiden Typen subikulärer Pyramidenzellen, wenn AP5 der extrazellulären Lösung beigelegt wurde.^{101,178} Eine Beteiligung prä- oder postsynaptisch lokalisierter NMDA-R an den Mechanismen der Kurzzeitplastizität bei subikulären Pyramidenzellen kann folglich nicht ausgeschlossen werden.

2 Fragestellung

Folgende Fragestellungen sind Gegenstand dieser Arbeit:

1. Gibt es Unterschiede in den elektrophysiologischen Eigenschaften (Membraneigenschaften, Spontanaktivität) von burstenden und regulär feuernenden subikulären Pyramidenzellen?
2. Weisen burstende und regulär feuernende subikuläre Pyramidenzellen Unterschiede in ihrer dendritischen Morphologie auf?
3. Gibt es zelltypspezifische Unterschiede in der Ausprägung und den zugrundeliegenden Mechanismen von Kurzzeitplastizität an der CA1-Subikulum-Synapse bei burstenden und regulär feuernenden subikulären Pyramidenzellen?
Welche Rolle spielen hier Rezeptoren vom NMDA-Typ?
4. Welche an der CA1-Subikulum-Synapse vorkommenden NMDA-Rezeptor-Subtypen sind an der basalen synaptischen Transmission beteiligt?

3 Materialien und Methoden

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten und bei der Erstellung dieser Arbeit wurde die „Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ eingehalten.

3.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an Hirnschnitten von insgesamt 85 Mäuse des Stammes C57BL/6 im Alter zwischen 21 und 31 Tagen nach Geburt durchgeführt. Zur Reduktion hormonell bedingter Varianzen erfolgten die Untersuchungen an Mäusen männlichen Geschlechts. Die Versuchstiere waren in einer Tierhaltungsanlage mit konstant gehaltenen Umgebungsbedingungen (Umgebungstemperatur 21-23 °C, relative Luftfeuchtigkeit 50-60%), einem alternierenden 12-Stunden-Hell-Dunkel-Zyklus sowie Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum* untergebracht. Alle Vorgehensweisen entsprachen den nationalen und internationalen Richtlinien des Tierschutzausschusses der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Tierschutz-Richtlinie Charité - Universitätsmedizin Berlin, Stand 07/2018), des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin sowie der Europäischen Union (Richtlinie 2010/63/EU, Stand 10/2010).

3.2 Herstellung und Lagerung von Hirnschnittpräparaten

Zur Herstellung der horizontalen Hirnschnittpräparate wurden die Versuchstiere mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran tief narkotisiert und mittels einer Schere dekapitiert. Im Rahmen der Präparation wurden die Kopfhaut und der Schädel sagittal eröffnet. Das Gehirn wurde unter partieller Entfernung der Dura mater freipräpariert und zügig mittels eines Spatels von rostral entnommen. Anschließend wurde das Gehirn für 3 Minuten in eine 0-4 °C kalte sucrosebasierte artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (engl. *sucrose-based artificial cerebrospinal fluid*, sACSF; Tabelle 1) überführt. Es erfolgte die Entfernung des Zerebellums sowie eine mediane Trennung der Hemisphären. Im Anschluss wurden die dorsalen Gehirnteile mit einem Skalpell abgetrennt. Die beiden Hemisphären wurden auf dieser dorsalen Schnittfläche auf einer Metallplatte in der Schneidekammer eines Vibratom-Gewebeschniders mit Cyanoacrylatklebstoff fixiert. Die umgebende Schneidekammer wurde mit gekühlter sACSF aufgefüllt. Mit Hilfe der vibrierenden Klinge des Gewebeschniders wurden 300 µm dicke horizontale Hirnschnittpräparate auf Höhe der hippocampalen Formation

angefertigt. Aus jeder Hemisphäre konnten so drei bis fünf Hirnschnittpräparate gewonnen werden.

Nach Inkubation der Hirnschnittpräparate in sACSF in einem Wasserbad bei 35 °C für 30 Minuten erfolgte der Transfer in eine sucrosefreie artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (engl. *artificial cerebrospinal fluid*, ACSF; Tabelle 1) mit Inkubation für weitere 30 Minuten unter langsamer Abkühlung auf Raumtemperatur (20-23 °C). Die Hirnschnittpräparate wurden dabei in einem mit ACSF gefüllten Becherglas auf einem, in einem Plastikring aufgespannten, dünnen Netz gelagert. In diesem System befanden sich die Hirnschnittpräparate bis zu 7 Stunden nach Präparation, bevor sie in die Messkammer überführt wurden. Die Lagerung der Hirnschnittpräparate und die elektrophysiologischen Messungen erfolgten so, dass die Hirnschnittpräparate jederzeit vollständig von Perfusionslösung umgeben waren (engl. *submerged conditions*), wodurch der Gas- und Flüssigkeitsaustausch von allen Seiten gewährleistet wurde. Im Hinblick auf die Erholung des neuronalen Gewebes von dem Präparations- und Schneidevorgang wurde mit den Experimenten frühestens 90 Minuten nach der Präparation begonnen. Während der elektrophysiologischen Experimente wurden die in der Messkammer befindlichen Hirnschnittpräparate ebenfalls in ACSF gelagert.

Die im Rahmen der Präparation und Lagerung von Hirnschnittpräparaten verwendeten Lösungen wurden durchgehend mit Carbogen (Gasgemisch aus 5% Kohlenstoffdioxid und 95% Sauerstoff) begast und stimmten in pH-Wert (ca. 7,4) und Osmolarität (ca. 290 mOsm) mit den physiologischen extrazellulären cerebrospinalen Lösungen weitgehend überein. Die bei der Hirnschnittpräparation zum Einsatz kommende sACSF enthielt im Vergleich zu der für die Lagerung und Messungen verwendeten ACSF eine geringere Konzentration an Calciumionen und eine erhöhte Konzentration an Magnesiumionen. Ziel war es die neuronale synaptische Aktivität während des Präparations- und Schneidevorgangs zu reduzieren.

3.3 Anwendung der Patch-Clamp-Technik

3.3.1 Grundlagen und Prinzipien der Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik wurde in den Siebzigerjahren von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt. Sie ermöglicht die Messung von elektrischen Strömen durch einzelne Ionenkanäle und über die gesamte Zellmembran.^{189,190} Hierfür wurden die beiden Wissenschaftler 1991 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet. Patch-Clamp-Messungen können *in vitro* an Zellen in Zellkulturen oder Gewebeschnitten sowie auch *in vivo* an Zellen in intakten Gewebeverbänden von narkotisierten oder wachen Tieren durchgeführt werden.^{191,192}

Bei elektrophysiologischen Untersuchungen an Membranen gilt die Grundannahme, dass sich die Zellmembran wie ein Ohm'scher-Widerstand verhält. Bei der Patch-Clamp-Technik wird eine Glaspipette auf die Membran einer Zelle aufgesetzt. Der direkte Kontakt zwischen der Glaspipette und dem Zellmembranfleck (engl. *patch*) ruft eine stabile elektrische Abdichtung (engl. *seal*) mit Widerständen im Gigaohmbereich ($10^9 \Omega$, engl. *gigaseal*) hervor.¹⁹² Infolgedessen kann eine mit einer leitenden Lösung gefüllte Glaspipette, die über einen Silberdraht mit einer Vorverstärkereinheit verbunden ist, als Messelektrode für transmembrane Ströme dienen. Abbildung 9 zeigt das vereinfachte Schaltbild einer Patch-Clamp-Vorverstärkereinheit. Eine einzelne Messelektrode gewährleistet dabei die Messung der Pipettenspannung sowie die Induktion eines Kompensationsstroms bei Abweichungen der Pipettenspannung von der vorgegebenen Sollspannung. Möglich wird dies durch einen, in der Vorverstärkereinheit integrierten Operationsverstärker. Unter optimalen Bedingungen entspricht der induzierte Kompensationsstrom in seiner Größe, aber in entgegengesetzter Richtung, dem Ionenstrom über die Zellmembran.¹⁹³

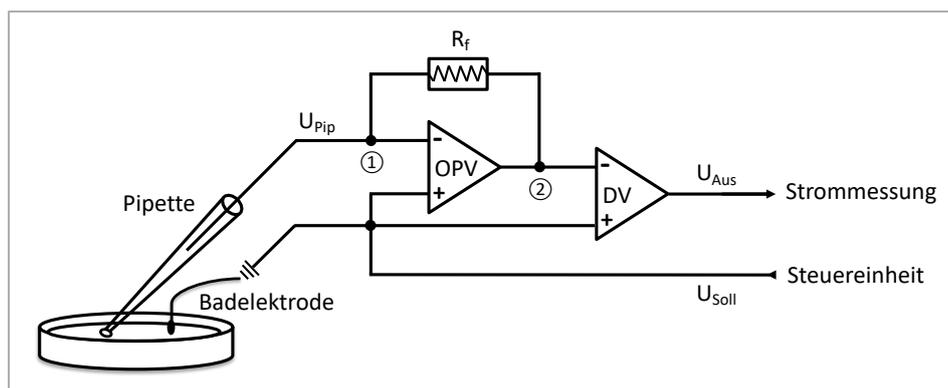


Abbildung 9 Vereinfachtes Schaltbild einer Patch-Clamp-Vorverstärkereinheit. Der Operationsverstärker (OPV) liefert am Ausgang eine Spannung, die proportional zur Differenz von Pipettenspannung (U_{Pip}) und Sollspannung (U_{Soll}), aber verstärkt ist. Herrscht eine Spannungsdifferenz zwischen ① und ②, fließt ein Strom durch den Rückkopplungswiderstand (R_f). Aufgrund des hohen Eingangswiderstands des OPV fließt der Strom ausschließlich in die Pipette und nimmt als Kompensationsstrom so lange Einfluss auf U_{Pip} , bis die Differenz zwischen U_{Pip} und U_{Soll} ausgeglichen ist. An R_f entsteht eine Spannung U_f , die nach dem Ohm'schen Gesetz proportional zum Kompensationsstrom zwischen ① und ② ist. Schließlich wird U_{Soll} mittels eines zweiten Differenzverstärkers (DV) von U_f subtrahiert, wodurch der Kompensationsstrom aus der Ausgangsspannung des DV (U_{Aus}) unter Einbeziehung eines Kalibrierungsfaktors (abhängig von der Größe von R_f) ausgelesen werden kann.

Bei Messungen mittels der Patch-Clamp-Technik können zwei Modalitäten genutzt werden: Spannungsklemm-Modus (engl. *voltage-clamp-mode*, VC-Modus) und Stromklemm-Modus (engl. *current-clamp-mode*, CC-Modus). Im VC-Modus wird eine Änderung des Membranpotentials verhindert, indem die Pipettenspannung auf eine vorgegebene Sollspannung eingestellt („geklemmt“) wird. Meist entspricht die Sollspannung dem zu

erwartenden Ruhemembranpotential (RMP) der Zelle. Gemessen wird hier der Kompensationsstrom, der benötigt wird, um die Pipettenspannung der Sollspannung anzugleichen. Dieser Kompensationsstrom lässt Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit der Membran zu, welche unter anderem von spezifischen Ionentransportern und Ionenkanälen bestimmt wird. Im CC-Modus wird der über die Pipette induzierte transmembrane Strom auf einem vorgegebenen Wert gehalten („geklemmt“). Das durch die Pipettenspannung gemessene Membranpotential der Zelle kann hier, im Gegensatz zum VC-Modus, frei variieren. Hierdurch ist die Betrachtung physiologischer zellulärer Erregungsmuster möglich.¹⁹³

Verschiedene Konfigurationen der Patch-Clamp-Technik werden in Abhängigkeit davon unterschieden, ob die Pipettenspitze der intakten Zellmembran lediglich eng aufliegt (*cell-attached*-Konfiguration), die Zellmembran durch ein porenformendes Agens partiell perforiert wird (*perforated-patch*-Konfiguration) oder die Membran im Bereich der Pipettenspitze eingerissen wird (*whole-cell*-Konfiguration). Im Rahmen der *whole-cell*-Konfiguration entsteht eine direkte niederohmige Verbindung zwischen dem Pipetteninneren und dem Intrazellularraum, ohne dass der Abdichtungswiderstand beeinflusst wird. Dies führt auch dazu, dass aufgrund des gegenüber dem Zellinneren vielfach größeren Pipettenvolumens die intrazelluläre Flüssigkeit zügig durch die in der Pipette befindliche Lösung ersetzt wird. Durch die *whole-cell*-Konfiguration wird es möglich Summenströme als Mittelung simultan aktiver Ionenkanäle über die gesamte Zellmembran abzuleiten. Neben den zellgebundenen Konfigurationen lassen sich zwei weitere Konfigurationen beschreiben, im Rahmen welcher ein Membranbereich unabhängig vom ursprünglichen intrazellulären Milieu untersucht werden kann: *Outside-out-patch*-Konfiguration und *Inside-out-patch*-Konfiguration.¹⁹²⁻¹⁹⁴ In Abbildung 10 sind die verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen schematisch dargestellt.

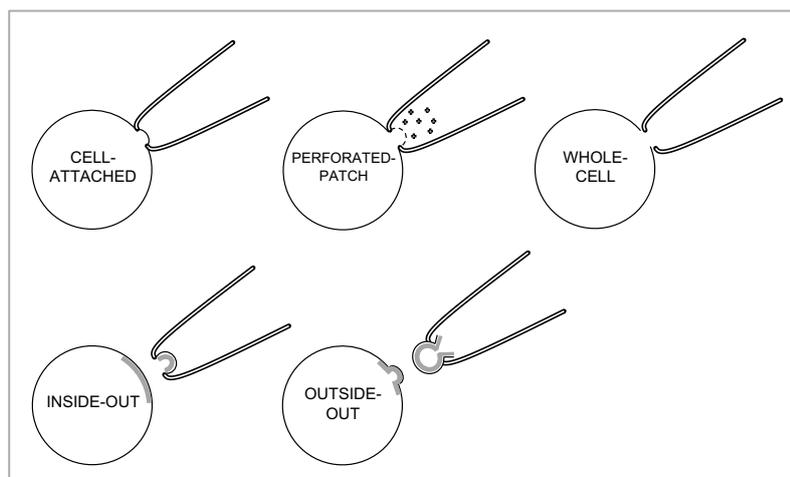


Abbildung 10 Schematische Darstellung der verschiedenen Patch-Clamp-Konfigurationen. Gezeigt sind eine Zelle (Kreis) sowie die Messpipette. Zur Verdeutlichung ist an relevanten Stellen die Membraninnenseite grau markiert.

3.3.2 Aufbau des Messstandes

Im Folgenden werden die wichtigsten Bestandteile der Messapparatur, die für die elektrophysiologischen Messungen an den Hirnschnittpräparaten verwendet wurde, näher erläutert. In Abbildung 11 ist ein elektrophysiologischer Messstand in seinen grundlegenden Bestandteilen schematisch dargestellt.

Zum Schutz vor Erschütterungen und mechanischen Schwingungen war der Messstand auf einem schwingungsgedämpften Tisch gelagert. Zentrales Element des Messstandes stellte die, sich auf dem Objektisch des Mikroskops befindliche Messkammer dar. Für die Messungen wurden einzelne Hirnschnitte in die mit ACSF perfundierte Eintauchkammer (engl. *submerged chamber*) überführt. Dort wurden sie mittels eines aufgelegten Platinrings mit parallel gespannten Drähten in Position gehalten. Eine peristaltische Schlauchpumpe mit zu- und abführenden Perfusionsschläuchen versorgte die Messkammer in einem kontinuierlichen Fluss mit ACSF aus einem Vorratsgefäß.

Es kam ein aufrechtes Lichtmikroskop mit einem Universalobjektiv mit 4-facher Vergrößerung sowie einem Wasserimmersionsobjektiv mit 60-facher Vergrößerung zur Anwendung. Mittels eines elektrisch arbeitenden Mikromanipulators mit Stellmotor konnten die Vorverstärkereinheit mit der im Pipettenhalter eingespannten Pipette bewegt werden. Die visuelle Kontrolle der Positionierung der Pipette im Hirnschnitt und auf zellulärer Ebene erfolgte über ein an das Lichtmikroskop gekoppeltes Videokamerasystem mit externem Bildschirm. An den Pipettenhalter war ein Schlauchsystem mit Barometer angeschlossen, welches die Erzeugung eines definierten Über- oder Unterdrucks ermöglichte. Über eine in den Pipettenhalter integrierte chlorierte Silberdrahtelektrode wurden die mit Flüssigkeit gefüllte Pipette und der Vorverstärker elektrisch in Verbindung gebracht. Zur Erdung wurde eine Silberdrahtelektrode als Badelektrode in die Messkammerflüssigkeit eingebracht und ebenfalls mit dem Vorverstärker verbunden. An den Vorverstärker schloss sich der computergesteuerte Hauptverstärker an. Mittels eines programmierbaren Impulsgenerators konnten komplexe Impulskommandos erzeugt und angepasst werden. Weiterhin wurde ein zweiter Mikromanipulator mit einer bipolaren Stimulationselektrode zur extrazellulären Stimulation installiert. Die bipolare Stimulationselektrode bestand aus einer Glaspipette und einem um sie gewundenen Silber-Silberchlorid-Draht, welcher mit einer batteriebetriebenen Stimulationseinheit elektrisch verbunden war. Die Stimulationseinheit stand ebenfalls mit dem programmierbaren Impulsgenerator in Verbindung.

Die intraexperimentelle Signaldarstellung erfolgte durch das an den Hauptverstärker angeschlossene Oszilloskop. Über einen Analog-Digital-Wandler konnten die analogen Messdaten des Verstärkers auf einen Computer mit Datenerfassungssoftware übertragen werden. Als Software für die Steuerung und Datenerfassung wurde Igor Pro verwendet.

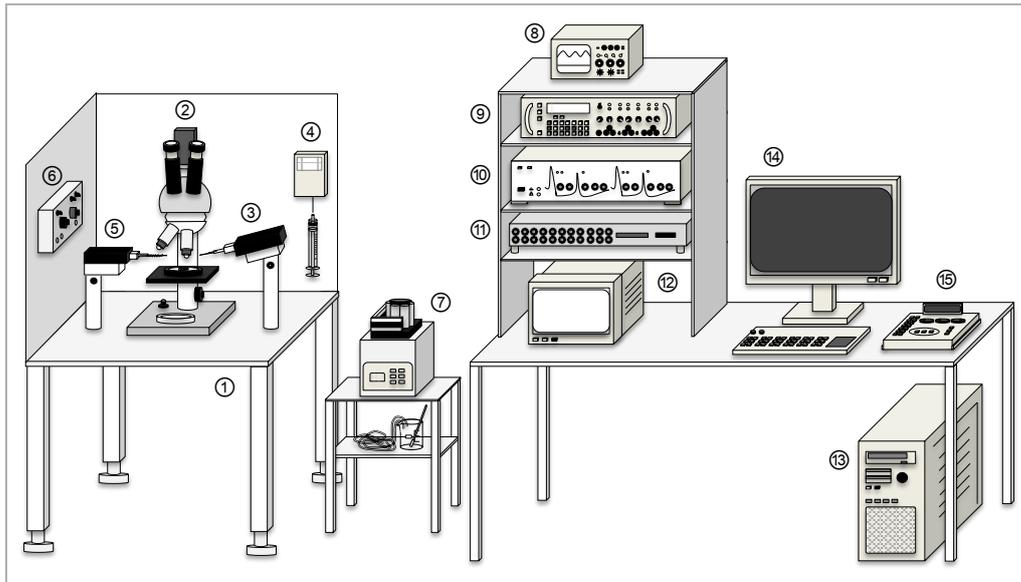


Abbildung 11 Schematische Darstellung eines Patch-Clamp-Messtandes.

① Schwingungsgedämpfter Tisch, ② Lichtmikroskop mit Videokamerasystem, ③ Mikromanipulator mit Vorverstärker und Halterung für Messpipette, ④ Barometer, ⑤ Mikromanipulator mit Halterung für Stimulationpipette, ⑥ Stimulationseinheit, ⑦ Peristaltikpumpe mit Schlauchsystem und Vorratsgefäß ⑧ Oszilloskop, ⑨ Programmierbarer Impulsgenerator, ⑩ Hauptverstärker, ⑪ Analog-Digital-Wandler, ⑫ Monitor für Videomikroskopie, ⑬ Computer, ⑭ Computermonitor, ⑮ Steuerung Mikromanipulator.

3.3.3 Erreichen der *whole-cell*-Konfiguration

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Patch-Clamp-Experimente fanden in der *whole-cell*-Konfiguration statt. Alle Experimente erfolgten unter Raumtemperatur. In der Regel wurden Messungen an einer Zelle je Hirnschnitt durchgeführt. Für jede Messung wurden Glasmikropipetten aus dünnwandigen Borosilikatglaskapillaren (Innendurchmesser 1,5 mm, Außendurchmesser 1,17 mm, Länge 100 mm) mittels eines horizontalen Pipettenziehgeräts ausgezogen. Die Spitze der Glaspipetten hatte einen Durchmesser von 1-2 μm und der Widerstand betrug 2-4 M Ω . Die Glaspipetten wurden mit einer der intrazellulären Flüssigkeit ähnelnden leitfähigen Lösungen gefüllt (Tabelle 2, Tabelle 3). Alle verwendeten intrazellulären Lösungen entsprach in pH-Wert (Kalium-Gluconat-Lösung ca. 7,2; Cäsium-Gluconat-Lösung ca. 7,3) und Osmolarität (290 mOsmol) weitgehend den physiologischen intrazellulären Flüssigkeiten. Die Glaspipette wurde auf den chlorierten Silberdraht in den Pipettenhalter der Vorverstärkereinheit gesteckt und diente in den Experimenten als Messelektrode. Die Messelektrode wurde in die mit ACSF (Tabelle 1) gefüllte Messkammer eingebracht und mikroskopisch kontrolliert im Hirnschnitt platziert. Die Messungen wurden in der zellreichen Schicht, dem Stratum pyramidale, durchgeführt. Das Subikulum unterschied sich von den angrenzenden Regionen durch die diffusere breitere Verteilung pyramidaler Zellen im Vergleich

zur dicht gepackten schmalen Pyramidenzellschicht der CA1-Region und der fehlenden ausgeprägten Schichtung des entorhinalen Kortex. Somata visuell intakter subikulärer Zellen zeigten im mikroskopischen Bild eine glatte Oberfläche und waren von triangulärer Form. Stark kollabierte, angeschwollene oder verformte Zellen wurden nicht für die Messungen ausgewählt. Nach Auswahl einer geeigneten Zelle wurde die Messelektrode an die Zellmembran des Zellkörpers herangeführt. Nachdem ein direkter Kontakt zwischen Pipettenspitze und Zellmembran hergestellt wurde, wurde durch Erzeugung eines leichten Unterdrucks eine hochohmige Versiegelung bewirkt (*cell-attached*-Konfiguration). Durch ruckartige Erhöhung des Unterdrucks konnte nun der, durch die Pipette eingeschlossenen Membranfleck geöffnet werden (*whole-cell*-Konfiguration). Für Messungen, die eine extrazelluläre Stimulation erforderten, wurden Glaspipetten mit einem Pipettenspitzen-Durchmesser von ca. 15-20 μm ausgezogen. Eine mit ACSF gefüllte bipolare Stimulationselektrode wurde schließlich unter Sicht im CA1-Areal platziert. Bei Bedarf wurde die genaue Positionierung der Stimulations- und Messelektrode im Hirnschnitt mikrofotographisch dokumentiert.

3.4 Elektrophysiologische Untersuchungen

3.4.1 Messprotokolle

Die Aufzeichnung der Messdaten sowie die Darstellung von Parametern zur Beurteilung der Zellintaktheit und Pipetten-Membran-Bindung während der Messungen wurden durch die Software Igor Pro gewährleistet. Bei Messungen im VC-Modus wurde dafür ein 50 ms langer Testpuls am Anfang jedes Messabschnitts appliziert. Wenn nicht abweichend angegeben, wurden Zellen bei Messungen im VC-Modus mittels Strominjektionen kontinuierlich bei einem Membranpotential von -65 mV gehalten. Messungen, bei denen sich ein Haltestrom von mehr als 250 pA, ein Serienwiderstand über 35 M Ω oder ein Wert größer als 25% des Eingangswiderstandes zeigten, wurden in der Regel nicht weitergeführt. Bei Messungen im CC-Modus wurde der Brückenabgleich (engl. *bridge-balance*) kontinuierlich überwacht und bei Bedarf angepasst. Messungen wurden lediglich an Zellen durchgeführt, die nach Erreichen der ein RMP zeigten, welches negativer als -55 mV war. Bei Experimenten, bei denen eine Intervention (z.B. hochfrequente Stimulation, Applikation oder Aktivierung einer pharmakologisch aktiven Substanz) vorgenommen wurde, wurde intraexperimentell sichergestellt, dass sich die gemessenen Parameter unter Kontrollbedingungen über einen Zeitraum von 5-20 Minuten stabil zeigten. Hierdurch konnte eine Basislinie (engl. *baseline*) aus Kontrollwerten erfasst werden. Nach einer Intervention wurde die Messung für mindestens 5-20 Minuten weitergeführt, um den zeitlichen Verlauf zu verfolgen.

Bestimmung des Zelltyps und der Membraneigenschaften

Zur Ermittlung des Zelltyps (BURST oder REG) sowie der aktiven und passiven Membraneigenschaften subikulärer Pyramidenzellen wurden hyper- und depolarisierende somatische Strominjektionen im CC-Modus verabreicht. Die 500 ms langen rechteckigen Strominjektionen steigerten sich in ihrer Amplitude in 40 pA Schritten von -240 pA bis +240 pA. Die zugehörigen Spannungsantworten wurden aufgezeichnet.

Spontanaktivität

In einigen Zellen wurde im Anschluss an die elektrophysiologische Charakterisierung die Spontanaktivität gemessen. Dafür wurden im VC-Modus auftretende spontane exzitatorische postsynaptische Ströme (engl. *spontaneous excitatory postsynaptic currents*, sEPSC) über einen Zeitraum von mindestens 10 Minuten erfasst. Die Messungen erfolgten in ACSF ohne Zugabe von Blockern der synaptischen Transmission oder Erhöhung von Ionenkonzentrationen.

Exzitatorische postsynaptische Ströme

Exzitatorische postsynaptische Ströme (engl. *excitatory postsynaptic currents*, EPSC) wurden durch Stimulation afferenter Eingänge aus der CA1-Region evoziert und durch Ableitung einer subikulären Pyramidenzelle im VC-Modus erfasst. Die Messungen wurden in Gegenwart des GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Gabazin durchgeführt. Um epileptiformer Aktivität vorzubeugen und um polysynaptische Einflüsse zu minimieren, wurde die Calcium- und Magnesiumkonzentration der ACSF auf 4 mM erhöht. Die Stimulation erfolgte in Form von Doppelpulsen (Stimulationsintervall 10 s; Pulsdauer 0,1 ms; Doppelpulsintervall 50 ms).

Im Rahmen der Untersuchungen zur Kurzzeitplastizität erfolgte eine Induktion von PTP mittels hochfrequenter synaptischer Stimulation (HFS). Für die HFS wurde ein Protokoll gewählt, bei welchem 50 oder 100 Pulse mit einer Frequenz von 50 Hz im VC-Modus appliziert wurden. Dieses Protokoll führte in der Regel nicht zur Induktion von LTP.

Ferner wurden die Auswirkungen einer Inhibition oder Aktivierung von NMDA-R durch Zugabe pharmakologisch aktiver Substanzen in die extrazelluläre Flüssigkeit untersucht. Hierfür kamen AP5 (50 oder 100 µM), Ifenprodil (3 µM), DQP-1105 (20 µM) und NMDA (20 µM) zur Anwendung. Weiterhin wurde bei einigen Messungen eine mit MK801 (1 mM) angereicherte Kalium-Gluconat-Lösung zur spezifischen Inhibition postsynaptischer NMDA-R verwendet.

Exzitatorische postsynaptische Ströme über NMDA-Rezeptoren

Exzitatorische postsynaptische Ströme über den NMDA-R (NMDA-EPSC) wurden durch Stimulation afferenter Eingänge aus der CA1-Region evoziert und durch die Ableitung einer subikulären Pyramidenzelle im VC-Modus erfasst. Messungen wurden in Anwesenheit folgender Pharmaka durchgeführt: NBQX (AMPA-R-Antagonist und Kainat-R-Antagonist),

Gabazin (GABA_A-Rezeptor-Antagonist) und CGP 55845 (GABA_B-Rezeptor-Antagonist). Für die Stimulation der afferenten Eingänge wurde eine Stimulationselektrode im CA1-Areal platziert. Die Stimulation erfolgte mit Stimulationsintervallen von 10 oder 20 s und in Form von Einzelpulsen mit einer Pulsdauer von 0,1 ms. Die Zellen wurden mittels Strominjektionen kontinuierlich bei Membranpotentialwerten von -45 mV (Kalium-Gluconat-Lösung) oder +40 mV (Cäsium-Gluconat-Lösung) gehalten.

Um die Wirksamkeit von intrazellulärem *caged* MK801 (photoreaktive MK801-Form) zu testen, wurden NMDA-EPSC vor und nach Aktivierung des *caged* MK801 in der Pipettenlösung untersucht. Die Aktivierung des *caged* MK801 erfolgte durch Applikation von UV-Licht-Pulsen (engl. „*uncaging*“), weshalb die Messungen unter Ausschluss von natürlichen und nicht-natürlichen UV-Licht-Quellen durchgeführt wurden. Kontrollmessungen mit einer intrazellulären Kalium-Gluconat-Lösung ohne *caged* MK801 wurden angefertigt, um Effekte der Applikation von UV-Licht zu erfassen. Ferner wurden Messungen mit einer mit Ascorbinsäure (Vitamin C) angereicherten Kalium-Gluconat-Lösung oder Cäsium-Gluconat-Lösung durchgeführt. Ascorbinsäure verhält sich in wässrigen Lösungen als Reduktionsmittel, weshalb angenommen wurde, dass Ascorbinsäure den schädigenden Einflüssen von UV-Licht auf Zellen entgegenwirken könnte.^{195,196}

Im Rahmen eines weiteren Messprotokolls erfolgte eine Untersuchung von NMDA-EPSC ebenfalls unter Verwendung einer Cäsium-haltigen intrazellulären Lösung. Cäsium bewirkt eine Inhibition der Kalium-Leitfähigkeiten und ermöglicht so eine stabile Messung von NMDA-EPSC bei depolarisierten Membranpotentialen. Da bei Verwendung von Cäsium-Gluconat-Lösung das elektrophysiologische Entladungsverhalten nicht erhoben werden kann, wurde im Rahmen einiger Messungen ein sogenannter *Repatch* durchgeführt. Im ersten Schritt wurden hierfür Zelltyp (BURST, REG) und Membraneigenschaften einer subikulären Pyramidenzelle unter Verwendung einer kaliumhaltigen Pipettenlösung ermittelt. Schließlich wurde die Messpipette von der Zellmembran gelöst und durch eine, mit einer cäsiumhaltigen Pipettenlösung gefüllt Messpipette ersetzt. In einem zweiten Schritt konnten so die NMDA-EPSC derselben, zuvor elektrophysiologisch charakterisierten, subikulären Pyramidenzelle bei einem Membranpotential von +40 mV gemessen werden. Die Auswirkungen einer NMDA-R-Inhibition auf die NMDA-EPSC wurde hierbei durch Zugabe der pharmakologisch aktiven Substanzen AP5 (100 µM) und Ifenprodil (3 µM) in die extrazelluläre Flüssigkeit ermittelt.

Feldpotentialmessungen an den Schaffer-Kollateral-CA1-Synapsen

Zur Aufzeichnung extrazellulärer Feldpotentiale (engl. *field excitatory postsynaptic potentials*, fEPSP) wurde eine Ableitelektrode mit ACSF gefüllt und unter Sicht im CA1-Areal platziert. Mittels einer bipolaren Stimulationselektrode wurden Schaffer-Kollateralen aus dem CA3-Areal stimuliert. Die Stimulation erfolgte alle 60 s durch Applikation von 5 Pulsen mit einer Frequenz

von 50 Hz (Interstimulusintervall 25 ms). Die Stimulationsstärke wurde so adjustiert, dass 70% der maximalen fEPSP-Amplitude erreicht wurden. Die Auswirkungen einer NMDA-R-Inhibition auf die fEPSP der Schaffer-Kollateral-CA1-Synapsen wurde durch Zugabe von AP5 (50 μ M) in die extrazelluläre Flüssigkeit über einen Zeitraum von 20 Minuten ermittelt.

3.4.2 Erfassung und Auswertung der elektrophysiologischen Messdaten

Messdaten wurden mit einer Abtastrate von 5 kHz aufgenommen und mittels eines Bessel-Tiefpassfilters bei 2 kHz gefiltert. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Igor Pro Softwarepakets NeuroMatic, der Software AxoGraph sowie der Python basierten Software Stimfit.

Bestimmung des Zelltyps

Subikuläre Pyramidenzellen wurden im Hinblick auf ihr Entladungsverhalten bei depolarisierenden Strominjektionen als BURST und REG klassifiziert. Meist konnte eine eindeutige Zuordnung intraexperimentell durch Inspektion der Spannungsantwort auf Strominjektionen an der Rheobase (geringste Stromstärke, bei der mindestens ein Aktionspotential ausgelöst wurde) erfolgen. Zellen wurden als BURST klassifiziert, wenn sie an der Rheobase ein Entladungsverhalten zeigten, bei dem nach dem ersten Aktionspotential ein oder mehrere weitere Aktionspotentiale mit geringem zeitlichem Abstand und somit hohen Frequenzen auftraten. Bei Fehlen dieses burstenden Entladungsverhaltens an der Rheobase wurden Zellen als REG klassifiziert. Zur Objektivierung der intraexperimentellen Klassifikation wurden die initialen Inter-Aktionspotential-Intervalle (IAPI) innerhalb der Spannungsantworten ausgewertet, in welchen mindestens zwei Aktionspotentiale ausgelöst worden waren. Das initiale IAPI wurde als Zeit zwischen den maximalen Amplituden der ersten zwei aufeinanderfolgenden Aktionspotentiale definiert. Ein burstendes Entladungsverhalten wurde nach Abgleich der intraexperimentellen Klassifikation mit den zugehörigen initialen IAPI ab einem initialen IAPI <25 ms angenommen. Bei REG zeigten sich initiale IAPI von ≥ 25 ms. Bei wenigen, initial als REG klassifizierten Zellen ($n=5$), gelang eine Verifizierung der intraexperimentellen Klassifikation mittels des initialen IAPI nicht. Diese Zellen feuerten an der Rheobase zunächst ein einzelnes Aktionspotential, zeigten jedoch bei geringfügiger Erhöhung der Stromstärke ein burstendes Entladungsverhalten. Aufgrund dieser Umstände wurden diese Zellen rückwirkend als BURST klassifiziert und die Strominjektion, welche eine burstende Entladung auslöste, als Rheobase festgelegt. Als weitere Parameter wurde bei BURST die Anzahl an Aktionspotentialen innerhalb der ersten burstenden Entladung sowie die Anzahl an burstenden Entladungen insgesamt ermittelt. Bei REG wurde die Anzahl an Aktionspotentialen an der Rheobase erfasst.

Aktive Membraneigenschaften

Für die Ermittlung der Rheobase und der Aktionspotentialfrequenzen wurden Spannungsantworten auf depolarisierende Strominjektionen mit Stromstärken von +40 bis +240 pA ausgewertet. Die Aktionspotentialfrequenz in Hertz wurde bestimmt, indem die Anzahl der Aktionspotentiale, die durch die jeweilige Strominjektion induziert wurden, durch die Gesamtdauer der Strominjektion (0,5 s) dividiert wurde. Aus den Veränderungen der Aktionspotentialfrequenz auf die schrittweise gesteigerten Strominjektionen wurden Frequenz-Strom-Kurven (FI-Kurven) konstruiert. Aus den FI-Kurven konnten die Rheobase sowie die Aktionspotentialfrequenz an der Rheobase entnommen werden. Die Steigung des linearen Anteils der FI-Kurven (Gain in Hz/nA) zwischen der Rheobase und dem Erreichen der maximalen Aktionspotential-Frequenz, wurde mittels einfacher linearer Regression ermittelt. Frequenzadaptation bezeichnet die Abnahme der Frequenz, beziehungsweise die Zunahme der IAPI, mit der Dauer einer Strominjektion. Ein Frequenz-Adaptations-Index wurde nach Beginn einer Strominjektion von +240 pA in dem Zeitraum zwischen 100-500 ms ermittelt, um Verfälschungen durch initiale burstende Entladungen auszuschließen. Das IAPI zwischen den ersten beiden ($IAP_{I_{first}}$) und das IAPI zwischen den letzten beiden Aktionspotentialen ($IAP_{I_{last}}$) wurden hierfür in ein Verhältnis gesetzt: Frequenz-Adaptations-Index = $100 \times IAP_{I_{first}} / IAP_{I_{last}}$. Je näher ein Wert an 100% lag, desto geordneter war die Aktionspotentialverteilung und je näher ein Wert an 0% lag, desto mehr Frequenzadaptation fand statt. Abbildung 12 zeigt am Beispiel der Spannungsantwort einer subikulären Pyramidenzelle die Messpunkte, die der Ermittlung der genannten Parameter zugrunde lagen.

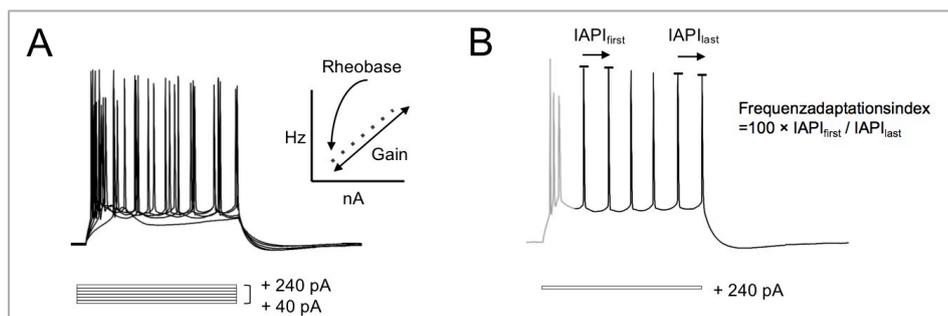


Abbildung 12 Parameter der aktiven Membraneigenschaften I. **A** Darstellung der Messpunkte für die Ermittlung der Frequenz-Strom-Kurve, der Rheobase, der Aktionspotentialfrequenz an der Rheobase sowie des Gain am Beispiel der Spannungsantworten auf depolarisierende Strominjektionen (+40 bis +240 pA) einer burstenden subikulären Pyramidenzelle. **B** Darstellung der Messpunkte für die Ermittlung des Frequenz-Adaptations-Index am Beispiel der Spannungsantwort einer burstenden subikulären Pyramidenzelle auf eine depolarisierende Strominjektion von +240 pA. IAPI = Inter-Aktionspotential-Intervall.

Die folgenden Aktionspotential-Parameter wurden bei REG aus dem erstauftretenden Aktionspotential an der Rheobase und bei BURST aus den Aktionspotentialen innerhalb der

ersten burstenden Entladung an der Rheobase erhoben. Das Schwellenpotential (engl. *threshold*) für die Auslösung eines Aktionspotentials wurde als der Punkt der Membranspannung definiert, der den Beginn der aufsteigenden Phase des Aktionspotentials anzeigte und an welchem die Spannungsänderung pro Zeit 5 mV/ms überstieg. Die maximale Aktionspotentialamplitude wurde vom RMP ausgehend bestimmt. Die Aktionspotentialdauer bei halbmaximaler Amplitude (engl. *full width at half-maximum amplitude*, FWHMA) wurde als Zeit zwischen dem Erreichen der halb-maximalen Aktionspotentialamplitude in der aufsteigenden und absteigenden Phase des Aktionspotentials ausgehend vom Schwellenpotential festgelegt. Der Anstiegszeit (engl. *rise time*) wurde die Zeit zwischen Erreichen von 20% bis 80% der maximalen Aktionspotentialamplitude, ausgehend vom Schwellenpotential, zugrunde gelegt. Die maximale Anstiegssteigung (engl. *maximum slope of rise*) wurde als die maximal-positive Steigung in der aufsteigenden Phase des Aktionspotentials definiert. Die maximale Abstiegssteigung (engl. *maximum slope of decay*) wurde als die maximal-negative Steigung in der absteigenden Phase des Aktionspotentials festgelegt. Die Aktionspotentiallatenz wurde als Zeit zwischen dem Beginn der Strominjektion und dem Auftreten des Schwellenpotentials, das den Beginn der aufsteigenden Phase des ersten Aktionspotentials anzeigte, gemessen. Ferner wurden bei BURST die IAPI zwischen den Aktionspotentialen innerhalb des ersten burstenden Entladungsverhaltens an der Rheobase ermittelt. Abbildung 13 zeigt am Beispiel der Spannungsantwort einer subikulären Pyramidenzelle die Messpunkte, die der Ermittlung der genannten Parameter zugrunde lagen.

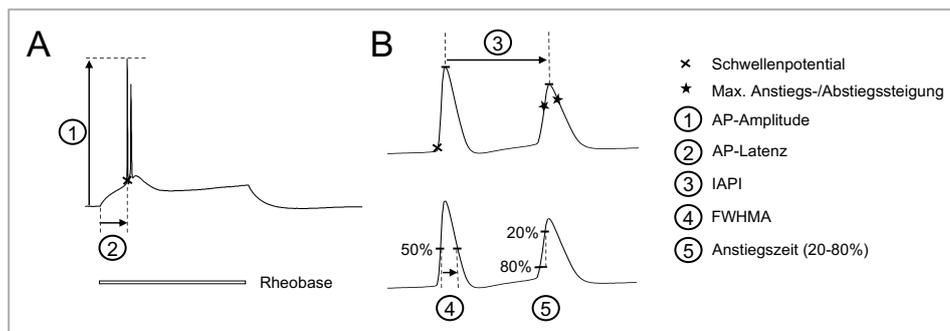


Abbildung 13 Parameter der aktiven Membraneigenschaften II. **A** Darstellung der Messpunkte für die Ermittlung des Schwellenpotentials (×), der Aktionspotentialamplitude (AP-Amplitude, ①) sowie der Aktionspotentiallatenz (AP-Latenz, ②) am Beispiel der Spannungsantworten einer burstenden subikulären Pyramidenzelle an der Rheobase. **B** Vergrößerung aus A. Darstellung der Messpunkte für die Ermittlung des Inter-Aktionspotential-Intervalls (IAPI, ③), der maximalen Anstiegs- und Abstiegssteigung (★), der Aktionspotentialdauer bei halbmaximaler Amplitude (FWHMA, ④) sowie der Anstiegszeit (⑤).

Ferner wurden das Sag-Potential (V_{sag}) und die Sag-Ratio bei einer Strominjektion von -200 pA ermittelt. V_{sag} beschrieb das Ausmaß einer überschießenden Senkung des Membranpotentials zu Beginn der hyperpolarisierenden Strominjektionen. V_{sag} wurde als Differenz zwischen dem

Membranpotential in der Gleichgewichtsphase der Spannungsantwort (engl. *steady-state-potential*, V_{ss}) gegen Ende der Strominjektion im Bereich 400-500 ms und der maximalen negativen Membranpotentialänderung relativ zum RMP (V_{peak}) im Bereich zwischen 0 und 400 ms nach Beginn der hyperpolarisierenden Strominjektion ermittelt ($V_{sag} = V_{ss} - V_{peak}$). Die Sag-Ratio wurde als prozentualer Anteil von V_{sag} an V_{peak} definiert (Sag-Ratio = $100 \times V_{sag} / V_{peak}$). Die Rebound-Depolarisation wurde als der maximale depolarisierende Ausschlag des Membranpotentials vom RMP nach einer hyperpolarisierenden Strominjektion von -200 pA definiert. Ferner wurde erfasst, wenn durch hyperpolarisierende Strominjektionen von -40 pA bis -240 pA Rebound-Aktionspotentiale ausgelöst wurden. Die Rebound-Hyperpolarisation wurde als der maximale hyperpolarisierende Ausschlag des Membranpotentials vom RMP nach erfolgter depolarisierender Strominjektion von +200 pA definiert. Abbildung 14 zeigt am Beispiel der Spannungsantwort einer subikulären Pyramidenzelle die Messpunkte, die der Ermittlung der genannten Parameter zugrunde lagen.

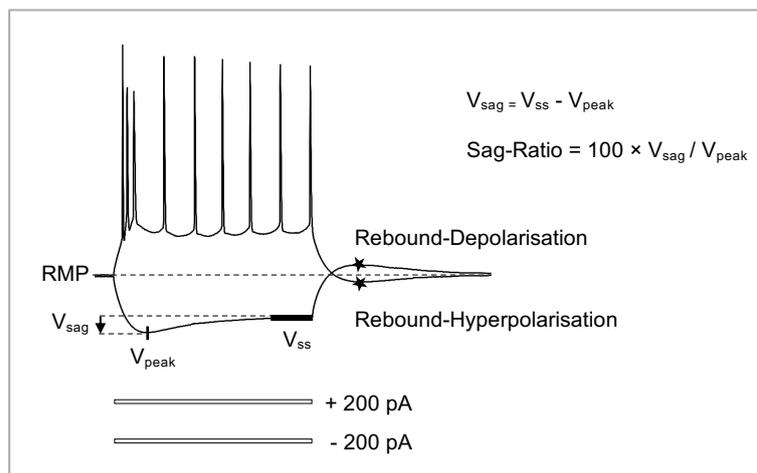


Abbildung 14 Parameter der aktiven Membraneigenschaften III. Darstellung der Messpunkte für die Ermittlung der maximalen negativen Membranpotentialänderung (V_{peak}) relativ zum Ruhemembranpotential (RMP), des zugehörigen Membranpotentials in der Gleichgewichtsphase der Spannungsantwort (V_{ss}), des Senkungspotentials (V_{sag}), der Rebound-Depolarisation sowie der Rebound-Hyperpolarisation (\star) am Beispiel der Spannungsantworten auf depolarisierende und hyperpolarisierende Strominjektionen (-200- und +200 pA) einer burstenden subikulären Pyramidenzelle.

Passive Membraneigenschaften

Für die Ermittlung des RMP wurde der Mittelwert des Membranpotentials aus dem initialen Abschnitt von Messungen im CC-Modus vor Beginn der Strominjektionen verwendet. Aus den Veränderungen des Membranpotentials auf die schrittweisen hyper- und depolarisierenden Strominjektionen bis zur Rheobase wurden Strom-Spannungs-Kurven (IV-Kurven) in Relation zum RMP konstruiert. Den Spannungen wurde V_{ss} gegen Ende der Strominjektion im Bereich

400-500 ms zu Grunde gelegt. Die Eingangswiderstände der Zellen wurden über die Steigung der linearen Funktion dieser IV-Kurven mittels linearer Regression berechnet. Die Membran-Zeit-Konstante τ (engl. *membrane time constant*, τ) beschreibt das Produkt aus Membranwiderstand (R_m) und Membrankapazität (C_m): $\tau = C_m \times R_m$. Der Membran-Zeit-Konstante wurde die Zeit zugrunde gelegt, in welcher im Rahmen einer Strominjektion von -40 pA das Membranpotential einen Wert von $1-1/e$ beziehungsweise 63% von V_{ss} erreichte. Die Ermittlung erfolgte durch Anlegen und Anpassen einer mono-exponentiellen Funktion an die initiale Phase der Spannungsantwort des Membranpotentials mit einem festgelegten Endpunkt auf Höhe von V_{ss} . Abbildung 15 zeigt am Beispiel der Spannungsantwort einer subikulären Pyramidenzelle die Messpunkte, die der Ermittlung der genannten Parameter zugrunde lagen.

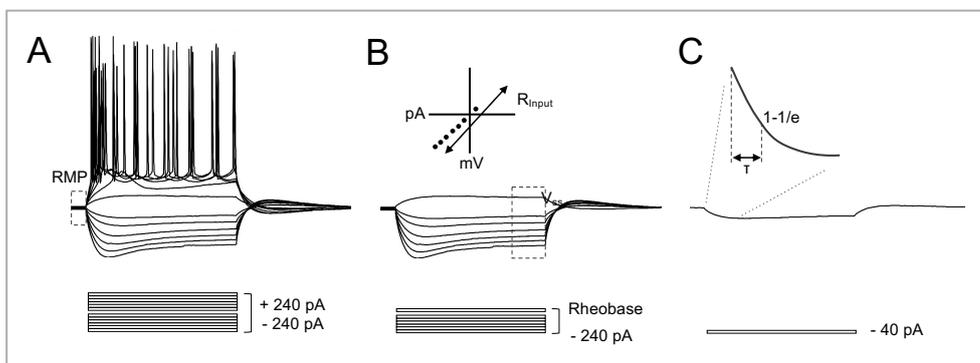


Abbildung 15 Parameter der passiven Membraneigenschaften. Darstellung der Messpunkte für die Ermittlung verschiedener Parameter der passiven Membraneigenschaften am Beispiel der Spannungsantworten auf depolarisierende und hyperpolarisierende Strominjektionen einer burstenden subikulären Pyramidenzelle. **A** Ruhemembranpotential (RMP) als das Membranpotential vor Beginn der Strominjektion. **B** Der Eingangswiderstandes wurde über die lineare Funktion einer Strom-Spannungs-Kurve ermittelt, welcher das Membranpotential in der Gleichgewichtsphase der Spannungsantwort (V_{ss}) bis zur Rheobase zugrunde lag. **C** Die Membran-Zeit-Konstante (τ) gibt die Zeit an, in der bei einer Strominjektion von -40 pA das Membranpotential einen Wert von $1-1/e$ erreicht.

Spontanaktivität

Die Auswertung der Spontanaktivitätsmessungen erfolgte mit Hilfe der Python basierten Software Stimfit. Zunächst wurden die initialen 150 ms langen Messabschnitte, die den 50 ms langen Testpuls enthielten, aus den Messungen herausgeschnitten. Anschließend wurden die verbleibenden Messabschnitte einer Zellmessung zur Auswertung chronologisch zu einer Messreihe zusammengefügt. Die Spontanaktivität wurde dann in jeder Messreihe über einen Zeitraum von 9 Minuten ausgewertet. Um eine bessere interexperimentelle Vergleichbarkeit zu gewähren, wurde bei der Auswertung derjenige Messabschnitt betrachtet, welcher die ersten 90 sEPSC einer jeden Messung enthielt. Die Anzahl von 90 ergab sich aus der geringsten Anzahl an detektierten sEPSC im neunminütigen Messzeitraum. Mittels eines in Stimfit integrierten Vorlage-Übereinstimmungs-Algorithmus (engl. *template match algorithm*) konnten sEPSC nach Erstellung einer Vorlagefunktion und unter Berücksichtigung eines Detektionskriteriums

(Abgleich eines Skalierungsfaktors mit der Standardabweichung des Hintergrundrauschens) automatisch detektiert werden.¹⁹⁷ Eine Korrektur im Hinblick auf unzutreffend detektierte (falsch-positive) und unzutreffend nicht-detektierte (falsch-negative) sEPSC erfolgte visuell. sEPSC, deren Amplitude kleiner als der 3,5-fache Wert der jeweiligen Standardabweichung der Basislinie war, wurden nachträglich von der Auswertung ausgeschlossen. Für jede Messreihe wurde die sEPSC-Anzahl und mittlere sEPSC-Frequenz sowie die Zeit zwischen dem Auftreten zweier sEPSC (engl. *inter-event-intervall*, IEI) ermittelt. Als Maß für die Regelmäßigkeit des Auftretens der sEPSC wurde der Variationskoeffizient (engl. *coefficient of variation*) der IEI ausgewertet (Variationskoeffizient IEI = Standardabweichung IEI / Mittelwert IEI). Je regelmäßiger die sEPSC-Abfolgen waren, desto kleiner war der Variationskoeffizient. Ferner wurden die einzelnen sEPSC zur Untersuchung ihrer maximalen Amplitude und Kinetik isoliert. Die Amplitude wurde als der maximale negative Ausschlag von der Basislinie gemessen. Die Anstiegszeit wurde als Zeit zwischen dem Erreichen von 20% bis 80% der maximalen Amplitude ermittelt. Die FWHMA wurde als Zeit zwischen dem Erreichen der halb-maximalen Amplitude in der aufsteigenden und absteigenden Phase des sEPSC definiert. Die Anstiegssteigung wurde als die maximal-positive Steigung in der aufsteigenden Phase des sEPSC festgelegt. Die Abstiegssteigung wurde als die maximal-negative Steigung in der absteigenden Phase des sEPSC definiert.

Exzitatorische postsynaptische Ströme

Die EPSC-Amplitude wurde die Differenz zwischen dem mittleren Wert der Strommessungen ab 10 ms vor Stimulation und dem folgenden maximalen negativen Ausschlag definiert. Die Amplituden der EPSC wurden, wenn nicht abweichend angegeben, im Hinblick auf die mittlere Amplitude der jeweiligen Basislinienmessung normalisiert. Bei Messungen bei denen eine HFS erfolgte wurde die PTP anhand der normalisierten maximalen Amplitude des ersten EPSC nach der HFS bestimmt. Um zu untersuchen, ob Veränderungen prä- oder postsynaptische Mechanismen zugrunde liegen, wurden Veränderungen der Doppelpulsratio (Doppelpulsratio = EPSC₂-Amplitude / EPSC₁-Amplitude) erfasst. Ändert sich die Doppelpulsratio nach HFS oder nach Applikation einer pharmakologisch aktiven Substanz, kann dies ein Hinweis auf einen präsynaptischen Ursprung des Effektes sein.¹²⁷ Ferner wurden Veränderungen des auf die Basislinienwerte normalisierten Eingangswiderstandes und absolute Veränderungen des Haltestroms nach Applikation von pharmakologisch aktiven Substanzen ausgewertet.

Exzitatorische postsynaptische Ströme über NMDA-Rezeptoren

Der Amplitude der NMDA-EPSC wurde die Differenz zwischen dem mittleren Wert der Strommessungen ab 10 ms vor Stimulation und dem folgenden maximalen negativen (Kalium-Gluconat-Lösung: Membranpotential -45 mV) oder positiven (Cäsium-Gluconat-Lösung:

Membranpotential +40 mV) Ausschlag zugrunde gelegt. Die Amplituden der NMDA-EPSC wurden, wenn nicht abweichend angegeben, im Hinblick auf die mittlere Amplitude der jeweiligen Basislinienmessung normalisiert. Weiterhin wurden Veränderungen des normalisierten Eingangswiderstandes und absolute Veränderungen des Haltestroms nach Applikation von UV-Licht oder pharmakologisch aktiven Substanzen ausgewertet.

Feldpotentialmessungen an den Schaffer-Kollateral-CA1-Synapsen

Bei Feldpotentialen lassen sich drei zeitlich aufeinanderfolgende Komponenten voneinander abgrenzen: Das Stimulationsartefakt, der *Fiber-Volley* und das eigentliche exzitatorische postsynaptische Feldpotential. Das Stimulationsartefakt stellt dabei einen der Stimulation unmittelbar folgenden kurzen biphasischen Ausschlag dar. Der sich anschließende negativ orientierte *Fiber-Volley* repräsentiert die Aktionspotentiale, die an den afferenten präsynaptischen Fasern durch die Stimulation ausgelöst werden und über die Axone die abgeleitete Neuronenpopulation erreichen. Die *Fiber-Volley*-Amplitude bildet hierbei ab in welchem Maß die afferente Stimulation die abgeleitete Zielregion tatsächlich erreicht. Die *Fiber-Volley*-Amplitude wurde von dem initialen positiven zum folgenden maximal negativen Ausschlag gemessen. Dem *Fiber-Volley* folgt eine länger andauernde hochamplitudige negative Potentialverschiebung. Diese stellt die postsynaptische Antwort auf die Stimulation da und wird durch Ströme erzeugt, die durch synaptische Transmission in der abgeleiteten Neuronenpopulation induziert werden. In der Regel wird bei der Auswertung die initiale Steigung des fEPSP als quantitativer Parameter verwendet, da sie stärker linear mit den postsynaptischen Leitfähigkeiten korreliert als beispielsweise die maximale fEPSP-Amplitude oder die Fläche unter der fEPSP-Kurve.¹⁹⁸ Die initiale fEPSP-Steigung wurde als dV/dt innerhalb von 20% bis 80% der maximalen fEPSP-Amplitude direkt nach dem negativen Ausschlag des *Fiber-Volley* ermittelt. Um die Breite des fEPSP zu erfassen wurde die FWHMA als Zeit zwischen dem Erreichen der halb-maximalen Amplitude in der aufsteigenden und absteigenden Phase des fEPSP gemessen. Abbildung 16 zeigt die Messpunkte, die der Ermittlung der genannten Parameter zugrunde lagen.

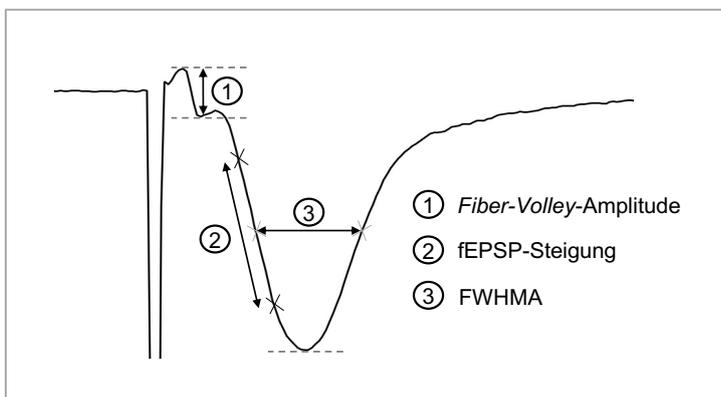


Abbildung 16

Parameter bei Feldpotentialen. Darstellung des charakteristischen fEPSP-Verlaufs sowie der Messpunkte für die Ermittlung der *Fiber-Volley*-Amplitude ①, der fEPSP-Steigung ② und der fEPSP-Breite bei halbmaximaler Amplitude (FWHMA) ③ am Beispiel eines isolierten fEPSP. fEPSP = Exzitatorisches postsynaptisches Feldpotential.

3.5 Zellmorphologische Untersuchungen

3.5.1. Füllung der subikulären Pyramidenzellen mit Biocytin

Einige Zellen wurden nach elektrophysiologischer Messung zur Erhebung zellmorphologischer Daten angefärbt. Zur immunhistochemischen Färbung der Pyramidenzellen war 0,2% Biocytin in der intrazellulären Kalium-Gluconat-Lösung enthalten. Wenn eine Messung in der *whole-cell*-Konfiguration länger als 15 Minuten andauerte, wurde von einer ausreichenden Diffusion in entfernte Zellstrukturen ausgegangen. Nach Beendigung der elektrophysiologischen Messungen wurde eine *outside-out*-Konfiguration hergestellt und die Pipette wurde anschließend langsam aus dem Hirnschnitt entfernt. Dieser wurde für weitere 10 Minuten in der mit ACSF perfundierten Messkammer gelagert.

3.5.2. Fixation der Hirnschnittpräparate und immunhistochemische Färbung

Die Hirnschnittpräparate wurden in Zellkulturplatten transferiert und in 4% Paraformaldehyd (PFA) für 12 bis 24 Stunden fixiert. Anschließend wurden die Hirnschnittpräparate zur Lagerung vor der immunhistochemischen Färbung in eine 0,1 M phosphatgepufferte Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) mit 0,1% Natriumazid überführt. Vor der immunhistochemischen Färbung wurde jedes Hirnschnittpräparat dreimal für jeweils 10 Minuten mit 0,1 M PBS gespült. Anschließend wurden die Hirnschnittpräparate in PBS für 48 Stunden bei 4 °C mit Triton X-100 und Alexa Fluor 488 konjugiertem Streptavidin (Konzentration 1:500) inkubiert. Es folgten drei weitere Spülvorgänge mit 0,1 M PBS für jeweils 10 Minuten. Schließlich wurden die Hirnschnittpräparate auf einen Objektträger transferiert und eingebettet in Mowiol (Einschlussmittel aus teilhydrolysiertem Polyvinylalkohol) mit einem Deckglas abgedeckt. Die Aushärtung und weitere Lagerung erfolgten bei 4 °C unter Vermeidung von Kontakt mit UV-Licht.

3.5.3. Erfassung und Auswertung der zellmorphologischen Daten

Die Immunfluoreszenzdarstellung erfolgte mittels konfokaler Laserscanmikroskopie unter Verwendung eines 20x-Ölimmersionsobjektivs. Dabei wurden Aufnahmen der fluoreszenzmarkierten subikulären Pyramidenzellen entlang der Z-Achse mit einem Schichtdickenabstand von 1 µm erstellt (Z-Stacks). Die dendritische Zellmorphologie wurde schließlich aus den Z-Stacks mit Hilfe der Software Neutube dreidimensional rekonstruiert und die einzelnen Ausläufer dem apikalen oder basalen Dendritenbaum zugeordnet.¹⁹⁹ Dem apikalen Dendritenbaum wurden solche Dendriten zugeordnet, die aus der Spitze der Pyramidenzellsomata aufstiegen oder Verzweigungen dieser darstellten. Basale Dendriten zeigten sich kurz und radial um das Pyramidenzellensoma verteilt. Unter Verwendung der

Software ImageJ2/Fiji wurde die Rekonstruktion zur Uniformierung des dendritischen Durchmessers skelettiert.

Die Sholl-Analysen wurden mittels spezifischer Softwarepakete in ImageJ2/Fiji durchgeführt, wobei apikale und basale Dendriten getrennt betrachtet wurden. Die Sholl-Analyse ist eine morphometrische Methode zur quantitativen Beschreibung der dendritischen Morphologie von Nervenzellen.²⁰⁰ Dabei werden konzentrische Kreise mit zunehmenden Radien, die auf das Soma eines Neurons zentriert sind, auf eine Zelle projiziert. Für jeden dieser konzentrischen Kreise kann so die Anzahl an Schnittpunkten mit den Dendriten ermittelt werden (Abbildung 17).

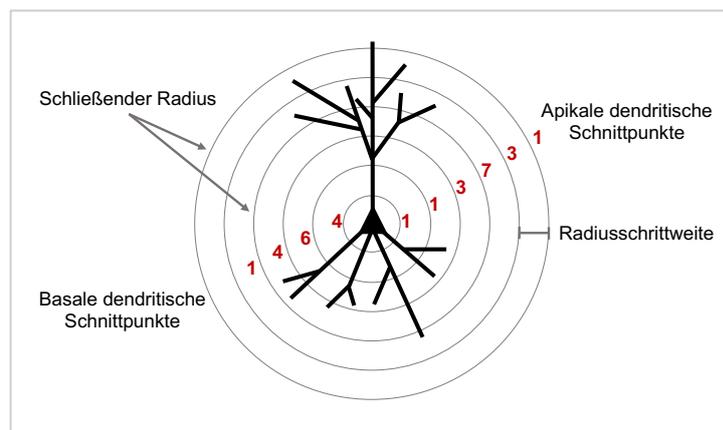


Abbildung 17 Parameter der Sholl-Analyse. Schematische Darstellung einiger im Rahmen der Sholl-Analyse erhobener Parameter. Rote Zahlen kennzeichnen die Anzahl basaler (links) beziehungsweise apikaler (rechts) dendritischer Schnittpunkte des jeweiligen konzentrischen Kreises.

In dieser Arbeit wurde für den Ausgangsradius und die Radiusschrittweite ein Wert von $10\ \mu\text{m}$ festgelegt. Die Anzahl der dendritischen Schnittpunkte kann gegen den Radius aufgetragen werden, was die Möglichkeit der Ableitung verschiedener Parameter für vergleichende Analysen bietet. Für diese Arbeit wurden sechs Parameter extrahiert, welche im Folgenden näher erläutert werden. Die Summe der Schnittpunkte wurde als Summe der erfassten Schnittpunkte aller Radien ermittelt. Sie ergibt eine Annäherung an die Gesamtlänge des gesamten dendritischen Baumes ($\text{Länge} \approx \text{Summe Schnittpunkte} \times \text{Radiusschrittweite}$). Der schließende Radius variiert mit der räumlichen Ausdehnung des dendritischen Baumes und wurde als der maximale Radius, bei dem lediglich ein Schnittpunkt erfasst wurde, definiert. Der Mittelwert für die Schnittpunkte ergab sich aus dem Quotienten der Summe und des schließenden Radius. Die maximale Anzahl der Schnittpunkte ist ein einfaches Maß für die Verzweigung des dendritischen Baumes, während die Radien, bei welchen diese maximale Anzahl an Schnittpunkten auftraten als Abstand vom Soma definiert wurden, in dem die Dendriten maximal verzweigt waren.

Schließlich konnten anhand der Sholl-Diagramme Regressionskoeffizienten ermittelt werden, wobei zwei Methoden zum Einsatz kamen: Die log-log-Methode und die semi-log-Methode. Bei der log-log-Methode wird der natürliche Logarithmus der Anzahl der Schnittpunkte geteilt durch die vom Radius eingeschlossene Fläche gegen den natürlichen Logarithmus des Radius aufgetragen. Zeigt sich dabei ein annähernd linearer Zusammenhang, kann eine lineare Regression durchgeführt werden, wobei der Regressionskoeffizient als Maß für die Abnahme der Anzahl an dendritischen Schnittpunkten mit zunehmender Entfernung vom Soma interpretiert werden kann. Bei der semi-log-Methode wird der natürliche Logarithmus der Anzahl der Schnittpunkte geteilt durch die vom Radius eingeschlossene Fläche gegen den Radius aufgetragen. Hierbei kann sich ebenfalls ein linearer Zusammenhang zeigen und der durch lineare Regression ermittelte Regressionskoeffizient beschreibt dabei die exponentielle Abnahme der Anzahl an dendritischen Schnittpunkten mit zunehmendem Radius vom Soma. Empfehlungen nach sollte sich die Auswahl einer geeigneten Methode an der spezifischen Struktur des dendritischen Baumes und nicht zuletzt an der Güte, der mit der jeweiligen Methode erreichten, statistischen Beziehung orientieren. In dieser Arbeit wurde die Methode basierend auf der bekannten charakteristischen apikalen und basalen dendritischen Architektur sowie dem Determinationskoeffizienten (engl. *coefficient of determination*) als Kontrollparameter gewählt. Der Determinationskoeffizient kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und beschreibt die Qualität der Annäherung durch die Regressionsanalyse.²⁰¹ Für die Analyse der apikalen Dendriten wurde so die log-log-Methode und für die Analyse der basalen Dendriten die semi-log-Methode ausgewählt. Aus Gründen einer verbesserten Annäherung wurde die Regressionsanalyse auf dendritische Schnittpunkte beschränkt, deren Radien zwischen dem 10. und dem 90. Perzentil lagen (gekennzeichnet als „P10-P90“).

Die Erhebung von weiteren Parametern der zellulären Morphologie erfolgte in mit Hilfe der Software L-Measure, wobei auch hier eine separate Betrachtung der apikalen und basalen dendritischen Architektur erfolgte. In dieser Arbeit wurden drei weitere Parameter der dendritischen Morphologie ausgewählt und analysiert, welche im Folgenden näher erläutert werden. Ein Dendritenast wurde dabei als dendritischer Abschnitt definiert, der zwischen zwei Verzweigungspunkten oder zwischen einem Verzweigungspunkt und einem Endpunkt lag. Die Anzahl an den Dendritenästen beschrieb die Summe aus der Anzahl an Verzweigungen und der Anzahl an Endpunkten. Die mittlere Kontraktion (engl. *average contraction*) gab das durchschnittliche Verhältnis zwischen dem euklidischen Abstand eines Dendritenastes und seiner Weglänge an. Je näher die Werte an 1 lagen, desto geringer und je näher die Werte an 0 lagen, desto stärker war die mittlere Kontraktion der Dendriten. Der Gesamtlänge lag die Summe der Länge der einzelnen Dendritenäste zugrunde.

3.6 Statistische Auswertung

Abbildungen, die schematische Darstellungen beinhalten wurden mit Hilfe der Programme Power-Point und Illustrator erstellt. Für alle Abbildungen, die nicht oder nur in Teilen selbst erstellt wurden, wurden die Nutzungsrechte schriftlich eingeholt.

Die statistische Testung sowie die Erstellung der Abbildungen zur Ergebnispräsentation erfolgten mit Hilfe der Software Prism sowie Softwarepaketen in R. Es wurden keine statistischen Methoden zur Vorbestimmung der Stichprobengrößen wie beispielsweise *Power-Analysen* durchgeführt. Die Wahl der Stichprobengrößen für diese Arbeit orientierte sich an den im Allgemeinen in dem Bereich der zellulären Neurophysiologie eingesetzten Stichprobengrößen.

Messungen von unterschiedlichen Zelltypen (BURST, REG) und Messungen bei denen unterschiedliche Messprotokolle zum Einsatz kamen wurden, wenn nicht abweichend angegeben, getrennt statistisch analysiert. Für die statistische Testung wurden die erhobenen Daten zunächst mittels des D'Agostino-Pearson-Test auf eine Normalverteilung geprüft. Bei Nichtannahme einer Normalverteilung durch den D'Agostino-Pearson-Test wurde das Quantil-Quantil-Diagramm der Verteilung visuell auf die Annahme einer Normalverteilung der Daten, gegebenenfalls unter Ausschluss von sogenannten „Ausreißern“, geprüft. Zur Signifikanztestung auf Unabhängigkeit in Kontingenztafeln wurde aufgrund des meist geringen Stichprobenumfangs der Fisher-Yates-Test verwendet. Für die Signifikanztestung ungepaarter normalverteilter Stichproben wurde der t-Test für unabhängige Stichproben oder bei Ungleichheit der Varianzen in den Grundgesamtheiten (Fisher's F-Test) der Welch-Test angewendet. Bei ungepaarten nicht normalverteilten Stichproben wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Statistische Vergleiche kumulativer Verteilungen wurden mittels des nicht parametrischen Kolmogorov-Smirnov-Tests durchgeführt. Für die Signifikanztestung gepaarter normalverteilter Stichproben wurde je nach Form der Daten der t-Test für abhängige Stichproben oder der Ratio-t-Test für abhängige Stichproben verwendet. Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wurde im Rahmen der Signifikanztestung gepaarter nicht normalverteilter Stichproben angewendet. Varianzanalysen bei unabhängigen Stichproben wurden in Abhängigkeit von dem untersuchten Datensatz mit einer ein- oder zweifaktoriellen ANOVA für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Ergebnisse der Signifikanztestung wurden in der Regel mit Hilfe des *post-hoc* Holm-Šidák-Test auf eine Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Vergleichen korrigiert (Angabe zur statistischen Testung in der Klammer hinter dem Ergebnis oder der zugehörigen Tabelle). Erfolgte keine Korrektur auf eine Alphafehler-Kumulierung oder wurde diese für bestimmte Untergruppen getrennt durchgeführt, lag dieser Entscheidung der explorative Charakter der jeweiligen Untersuchung zugrunde. Die Angabe der Ergebnisse im Text erfolgte als Mittelwert \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM).

Als Signifikanz-Niveau galt, wenn nicht abweichend angegeben, ein p-Wert kleiner als 0,05, was durch einen Asterisk (*) gekennzeichnet wurde. p-Werte, die kleiner als 0,01 waren wurden als „hoch signifikant“ (**) und p-Werte die kleiner als 0,001 waren als „höchst signifikant“ (***) eingestuft. Für die Vergleiche kumulativer Verteilungen mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurde das Signifikanz-Niveau aufgrund der umfangreichen Grundgesamtheit auf einen p-Wert kleiner als 0,001 (signifikant, *) herabgesetzt.

Zur orientierenden Abschätzung der Klassenbreite für die Erstellung der Histogramme kam die Freedman-Diaconis-Regel zur Anwendung: Klassenbreite = $2 \times (IQR)^{1/3} \sqrt{n}$, wobei *IQR* der Interquartilsabstand ($Q_3 - Q_1$) und *n* die Anzahl der Stichproben war.²⁰²

Eine Korrelationsanalyse wurde erstellt, um die Größe und Richtung der statistischen Beziehung zwischen den erhobenen Parametern der Membraneigenschaften, Spontanaktivität und dendritischen Morphologie zu erfassen. Es wurden 43 Variablen erfasst, wobei Rebound-Depolarisation und -Hyperpolarisation wegen fehlender Werte und aufgrund der Induktion von Rebound-Aktionspotentialen von der Korrelationsanalyse ausgeschlossen wurden. Das Versuchstieralter wurde in die Korrelationsanalyse mit aufgenommen. Die Korrelationsanalyse wurden mittels der Rangkorrelationsanalyse nach Spearman für nicht normalverteilte Stichproben durchgeführt. Der Rangkorrelationskoeffizient wurde in Anlehnung an die von Jacob Cohen entwickelte Richtlinie wie folgt interpretiert: $|r|=0,10$ = schwache Korrelation, $|r|=0,30$ = moderate Korrelation, $|r|=0,50$ = starke Korrelation.²⁰³

k-Means-Cluster-Analysen und Hauptkomponentenanalysen (engl. *principal component analysis*, PCA) wurden mit Hilfe von Softwarepaketen in R (Hauptkomponentenanalyse und k-Means-Cluster-Analyse: *stats*, *caret*, *factoextra*; graphische Darstellung: *ggplot2*, *plotly*) an drei unterschiedlichen Datensätzen durchgeführt. Auch hier wurden die Parameter Rebound-Depolarisation und -Hyperpolarisation wegen fehlender Werte und aufgrund der Induktion von Rebound-Aktionspotentialen ausgeschlossen. Ferner wurden die Parameter initiales IAPI und Frequenz an der Rheobase aufgrund des offensichtlichen Zusammenhangs zur Klassifikation nicht in die Analysen miteinbezogen. Die optimale Anzahl an Clustern (*k*) für die k-Means-Cluster-Analysen wurde durch eine Silhouetten-Analyse ermittelt. Zusätzlich wurden Cluster- und Hauptkomponentenanalyse erstellt, bei welchen nur die Parameter eingeschlossen wurden, die sich zwischen BURST und REG im Mann-Whitney-Test signifikant unterschieden.⁸⁸ Zur basalen Einordnung der Güte des Clusters in Bezug auf die Zuordnung der beiden Zelltypen wurden in Anlehnung an den Rand-Index Trefferquoten und Zufallstrefferquoten als Kennwerte wie folgt ermittelt: Trefferquote = $(a+d)/(a+b+c+d)$; Zufallstrefferquote = $((a+b) \times (a+c)) / ((a+b+c+d)^2 + ((c+d) \times (b+d)) / (a+b+c+d)^2)$; wobei: *a*=Anzahl richtig BURST-Cluster, *b*=Anzahl falsch BURST-Cluster, *c*=Anzahl falsch REG-Cluster, *d*=Anzahl richtig REG-Cluster.^{204,205}

3.7 Verwendete Lösungen und Pharmaka

Artifizielle cerebrospinale Lösungen

Tabelle 1 Zusammensetzung der verwendeten artifiziellen cerebrospinalen Lösungen.

Artifizielle cerebrospinale Lösungen				
Substanz	Summenformel	Molare Masse (in g/mol)	sACSF (in mM)	ACSF (in mM)
Calciumchlorid	CaCl ₂	147,02	0,50	2,00
D-Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,16	10,00	10,00
Kaliumchlorid	KCl	74,55	2,50	3,00
Magnesiumchlorid	MgCl ₂	203,30	3,00	1,00
Natriumchlorid	NaCl	58,44	87,00	125,00
Natriumdihydrogen- phosphatmonohydrat	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	137,99	1,25	1,25
Natriumhydrogenkarbonat	NaHCO ₃	84,01	26,00	25,00
Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342,30	50,00	-
	Calciumchlorid	CaCl ₂	147,02	4,00
	Magnesiumchlorid	MgCl ₂	203,30	-
	Gabazin	C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₃ · HBr	368,23	0,002
Fakultativ				
	NBQX	C ₁₅ H ₁₆ O ₆ · C ₁₅ H ₁₈ O ₇	336,28	0,01
	CGP 55845	C ₁₈ H ₂₂ Cl ₂ NO ₃ P · HCl	438,71	-
	Gabazin	C ₁₅ H ₁₇ N ₃ O ₃ · HBr	368,23	0,002

Artifizielle intrazelluläre Lösungen

Tabelle 2 Zusammensetzung der verwendeten Kalium-Gluconat-Lösung.

Substanz	Summenformel	Molare Masse (in g/mol)	Kalium-Gluconat- Lösung (in mM)	
EGTA	$C_{14}H_{24}N_2O_{10}$	380,35	0,2	
HEPES	$C_8H_{18}N_2O_4S$	238,30	10,0	
Kaliumchlorid	KCl	74,55	6,0	
Kalium-Gluconat	$C_6H_{11}KO_7$	234,25	135,0	
Magnesiumchlorid	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	203,30	2,0	
Natrium-Adenosintri-phosphat	$C_{10}H_{14}N_5Na_2O_{13}P_3 \cdot xH_2O$	551,14	2,0	
Natrium-Guanosintri-phosphat	$C_{10}H_{16}N_5O_{14}P_3 \cdot xNa^+ \cdot yH_2O$	523,18	0,5	
Natrium-Phosphokreatin	$C_4H_8N_3O_5PNa_2 \cdot xH_2O$	255,08	5,0	
Biocytin	$C_{16}H_{28}N_4O_4S$	372,48	0,2 %	
Kaliumhydroxid	KOH	56,11	Dosistitration bis pH-Wert 7,2	
	Natriumascorbat	$C_6H_7NaO_6$	198,11	3,0
Fakultativ	caged (+)-MK801	$C_{26}H_{24}N_2O_6$	460,48	1,0
	(+)-MK801	$C_{16}H_{15}N \cdot C_4H_4O_4$	337,37	1,0

Tabelle 3 Zusammensetzung der verwendeten Cäsium-Gluconat-Lösung.

Substanz	Summenformel	Molare Masse (in g/mol)	Cäsium-Gluconat- Lösung (in mM)	
Cäsiumchlorid	CsCl	168,36	2,0	
EGTA	$C_{14}H_{24}N_2O_{10}$	380,35	0,2	
Gluconsäure	$C_6H_{12}O_7$	196,16	120,00	
HEPES	$C_8H_{18}N_2O_4S$	238,30	10,0	
Natrium-Adenosintri-phosphat	$C_{10}H_{14}N_5Na_2O_{13}P_3 \cdot xH_2O$	551,14	4,0	
Natriumchlorid	NaCl	58,44	8,0	
Natrium-Guanosintri-phosphat	$C_{10}H_{16}N_5O_{14}P_3 \cdot xNa^+ \cdot yH_2O$	523,18	0,3	
QX 314 Bromid	$C_{16}H_{27}N_2OBr$	343,30	5,0	
Cäsiumhydroxid	$HCsO \cdot H_2O$	167,93	Dosistitration bis pH-Wert 7,3	
Fakultativ	Natriumascorbat	$C_6H_7NaO_6$	198,11	3,0

Pharmakologisch aktive Substanzen

Tabelle 4 Übersicht über die verwendeten pharmakologisch aktiven Substanzen.

Substanz	Chemische Bezeichnung	Konzentration	Biologische Wirkung
Caged (+)-MK801	(5S,10R) -10,11-Dihydro-5-methyl-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>a,d</i>]cyclohepten-5,10-imin-12-carbonsäure(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl)methylester	1 mM	Antagonismus an NMDA-Rezeptoren
CGP 55845	(2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Dichlorphenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphinsäurehydrochlorid	2 µM	Antagonismus an GABA _B -Rezeptoren
D-AP5	D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentansäure	50 µM 100 µM	Antagonismus an NMDA-Rezeptoren
DQP-1105	5-(4-Bromphenyl)-3-(1,2-dihydro-6-methyl-2-oxo-4-phenyl-3-chinolinyl)-4,5-dihydro-γ-oxo-1 <i>H</i> -pyrazol-1-Butansäure	20 µM	Antagonismus an NMDA-GluN2C/D-Rezeptoren
Gabazin	6-Imino-3-(4-methoxyphenyl)-1(6 <i>H</i>)-pyridazinbutansäurehydrobromid	2 µM	Antagonismus an GABA _A -Rezeptoren
Ifenprodil	(1S*,2S*)-Threo-2-(4-benzylpiperidin)-1-(4-hydroxyphenyl)-1-propanol-Hemitartrat	3 µM	Antagonismus an NMDA-GluN2B-Rezeptoren
(+)-MK801	(5S,10R)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>a,d</i>]cyclohepten-5,10-iminmaleat	1 mM	Antagonismus an NMDA-Rezeptoren
NBQX	2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo[<i>f</i>]chinoxalin-2,3-dion	10 µM	Antagonismus an AMPA-Rezeptoren und Kainat-Rezeptoren
NMDA	N-Methyl-D-Asparaginsäure	20 µM	Agonismus an NMDA-Rezeptoren

3.8 Liste verwendeter Materialien

Instrumente und technische Geräte

Analog-Digital-Wandler	BNC 2090, National Instruments, Austin, USA PCI 6035E, National Instruments, Austin, USA
Drahtelektroden	Silberdraht, Science Products, Hofheim, Deutschland
Gefrierpunktsmometer	Osmomat 030, Gonotec, Berlin, Deutschland
Gewebeschneider	VT1200 S, Leica Mikrosystems, Wetzlar, Deutschland
Glaskapillaren	30-0066, Harvard Apparatus, Holliston, USA
Hauptverstärker	Multiclamp 700B, Molecular Devices, San Jose, USA
Impulsgenerator	Master 8, A.M.P.I., Jerusalem, Israel
Konfokalmikroskop	DMI6000B, Leica Mikrosystems, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop	Olympus BX-51WI, Olympus, Tokyo, Japan Olympus TH4-200, Olympus, Tokyo, Japan
Mikromanipulator	Mini 25, Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland SM7, Luigs und Neumann, Ratingen, Deutschland
Oszilloskop	HM1507-3, HAMEG, Mainhausen, Deutschland
Perfusionsschläuche	Rotilabo-PVC, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenziehgerät	DMZ Universal, Zeitz, Martinsried, Deutschland
Schlauchpumpe	Minipuls 3 Peristaltikpumpe, Gilson, Middleton, USA
Stimulationseinheit	ISO-Flex, A.M.P.I., Jerusalem, Israel
Universalobjektiv	UPlanFL N 4X.0.13 PhP, Olympus, Tokyo, Japan
Vorverstärker	CV-7B Headstage, Molecular Devices, San Jose, USA
Wasserbad	WBT Serie, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserimmersionsobjektiv	LumPlan FL/IR 60x 0.9NA, Olympus, Tokyo, Japan

Software

AxoGraph	John Clements (https://www.axograph.com , Abruf 01.01.2021)
Igor Pro	WaveMetrics, Portland, USA
Illustrator	Adobe Systems, San Jose, USA
ImageJ2	Curtis Rueden, Johannes Schindelin, Mark Hiner et al. ²⁰⁶
Fiji	Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise et al. ²⁰⁷
L-Measure	Ruggero Scorcioni, Sridevi Polavaram, Giorgio Ascoli ²⁰⁸
NeuroMatic	Jason Rothman, Angus Silver ²⁰⁹
Neutube	Linqing Feng, Ting Zhao, Jinhyun Kim ¹⁹⁹
Prism	GraphPad Software, San Diego, USA
R	R Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich
Stimfit	Segundo Guzman, Alois Schlögl, Christoph Schmidt-Hieber ¹⁹⁷

Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und Torcris (Bristol, England) bezogen.

4 Ergebnisse

4.1 Zelltypspezifisches Entladungsverhalten subikulärer Pyramidenzellen

Das Entladungsverhalten von Nervenzellen ist ein vielschichtiges, multidimensionales Phänomen, welches die Art der Verarbeitung von Reizen und schließlich die Reaktion auf diese widerspiegelt.¹¹⁹ Aus diesem Grund wird der Untersuchung zelltypspezifischer neuronaler Entladungsmuster eine besondere Bedeutung zugemessen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Entladungsverhalten von 369 subikulären Pyramidenzellen erfasst. Wie vorbeschrieben trat bei BURST im Rahmen lang andauernder depolarisierender Strominjektionen eine initiale burstende Entladung auf, welche teilweise von weiteren burstenden Entladungen, einzelnen Aktionspotentialen oder beidem gefolgt wurde. Bei REG zeigten sich eine oder mehrere Einzelentladungen in Form klar zeitlich voneinander separierter Aktionspotentiale. In Abbildung 18 sind Beispiele für die zelltypspezifischen elektrophysiologischen Entladungsmuster von BURST und REG dargestellt.

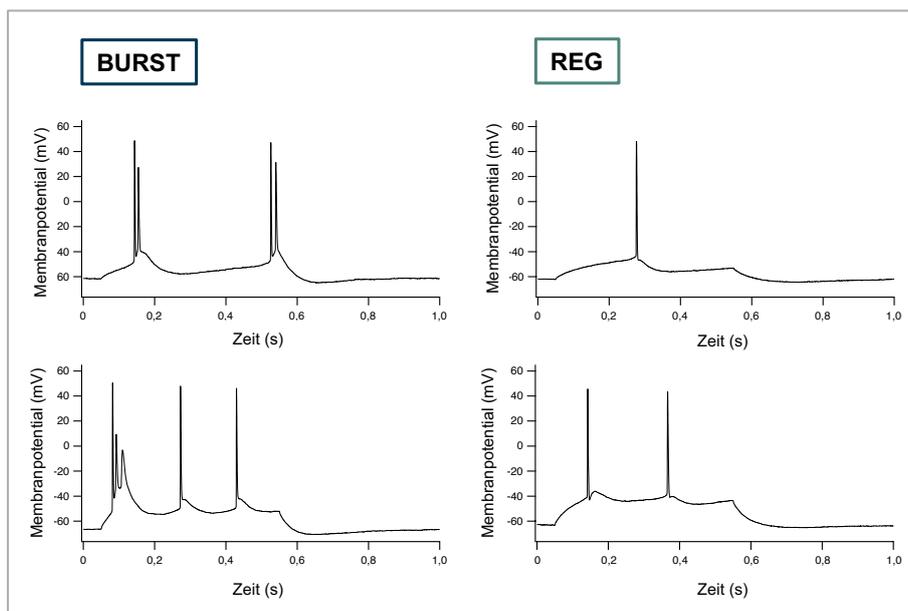


Abbildung 18 Entladungsverhalten BURST und REG. Beispiele für das elektrophysiologische Entladungsverhalten von burstenden (BURST) und regulär feuernenden (REG) subikulären Pyramidenzellen. Dargestellt ist der Verlauf des Membranpotentials als Antwort auf eine 500 ms lange depolarisierende Strominjektion nahe der Rheobase.

Von den 369 Zellen wurden 286 (77,51%) anhand ihres Entladungsverhaltens als BURST und 83 (22,49%) als REG klassifiziert. Bei BURST zeigten sich im Rahmen der 500 ms langen Strominjektion nahe der Rheobase eine (91,61%) oder mehrere (8,39%) burstende Entladungen, welche aus jeweils zwei bis vier schnell aufeinanderfolgenden Aktionspotentialen

bestanden. Die erste burstende Entladung enthielt hierbei am häufigsten zwei Aktionspotentiale. REG präsentierten im Rahmen der gleichen Strominjektion an der Rheobase ein bis vier separate Aktionspotentiale. Dabei wurden am häufigsten REG mit einem Aktionspotential detektiert und die Häufigkeit nahm mit der Anzahl zusätzlicher Aktionspotentiale ab. Visualisierungen der Zahlenverhältnisse in Form von Kreisdiagrammen sowie die absoluten Häufigkeiten können Abbildung 19 entnommen werden.

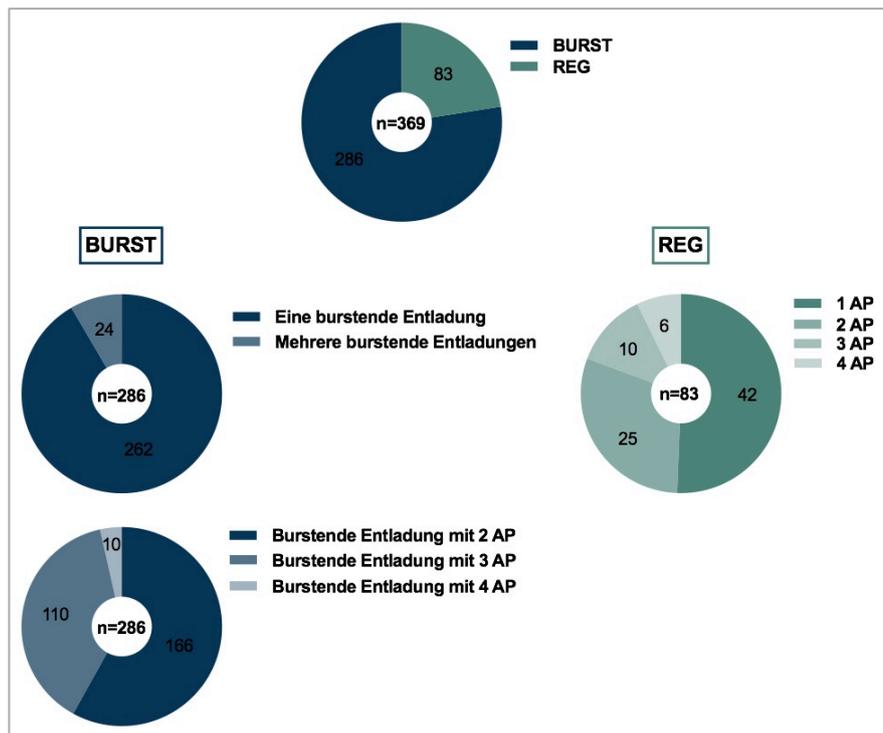


Abbildung 19 Häufigkeitsverteilung BURST und REG. Kreisdiagramme zur Darstellung der relativen Häufigkeitsverteilung von burstenden und regulär feuenden subikulären Pyramidenzellen (BURST, REG) sowie von unterschiedlichen Entladungsmustern innerhalb beider Gruppen unter Angabe absoluter Häufigkeiten und der Grundgesamtheit. AP=Aktionspotential.

Zur Objektivierung der intraexperimentellen Klassifikation in BURST und REG wurden die initialen IAPI innerhalb der rheobasenahen Spannungsantworten ausgewertet, in welchen mindestens zwei Aktionspotentiale ausgelöst wurden. BURST zeigten dabei im Mittel ein initiales IAPI von $12,11 \pm 0,16$ ms mit einem minimalen initialen IAPI von 4,40 ms und einem maximalen initialen IAPI von 23,20 ms. Bei REG wurde im Mittel ein initiales IAPI von $153,59 \pm 9,46$ ms mit einem minimalen initialen IAPI von 25,10 ms und einem maximalen initialen IAPI von 360,20 ms erfasst. Hierdurch konnte eine Trennlinie bei einem initialen IAPI von 25 ms gezogen werden, die eine zuverlässige Klassifikation von BURST und REG anhand des initialen IAPI als Klassifikationskriterium ermöglichte: Bei einem initialen IAPI von <25 ms wurden Zellen als BURST und bei einem initialen IAPI von ≥ 25 ms als REG klassifiziert (Abbildung 20).

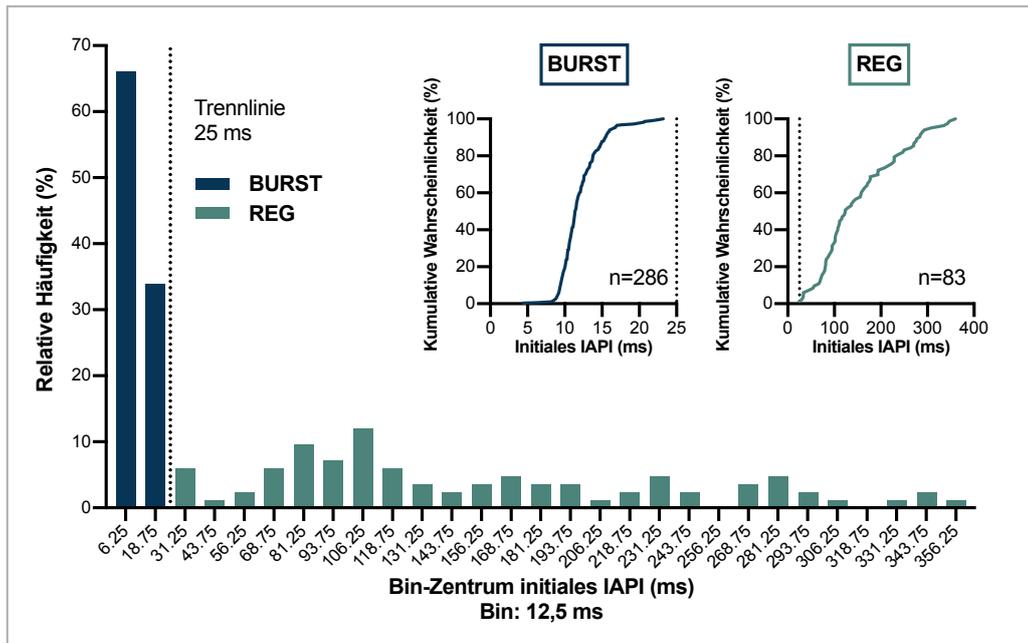


Abbildung 20 Inter-Aktionspotential-Intervalle bei BURST und REG. Histogramm der relativen Häufigkeitsverteilung der initialen Inter-Aktionspotential-Intervalle (IAPI) bei burstenden und regulär feuernden subikulären Pyramidenzellen (BURST, REG). Eingeschobene Graphen zeigen die kumulativen Verteilungskurven der initialen IAPI bei BURST und REG. Die gepunkteten Linien veranschaulichen die bei einem Wert von 25 ms gezogene Trennlinie zur Klassifikation von BURST und REG mittels des initialen IAPI.

4.2 Membraneigenschaften

Die Funktion neuronaler Schaltkreise wird maßgeblich durch die elektrophysiologischen Eigenschaften der in ihnen enthaltenen Neuronen bestimmt. In vielen Aspekten ähneln die Vorgänge, die an der neuronalen Membran als Reaktion auf Stromänderungen auftreten, denen einfacher elektrischer Leiter. Diese Reaktionen, die als passive Membraneigenschaften bezeichnet werden, sind von den aktiven Membraneigenschaften neuronaler Zellen abzugrenzen, bei denen die Reaktion auf eine Stromänderung mit der Aktivierung spannungs- oder ligantengesteuerter Ionenkanäle einhergeht. Die Untersuchung von Membraneigenschaften ist deshalb von besonderer Relevanz, da sich viele neuronale Zelltypen maßgeblich in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften unterscheiden.¹⁶

Um der Frage nach Unterschieden in den aktiven und passiven Membraneigenschaften von BURST und REG nachzugehen, wurden Messungen an 369 subikulären Pyramidenzellen durchgeführt. Zellen, die in unterschiedlichen extra- und intrazellulären Messlösungen untersucht worden waren, wurden getrennt voneinander ausgewertet. Interessanterweise zeigten sich hierbei signifikante Unterschiede in den erhobenen Parametern bei subikulären Pyramidenzellen des gleichen Zelltyps (BURST, REG) in Abhängigkeit der verwendeten extra- und intrazellulären Messlösungen (Abbildung 25, Abbildung 26). Daher werden im Folgenden

lediglich die Ergebnisse jener Zellen dargestellt, bei welchen die Membraneigenschaften unter Kontrollbedingungen (ACSF, Kalium-Gluconat-Lösung) ohne Erhöhung von Ionenkonzentrationen oder Zugabe von pharmakologisch aktiven Substanzen erhoben wurden. Von den 75 subikulären Pyramidenzellen, auf welche diese Kriterien zutrafen, wurden 54 (72%) als BURST und 21 (28%) als REG klassifiziert.

4.2.1 Aktive Membraneigenschaften

Rheobase und Aktionspotentialfrequenzen

Für die Erstellung der FI-Kurven, aus denen die im Folgenden beschriebenen Parameter ermittelt wurden, wurden Spannungsantworten auf depolarisierende Strominjektionen mit Stromstärken von +40 pA bis +240 pA ausgewertet.

BURST zeigten gegenüber REG erwartungsgemäß eine signifikant höhere Aktionspotential-Frequenz an der Rheobase (BURST: $7,82 \pm 0,41$ Hz $n=54$; REG: $4,29 \pm 0,54$ Hz $n=21$; $p < 0,001^{***}$, t-Test für unabhängige Stichproben und *post-hoc* Holm-Šidák-Test). Weiterhin fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Zelltypen bei Betrachtung des Frequenz-Adaptations-Index: REG zeigten eine signifikant stärkere Frequenzadaptation als BURST (BURST: $83,59 \pm 1,61\%$ $n=54$; REG: $73,70 \pm 1,84\%$ $n=21$; $p < 0,001^{***}$, t-Test für unabhängige Stichproben und *post-hoc* Holm-Šidák-Test). Die bei BURST und REG erfassten Werte für die Rheobase und den *Gain* unterschieden sich nicht signifikant. Abbildung 21 zeigt die mittleren FI-Kurven von BURST und REG sowie Violinen-Diagramme zu den zwei sich zwischen BURST und REG signifikant unterscheidenden Parametern.

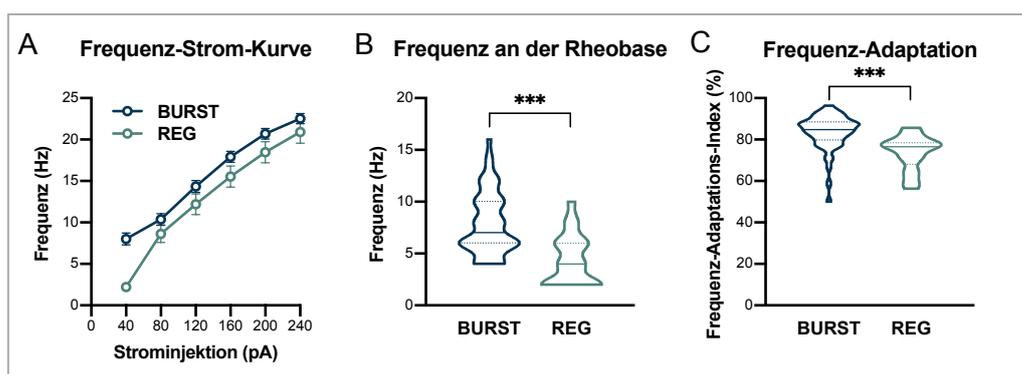


Abbildung 21 Aktionspotential-Frequenzen. **A** Gemittelte Frequenz-Strom-Kurven der Frequenzen ≥ 2 Hz (Rheobase) von burstenden und regulär feuernden subikulärer Pyramidenzellen (BURST, REG). **B** Violinen-Diagramm zur Frequenz an der Rheobase. Es zeigte sich eine höhere Frequenz an der Rheobase bei BURST gegenüber REG ($p < 0,001^{***}$). **C** Violinen-Diagramm zur Frequenz-Adaptation. Es zeigte sich eine stärkere Frequenzadaptation bei REG gegenüber BURST ($p < 0,001^{***}$). BURST: $n=54$, REG: $n=21$.

Aktionspotentialeigenschaften

Zur Charakterisierung der abgeleiteten Aktionspotentiale wurden Parameter der Aktionspotentialeigenschaften bei BURST aus den ersten zwei oder drei Aktionspotentialen innerhalb der ersten burstenden Entladung an der Rheobase und bei REG aus dem erstauftretenden Aktionspotential an der Rheobase ermittelt. Bei BURST trat das erste Aktionspotential im Vergleich zu REG signifikant früher im Verlauf der 500 ms langen Strominjektion auf (BURST: $83,75 \pm 6,43$ ms $n=54$; REG: $162,05 \pm 26,76$ ms $n=21$; $p=0,0456^*$, Welch-Test und *post-hoc* Holm-Šidák-Test). Ferner wiesen die initialen Aktionspotentiale von BURST ein gegenüber REG signifikant stärker hyperpolarisiertes Schwellenpotential auf (BURST: $-42,78 \pm 0,43$ mV $n=54$; REG: $-39,02 \pm 0,77$ mV $n=21$; $p<0,001^{***}$, t-Test für unabhängige Stichproben und *post-hoc* Holm-Šidák-Test). Weiterhin zeigte die bei BURST ausgelösten initialen Aktionspotentialen eine signifikant steilere maximale Anstiegssteigung verglichen mit den initialen Aktionspotentialen von REG (BURST: $167,64 \pm 3,60$ mV/ms $n=54$; REG: $146,36 \pm 6,66$ mV/ms $n=21$; $p=0,0220^*$, t-Test für unabhängige Stichproben und *post-hoc* Holm-Šidák-Test). Hinsichtlich der Aktionspotential-Amplitude, der Anstiegszeit, der FWHMA sowie der maximalen Abstiegssteigung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen BURST und REG festgestellt werden. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der Parameter, die sich in der statistischen Testung zwischen BURST und REG signifikant unterschieden.

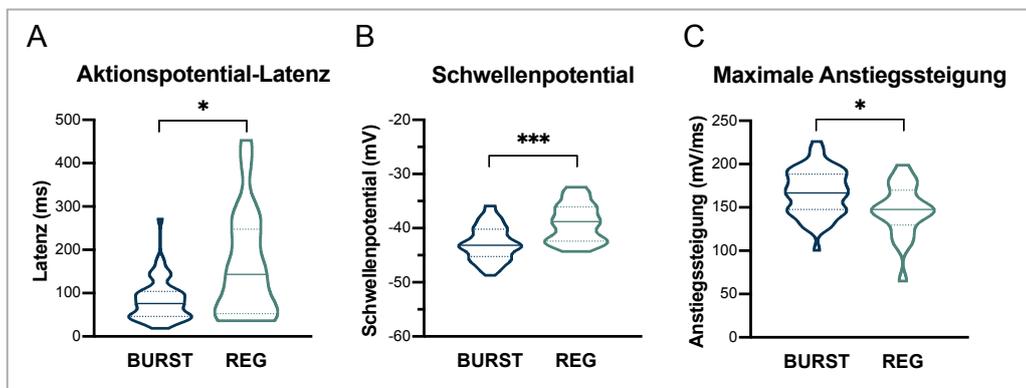


Abbildung 22 Aktionspotential-Eigenschaften. Violinen-Diagramme zeigen drei Parameter der Aktionspotentialeigenschaften burstender und regulär feuender subikulärer Pyramidenzellen (BURST, REG). **A** Das erste Aktionspotential trat im Mittel bei BURST gegenüber REG signifikant früher auf als bei REG ($p=0,0456^*$). **B** Das Schwellenpotential zur Auslösung eines Aktionspotentials war bei BURST signifikant stärker hyperpolarisiert als bei REG ($p<0,001^{***}$). **C** Aktionspotentiale von BURST zeigten eine signifikant steilere maximale Anstiegssteigung verglichen mit REG ($p=0,0220^*$). BURST: $n=54$, REG: $n=21$.

Bei BURST mit mehr als drei Aktionspotentialen innerhalb der ersten burstenden Entladung an der Rheobase ($n=31$) wurden neben dem initialen Aktionspotential weiterhin die nachfolgenden Aktionspotentiale ausgewertet. Das IAPI zwischen dem 2. und 3. Aktionspotential einer burstenden Entladung war stets größer als das zwischen dem 1. und 2. Aktionspotential (IAPI

1./2.: $9,80 \pm 0,25$ ms; IAPI 2./3.: $15,21 \pm 0,66$ ms; $n=31$, $p<0,001^{***}$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für abhängige Stichproben). Die Aktionspotentiale innerhalb der burstenden Entladung zeigten ferner Unterschiede in den untersuchten Parametern der Aktionspotentialkinetik. Das Schwellenpotential wurde zunehmend weniger negativ (1.AP: $-43,34 \pm 0,57$ ms, 2.AP: $-33,45 \pm 0,63$ ms, 3.AP: $-31,19 \pm 0,88$ ms; $n=31$, $p<0,001^{***}$ für alle Vergleiche, einfaktorielle ANOVA für abhängige Stichproben) und die Aktionspotentialamplitude nahm vom ersten bis zum dritten Aktionspotential ab (1.AP: $110,13 \pm 1,45$ ms, 2.AP: $86,09 \pm 1,57$ ms, 3.AP: $82,96 \pm 2,18$ ms; $n=31$, $p<0,001^{***}$ für alle Vergleiche, einfaktorielle ANOVA für abhängige Stichproben). Außerdem wurden die Aktionspotentiale breiter (1.AP: $1,87 \pm 0,05$ ms, 2.AP: $2,66 \pm 0,08$ ms, 3.AP: $4,74 \pm 0,28$ ms; $n=31$, $p<0,001^{***}$ für alle Vergleiche, einfaktorielle ANOVA für abhängige Stichproben) und zeigten längere Anstiegszeiten (1.AP: $0,38 \pm 0,01$ ms, 2.AP: $0,64 \pm 0,03$ ms, 3.AP: $0,90 \pm 0,08$ ms; $n=31$, $p<0,001^{***}$ für alle Vergleiche, einfaktorielle ANOVA für abhängige Stichproben) und geringere maximale Anstiegssteigungen (1.AP: $166,67 \pm 5,26$ mV/ms, 2.AP: $63,51 \pm 4,27$ mV/ms, 3.AP: $48,35 \pm 4,76$ mV/ms; $n=31$, $p<0,001^{***}$ für alle Vergleiche, einfaktorielle ANOVA für abhängige Stichproben) sowie geringere maximale Abstiegssteigungen (1.AP: $45,14 \pm 1,37$ mV/ms, 2. AP: $20,16 \pm 0,89$ mV/ms, 3.AP: $10,88 \pm 0,80$ mV/ms; $n=31$, $p<0,001^{***}$ für alle Vergleiche, einfaktorielle ANOVA für abhängige Stichproben).

Sag- und Rebound-Potentiale

Werte für das Sag-Potential, die Sag-Ratio und die Rebound-Depolarisation wurden bei einer Strominjektion von -200 pA ermittelt. Werte für die Rebound-Hyperpolarisation wurden bei einer Strominjektion von $+200$ pA bestimmt. Es zeigten sich bei BURST und REG ausgeprägte Sag-Potentiale mit ähnlichen Werten für das Sag-Potential und die Sag-Ratio. Auch in Bezug auf die Rebound-Depolarisation und die Rebound-Hyperpolarisation ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen BURST und REG finden. Bei der Erfassung von Rebound-Aktionspotentialen im Rahmen hyperpolarisierender Strominjektionen zeigten sich die Rebound-Aktionspotentiale von BURST als burstende Entladungen, während bei REG ein einzelnes Aktionspotential induziert wurde. Die Häufigkeit an Rebound-Aktionspotentialen nahm in Abhängigkeit der Stärke der hyperpolarisierenden Strominjektion zu. Bei BURST wurden bei einer Stromstärke von -240 pA in 38,89% und bei REG in 23,81% Rebound-Aktionspotentiale induziert (BURST: $n=21/54$, REG: $n=5/21$; $p=0,2843$, Fisher-Yates-Test). Im Mittel unterschied sich die niedrigste Stromstärke bei der Rebound-Aktionspotentiale auftraten zwischen BURST und REG nicht signifikant. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse für das Sag-Potential und die Sag-Ratio sowie repräsentative Beispiele für die Rebound-Aktionspotentiale von BURST und REG sowie die relative Häufigkeit ihres Auftretens in Abhängigkeit von der Stärke der hyperpolarisierenden Strominjektion.

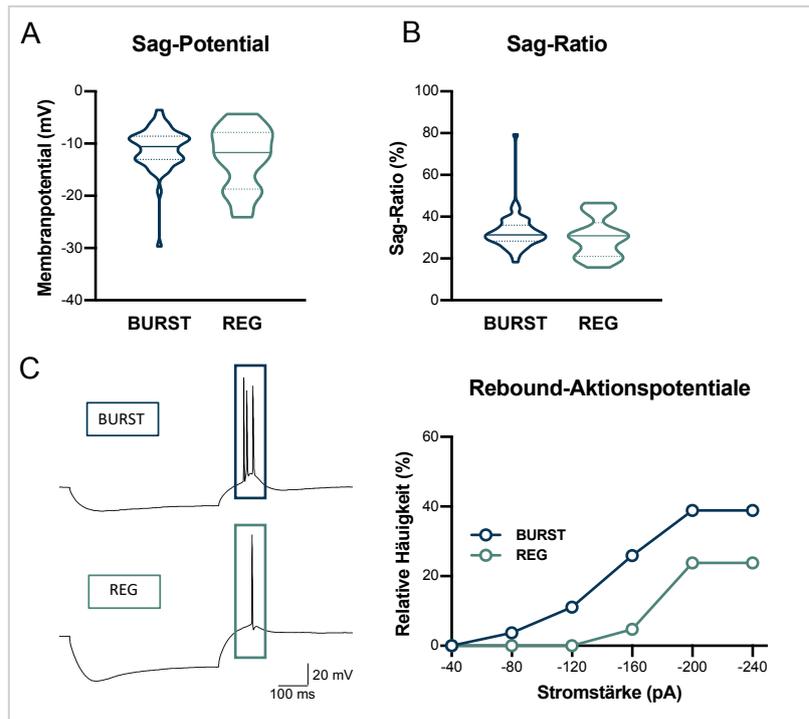


Abbildung 23 Sag- und Rebound-Potentiale. **A, B** Violinen-Diagramme zeigen die Ergebnisse von Sag-Potential und Sag-Ratio bei burstenden und regulär feuender subikulärer Pyramidenzellen (BURST, REG). **C** Links repräsentative Beispiele für im Rahmen hyperpolarisierender Strominjektionen auftretende Rebound-Aktionspotentiale (farbige Kästen). Rechts relative Häufigkeit des Auftretens von Rebound Aktionspotentialen bei BURST und REG im Rahmen hyperpolarisierender Strominjektionen zwischen -40 und -240 pA. BURST: n=54, REG: n=21.

4.2.2 Passive Membraneigenschaften

Die Parameter der passiven Membraneigenschaften wurden aus den Veränderungen des Membranpotentials auf die schrittweisen hyper- und depolarisierende Strominjektionen ermittelt. Das RMP war mit $-63,79 \pm 0,43$ mV bei BURST und $-61,76 \pm 1,13$ mV REG bei beiden Zelltypen ähnlich (BURST: n=54, REG: n=21; $p=0,1043$, Welch-Test und *post-hoc* Holm-Šidák-Test). Der Eingangswiderstand zeigte sich bei REG signifikant höher als bei BURST (BURST: $114,56 \pm 2,99$ M Ω n=54; REG: $145,50 \pm 7,23$ M Ω n=21; $p=0,0015^{**}$, Welch-Test und *post-hoc* Holm-Šidák-Test). Weiterhin wurde bei REG gegenüber BURST eine signifikant längere Membran-Zeit-Konstante erfasst (BURST: $30,97 \pm 1,76$ ms n=54; REG: $43,07 \pm 3,80$ ms n=21; $p=0,0030^{**}$, t-Test für unabhängige Stichproben und *post-hoc* Holm-Šidák-Test). In Abbildung 24 sind die Ergebnisse der Untersuchung der drei die passiven Membraneigenschaften charakterisierenden Parameter dargestellt.

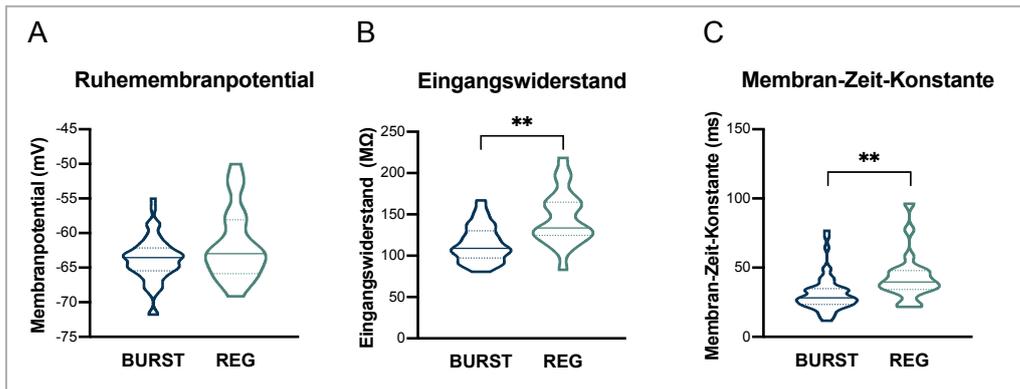


Abbildung 24 Passive Membraneigenschaften. Violinen-Diagramme zeigen die Ergebnisse der Untersuchung der passiven Membraneigenschaften burstender und regulär feuender subikulärer Pyramidenzellen (BURST, REG). **A** Das Ruhemembranpotential zeigte bei BURST und REG ähnliche Werte ($p=0,1043$). **B** Der Eingangswiderstand war bei BURST signifikant niedriger als bei REG ($p=0,0015^{**}$). **C** BURST hatten gegenüber REG eine signifikant verlängerte Membran-Zeit-Konstante ($p=0,0030^{**}$). BURST: $n=54$, REG: $n=21$.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich BURST und REG – neben der Fähigkeit burstende Entladungen zu generieren - im Hinblick auf einige die elektrophysiologischen Membraneigenschaften charakterisierende Parameter signifikant unterscheiden. Unterschiede zeigten sich bei der Frequenz von Aktionspotentialen an der Rheobase sowie der Eigenschaft Frequenzadaptation auszuprägen. Aktionspotentiale von BURST und REG unterschieden sich ferner in der Latenz ihres Auftretens, der Höhe ihres auslösenden Schwellenpotentials sowie in der maximalen Steigung ihres Anstiegs. Auch bei den passiven Membraneigenschaften zeigten Unterschiede in Bezug auf den Eingangswiderstand und die Membran-Zeit-Konstante. Insgesamt stützten diese Befunde die These, dass es sich bei BURST und REG um zwei verschiedene Klassen subikulärer Pyramidenzellen mit distinkten elektrophysiologischen Eigenschaften und Funktionen handelt.

Die Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen, Standardfehler des arithmetischen Mittels der Parameter der aktiven und passiven Membraneigenschaften sowie Informationen zur jeweiligen statistischen Signifikanztestung sind den Tabellen am Ende dieses Kapitels zu entnehmen (Tabelle 5-8).

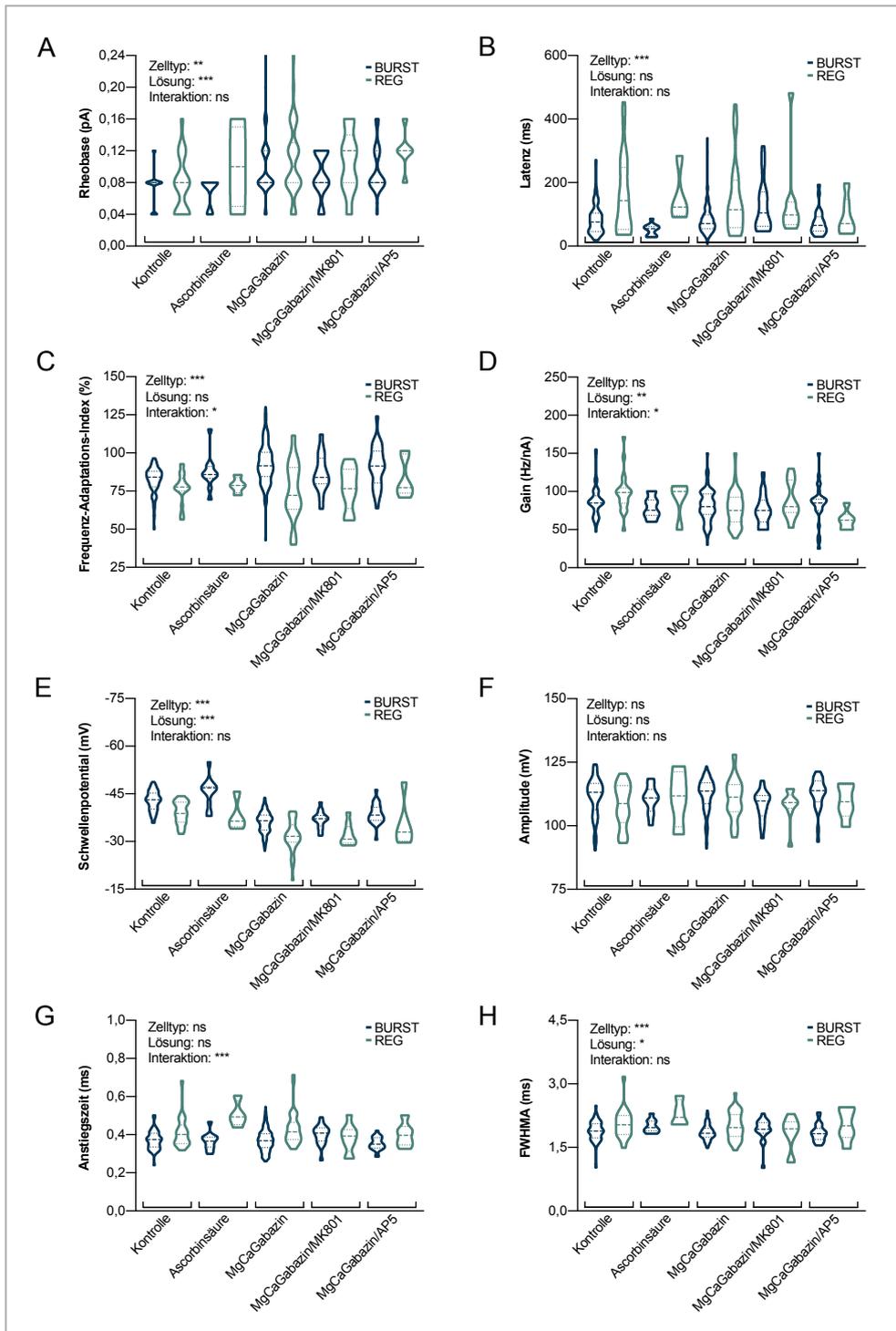


Abbildung 25 Vergleich zwischen verschiedenen intra- und extrazellulären Lösungen I.

Violinen-Diagramme zeigen die Ergebnisse der Untersuchung elektrophysiologischer Parameter burstender und regulär feuender subikulärer Pyramidenzellen (BURST n=253, REG n=74) in Anwesenheit verschiedener intra- und extrazellulärer Lösungen. Kontrolle: ACSF / K-Gluconat (BURST n=54, REG n=21); Ascorbinsäure: ACSF / K-Gluconat + Ascorbinsäure (BURST n=11, REG n=4); MgCaGabazin: ACSF + Magnesium + Calcium + Gabazin / K-Gluconat (BURST n=144, REG n=34); MgCaGabazin / MK801: ACSF + Magnesium + Calcium + Gabazin/ K-Gluconat + MK801 (BURST n=18, REG n=9); MgCaGabazin / AP5: ACSF + Magnesium + Calcium + Gabazin + AP5 / K-Gluconat (BURST n=26, REG n=6). **A Rheobase**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1,317)=8,05$, $p=0,0048^{**}$; Haupteffekt Lösung $F(4, 317)=8,04$, $p<0,001^{***}$; Interaktionseffekt $F(4,317)=0,76$, $p=0,5525$. **B Aktionspotential-Latenz**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1,317)=20,55$, $p<0,001^{***}$; Haupteffekt Lösung $F(4,317)=1,80$, $p=0,1280$; Interaktionseffekt $F(4,317)=1,89$, $p=0,1122$. **C Frequenz-Adaptations-Index**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1,302)=16,73$, $p<0,001^{***}$; Haupteffekt Lösung $F(4,302)=1,80$, $p=0,1308$; Interaktionseffekt $F(4,302)=12,46$, $p=0,0458^*$. **D Gain**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1,307)=0,27$, $p=0,6033$; Haupteffekt Lösung $F(4, 307)=4,62$, $p=0,0012^{**}$; Interaktionseffekt $F(4,307)=3,13$, $p=0,0151^*$. **E Schwellenpotential**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1,317)=54,65$, $p<0,001^{***}$; Haupteffekt Lösung $F(4,317)=46,66$, $p<0,001^{***}$; Interaktionseffekt $F(4, 317)=0,78$, $p=0,5377$. **F Aktionspotential-Amplitude**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1,317)=1,00$, $p=0,3177$; Haupteffekt Lösung $F(4,317)=2,20$, $p=0,0689$; Interaktionseffekt $F(4,317)=0,79$, $p=0,5350$. **G Anstiegszeit**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1,317)=2,97$, $p=0,0858$; Haupteffekt Lösung $F(4,317)=2,37$, $p=0,0525$; Interaktionseffekt $F(4,317)=8,047$, $p<0,001^{***}$. **H FWHMA**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1,317)=11,28$, $p<0,001^{***}$; Haupteffekt Lösung $F(4,317)=3,12$, $p=0,0155^*$; Interaktionseffekt $F(4,317)=1,79$, $p=0,1310$. ACSF = Artificielle cerebrospinale Lösung. K-Gluconat = Kalium-Gluconat-Lösung.

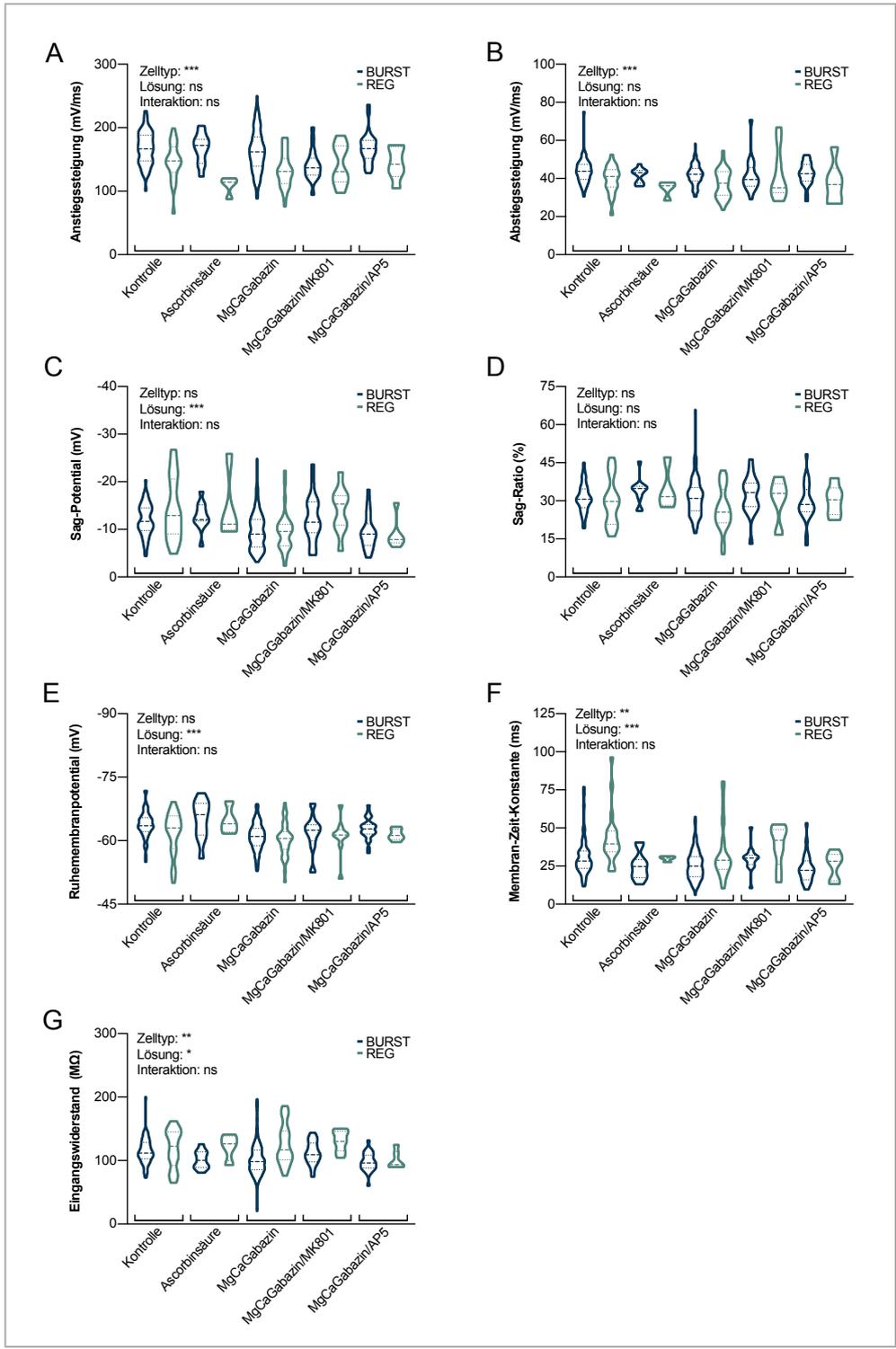


Abbildung 26 Vergleich zwischen verschiedenen intra- und extrazellulären Lösungen II.

Violinen-Diagramme zeigen die Ergebnisse der Untersuchung weiterer elektrophysiologischer Parameter burstender und regulär feuender subikulärer Pyramidenzellen (BURST n=253, REG n=74) in Anwesenheit verschiedener intra- und extrazellulärer Lösungen. Kontrolle: ACSF / K-Gluconat (BURST n=54, REG n=21); Ascorbinsäure: ACSF / K-Gluconat + Ascorbinsäure (BURST n=11, REG n=4); MgCaGabazin: ACSF + Magnesium + Calcium + Gabazin / K-Gluconat (BURST n=144, REG n=34); MgCaGabazin / MK801: ACSF + Magnesium + Calcium + Gabazin/ K-Gluconat + MK801 (BURST n=18, REG n=9); MgCaGabazin / AP5: ACSF + Magnesium + Calcium + Gabazin + AP5 / K-Gluconat (BURST n=26, REG n=6). **A Anstiegssteigung**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1, 317)=24,96$, $p<0,001^{***}$; Haupteffekt Lösung $F(4, 317)=2,15$, $p=0,0745$; Interaktionseffekt $F(4, 317)=2,32$, $p=0,0574$. **B Abstiegssteigung**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1, 317)=11,77$, $p<0,001^{***}$; Haupteffekt Lösung $F(4, 317)=1,62$, $p=0,1690$; Interaktionseffekt $F(4, 317)=0,97$, $p=0,4257$. **C Sag-Potential**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1, 305)=1,89$, $p=0,1702$; Haupteffekt Lösung $F(4, 305)=9,93$, $p<0,001^{***}$; Interaktionseffekt $F(4, 305)=1,00$, $p=0,4076$. **D Sag-Ratio**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1, 305)=0,88$, $p=0,3489$; Haupteffekt Lösung $F(4, 305)=1,83$, $p=0,1225$; Interaktionseffekt $F(4, 305)=0,94$, $p=0,4417$. **E Ruhemembranpotential**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1, 317)=2,61$, $p=0,1072$; Haupteffekt Lösung $F(4, 317)=6,47$, $p<0,001^{***}$; Interaktionseffekt $F(4, 317)=0,40$, $p=0,8082$. **F Membran-Zeit-Konstante**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1, 304)=10,88$, $p=0,0011^{**}$; Haupteffekt Lösung $F(4, 304)=6,10$, $p<0,001^{***}$; Interaktionseffekt $F(4, 304)=0,78$, $p=0,5399$. **G Eingangswiderstand**; zweifaktorielle ANOVA: Haupteffekt Zelltyp $F(1, 309)=9,95$, $p=0,0018^{**}$; Haupteffekt Lösung $F(4, 309)=2,56$, $p=0,0385^*$; Interaktionseffekt $F(4, 309)=1,99$, $p=0,0959$. ACSF = Artificielle cerebrospinale Lösung. K-Gluconat = Kalium-Gluconat-Lösung.

Tabelle 5 Rheobase und Aktionspotential-Frequenzen.

Untersuchte Parameter	Burstende Zellen n = 54				Regulär feuernde Zellen n = 21				Signifikanz Korrektur
	M	SD	SEM	Median	M	SD	SEM	Median	
Rheobase (pA)	74,07	22,53	3,07	80,00	76,19	35,56	7,76	80,00	p=0,8017 ⁽²⁾ p=0,8017 ⁽³⁾
Frequenz an der Rheobase (Hz)	7,82	3,02	0,41	7,00	4,29	2,47	0,54	4,00	p<0,001*** ⁽¹⁾ p<0,001*** ⁽³⁾
Frequenz-Adaptations-Index (%)	83,59	8,53	1,61	84,84	73,70	8,45	1,84	76,49	p<0,001*** ⁽¹⁾ p<0,001*** ⁽³⁾
Frequenz (Hz)									
+40 pA	1,93	3,66	0,50	0,00	1,05	1,20	0,26	0,00	
+80 pA	9,41	5,53	0,75	9,00	6,57	5,22	1,14	6,00	
+120 pA	14,33	5,24	0,71	16,00	11,62	6,02	1,31	12,00	
+160 pA	17,93	4,99	0,68	18,00	15,52	5,90	1,29	16,00	
+200 pA	20,70	4,67	0,64	20,00	18,48	5,83	1,27	18,00	
+240 pA	22,52	4,58	0,62	22,00	20,90	6,03	1,35	20,00	
Frequenz ab der Rheobase (Hz)									
+40 pA (n = 13, n = 10)	8,00	2,58	0,72	8,00	2,20	0,63	0,20	2,00	
+80 pA (n = 49, n = 16)	10,37	4,86	0,69	10,00	8,63	4,18	1,04	8,00	
+120 pA (n = 54, n = 20)	14,33	5,24	0,71	16,00	12,20	5,54	1,24	12,00	
+160 pA (n = 54, n = 21)	17,93	4,99	0,68	18,00	15,52	5,90	1,29	16,00	
+200 pA (n = 54, n = 21)	20,70	4,67	0,64	20,00	18,48	5,83	1,27	18,00	
+240 pA (n = 54, n = 21)	22,52	4,58	0,62	22,00	20,90	6,03	1,35	20,00	
Gain (Hz/nA)	93,12	21,56	2,93	85,00	103,10	31,10	6,79	100,00	p=0,1884 ⁽²⁾ p=0,3413 ⁽³⁾
n = Anzahl untersuchter Zellen					(1) = t-Test für unabhängige Stichproben				
p = Signifikanzwert					(2) = Welch-Test				
M = Mittelwert					(3) = <i>post-hoc</i> Holm-Šidák-Test				
SD = Standardabweichung									
SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels									

Tabelle 6 Aktionspotentialeigenschaften.

Untersuchte Parameter	Burstende Zellen n = 54				Regulär feuernde Zellen n = 21				Signifikanz Korrektur
	M	SD	SEM	Median	M	SD	SEM	Median	
AP-Latenz (ms)	83,75	47,25	6,43	76,20	162,05	122,64	26,76	143,31	p=0,0093** ⁽²⁾ p=0,0456* ⁽⁴⁾
IAP1 Rheobase (ms)									
1. und 2. AP	11,41	2,79	0,38	10,70	-	-	-	-	-
2. und 3. AP (n = 31)	15,21	3,65	0,66	14,60					
3. und 4. AP (n = 4)	24,85	4,55	2,78	24,10					
Schwellenpotential (mV)									
1. AP	-42,78	3,14	0,43	-43,15	-39,02	3,54	0,77	-38,79	p<0,001*** ⁽¹⁾ p<0,001*** ⁽⁴⁾
2. AP	-33,52	3,38	0,46	-33,82					
3. AP (n = 31)	-31,22	4,82	0,85	-32,01					
AP-Amplitude vom RMP (mV)									
1. AP	111,45	7,70	1,05	113,15	107,48	8,57	1,87	108,73	p=0,1242 ⁽³⁾ p=0,1242 ⁽⁴⁾
2. AP	88,44	8,58	1,17	89,77					
3. AP (n = 31)	83,02	11,93	2,11	85,39					
Anstiegszeit 20-80% (ms)									
1. AP	0,37	0,05	0,01	0,37	0,41	0,08	0,02	0,40	p=0,0353* ⁽²⁾ p=0,1022 ⁽⁴⁾
2. AP	0,64	0,15	0,02	0,62					
3. AP (n = 31)	0,90	0,43	0,08	0,75					
FWHMA (ms)									
1. AP	1,89	0,23	0,03	1,89	2,06	0,35	0,08	2,03	p=0,0523 ⁽²⁾ p=0,1022 ⁽⁴⁾
2. AP	2,86	0,74	0,10	2,75					
3. AP (n = 31)	4,73	1,51	0,27	4,37					
Max. Anstiegssteigung (mV/ms)									
1. AP	167,64	26,42	3,60	166,70	146,36	30,52	6,66	147,63	p=0,0037** ⁽¹⁾ p=0,0220* ⁽⁴⁾
2. AP	65,25	23,18	3,16	62,37					
3. AP (n = 31)	48,77	26,15	4,62	48,90					
Max. Abstiegssteigung (mV/ms)									
1. AP	43,93	6,73	0,92	43,75	39,45	7,40	1,61	41,05	p=0,0139* ⁽¹⁾ p=0,0545 ⁽⁴⁾
2. AP	19,47	5,23	0,71	19,61					
3. AP (n = 31)	10,86	4,39	0,78	10,49					

AP = Aktionspotential
 n = Anzahl untersuchter Zellen
 p = Signifikanzwert
 M = Mittelwert
 SD = Standardabweichung
 SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels
 max. = maximal

(1) = t-Test für unabhängige Stichproben
 (2) = Welch-Test
 (3) = Mann-Whitney-Test
 (4) = *post-hoc* Holm-Šidák-Test

Tabelle 7 Sag- und Rebound-Potentiale.

Untersuchte Parameter	Burstende Zellen n = 54				Regulär feuernde Zellen n = 21				Signifikanz Korrektur
	M	SD	SEM	Median	M	SD	SEM	Median	
Sag-Potential (mV)	-10,98	4,03	0,54	-10,59	-12,77	5,92	1,29	-11,72	p=0,2134 ⁽²⁾ p=0,5133 ⁽⁴⁾
Sag-Ratio (%)	32,61	8,69	1,18	31,35	30,11	9,61	2,10	30,91	p=0,2803 ⁽¹⁾ p=0,5133 ⁽⁴⁾
Rebound-Depolarisation (mV)	8,09 (n=33)	2,25 (n=33)	0,39 (n=33)	7,61 (n=33)	7,81 (n=16)	3,78 (n=16)	0,94 (n=16)	7,63 (n=16)	p=0,7857 ⁽²⁾ p=0,7857 ⁽⁴⁾
Rebound-AP (n)									
-40 pA		n = 0				n = 0			
-80 pA		n = 2 (3,70 %)				n = 0			
-120 pA		n = 6 (11,11 %)				n = 0			
-160 pA		n = 14 (25,93 %)				n = 1 (4,76 %)			
-200 pA		n = 21 (38,89 %)				n = 5 (23,81 %)			
-240 pA		n = 21 (38,89 %)				n = 5 (23,81 %)			
Stromstärke Rebound-AP (pA)	-158,10	38,94	8,50	-160,00	-192,00	17,89	8,00	-200,00	p=0,0853 ⁽³⁾ p=0,0773 ⁽⁴⁾
Rebound-Hyperpolarisation (mV)	-5,30	1,79	0,24	-5,21	-4,17	1,74	0,38	-4,54	p=0,0160 ^{*(1)} p=0,0773 ⁽⁴⁾

AP = Aktionspotential
n = Anzahl untersuchter Zellen
p = Signifikanzwert
M = Mittelwert
SD = Standardabweichung
SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels

(1) = t-Test für unabhängige Stichproben
(2) = Welch-Test
(3) = Mann-Whitney-Test
(4) = *post-hoc* Holm-Šidák-Test

Tabelle 8 Passive Membraneigenschaften.

Untersuchte Parameter	Burstende Zellen n = 54				Regulär feuernde Zellen n = 21				Signifikanz Korrektur
	M	SD	SEM	Median	M	SD	SEM	Median	
RMP (mV)	-63,79	3,18	0,43	-63,53	-61,76	5,17	1,13	-62,98	p=0,1043 ⁽²⁾ p=0,1043 ⁽³⁾
Eingangswiderstand (MΩ)	114,56	22,00	2,99	109,10	145,50	33,12	7,23	133,58	p<0,001*** ⁽²⁾ p=0,0015** ⁽³⁾
Membran-Zeit-Konstante (ms)	30,97	12,89	1,76	28,28	43,07	17,40	3,80	39,58	p=0,0015** ⁽¹⁾ p=0,0030** ⁽³⁾

n = Anzahl untersuchter Zellen
p = Signifikanzwert
RMP = Ruhemembranpotential
M = Mittelwert
SD = Standardabweichung
SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels

(1) = t-Test für unabhängige Stichproben
(2) = Welch-Test
(3) = *post-hoc* Holm-Šidák-Test

4.3 Spontanaktivität

Spontane synaptische Entladungen entstehen in Abwesenheit extra- und intrazellulärer Stimulation durch spontane Freisetzung von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln. Diese spontane Neurotransmitterfreisetzung kann eigenständig geschehen oder aufgrund spontan generierter Aktionspotentiale auftreten. Wenn die Entladungen ohne Zugabe von Blockern der synaptischen Transmission aufgenommen werden, können ihre Ursprünge auch spontane präsynaptische Aktionspotentiale sein, wodurch sie sich als sEPSC von sogenannten mEPSC (engl. *miniature excitatory postsynaptic currents*) unterscheiden.²¹⁰

Die Spontanaktivität in Form von sEPSC von 56 subikulären Pyramidenzellen wurde über einen Zeitraum von 9 Minuten aufgezeichnet. Davon wurden 41 Zellen in der elektrophysiologischen Charakterisierung als BURST und 15 Zellen als REG klassifiziert. Zur besseren interexperimentellen Vergleichbarkeit wurde der Messabschnitt, welcher die ersten 90 sEPSC einer jeden Messung enthielt, extrahiert und im Hinblick auf die Parameter der Spontanaktivität ausgewertet. Abbildung 27 zeigt Beispiele für aus Messabschnitten extrahierter sEPSC sowie Raster-Diagramme der aufgetretenen sEPSC bei BURST und REG.

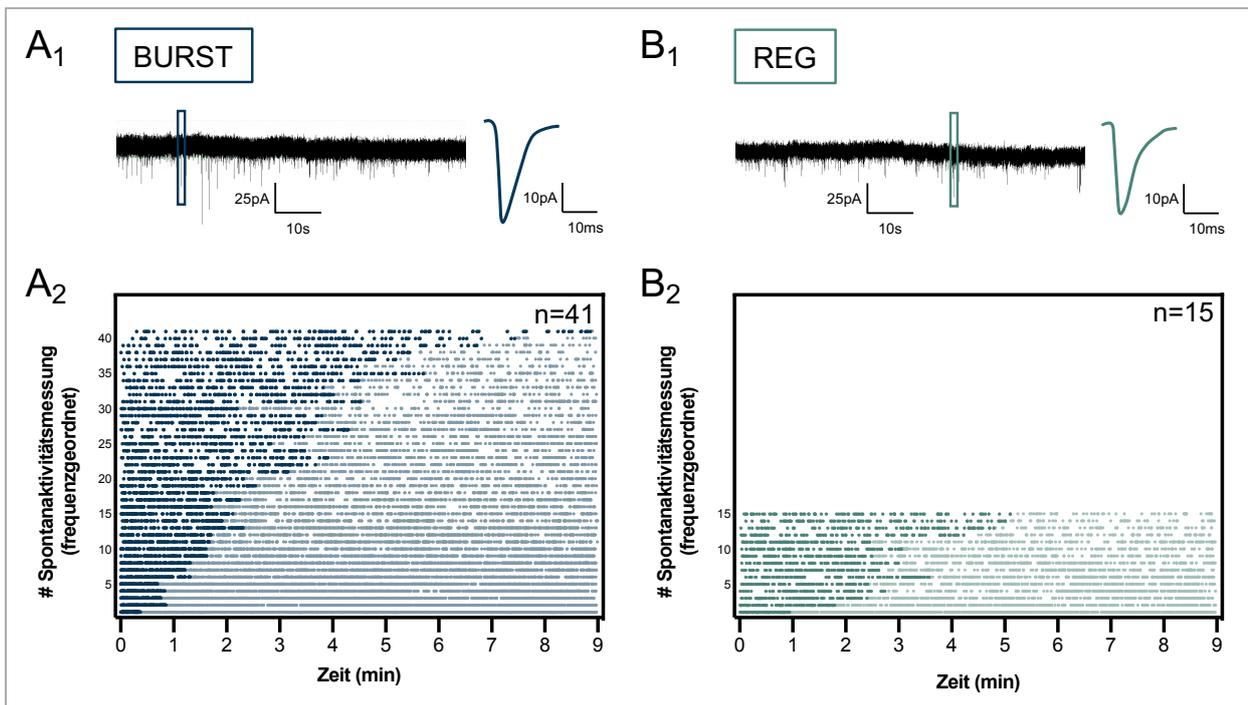


Abbildung 27 Messungen der Spontanaktivität bei BURST und REG. A₁, B₁ Repräsentativer Messausschnitt der Spontanaktivitätsmessung bei burstenden und regulär feuernenden subikulären Pyramidenzellen (BURST, REG). Gezeigt ist der Verlauf über einen Zeitraum von 75 Sekunden (links) sowie jeweils ein extrahiertes sEPSC (rechts). A₂, B₂ Raster-Diagramme der Verteilung der während des gesamten Messzeitraums von 9 Minuten aufgetretenen sEPSC bei BURST und REG. Die Zahlen auf der der Y-Achse repräsentieren dabei jeweils eine Spontanaktivitätsmessung einer einzelnen Zelle (#Spontanaktivitätsmessung) und sind von hohen zu niedrigen Frequenzen geordnet (#Spontanaktivitätsmessung 1 hat die höchste Frequenz). In die Auswertung eingeschlossen wurden die ersten 90 sEPSC einer jeden Messung. Verblasste Blau- und Grüntöne kennzeichnen die nicht in die Auswertung eingeschlossenen folgenden sEPSC.

Spontanaktivität in Form von sEPSC trat bei BURST mit einer mittleren Frequenz von $0,79 \pm 0,11$ Hz und bei REG mit einer Frequenz von $0,58 \pm 0,08$ Hz auf (BURST: $n=41$, REG: $n=15$; $p=0,9303$, Mann-Whitney-Test und *post-hoc* Holm-Šidák-Test). Es zeigte sich eine ähnliche Regelmäßigkeit der sEPSC bei beiden Zelltypen, gemessen am Variationskoeffizienten der IEI, der bei BURST im Mittel $99,47 \pm 1,98\%$ und bei REG $103,80 \pm 3,92$ betrug (BURST: $n=41$, REG: $n=15$; $p=0,9083$, t-Test für unabhängige Stichproben und *post-hoc* Holm-Šidák-Test). Ferner konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf die weiteren sechs untersuchten Parameter der Spontanaktivität (mittleres IEI, mittlere Amplitude, mittlere FWHMA, mittlere Anstiegszeit, mittlere maximale An- und Abstiegssteigung) detektiert werden. Abbildung 28 zeigt die Ergebnisse von vier charakteristischen Parametern der Spontanaktivität bei BURST und REG. Abschließend ist festzuhalten, dass keine Hinweise darauf gefunden werden konnten, dass sich die Ausprägung von Spontanaktivität zwischen BURST und REG maßgeblich unterscheidet. Die Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen, Standardfehler des arithmetischen Mittels der Parameter der Spontanaktivität sowie Informationen zur jeweiligen statistischen Signifikanztestung sind der Tabelle am Ende dieses Kapitels zu entnehmen (Tabelle 9).

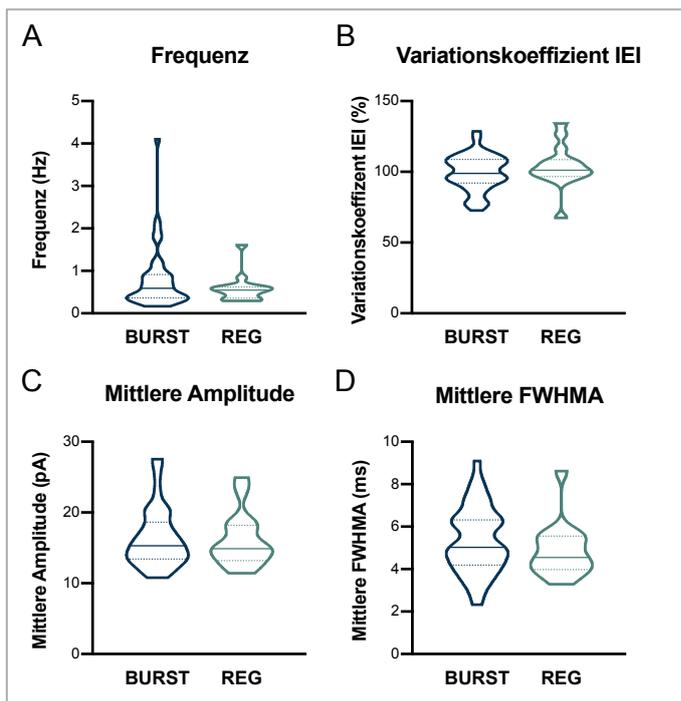


Abbildung 28
Spontanaktivität bei BURST und REG.
 Violinen-Diagramme zeigen die Ergebnisse der Untersuchung von vier Parametern der Spontanaktivität burstender und regulär feuender subikulärer Pyramidenzellen (BURST, REG). Die sEPSC von BURST und REG wiesen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf ihre Frequenz ($p=0,9303$; **A**), die Regelmäßigkeit ihres Auftretens gemessen am Variationskoeffizienten der Inter-Event-Intervalle (Variationskoeffizient IEI; $p=0,9083$; **B**), ihre mittlere Amplitude ($p=0,9979$; **C**) oder ihre mittlere Breite gemessen an der halb-maximalen Amplitude in der auf- und absteigenden Phase des sEPSC (FWHMA; $p=0,9083$; **D**) auf. BURST: $n=41$, REG: $n=15$.

Zur Erstellung von Histogrammen und kumulativen Verteilungsfunktionen wurden die ersten 90 aller im Rahmen der Spontanaktivitätsmessung bei BURST oder REG auftretenden sEPSC, zusammengefasst (sEPSC BURST: $n=3690$ von $n=41$ BURST; sEPSC REG: $n=1350$ von $n=15$ REG). Das Signifikanzniveau wurde für die statistische Testung mittels des nicht-

parametrischen Kolmogorov-Smirnov-Tests auf $p < 0,001$ herabgesetzt. Bei den kumulativen Verteilungskurven des IEI ($D=0,0610$, $p=0,0031$ *ns*, Kolmogorov-Smirnov-Test und *post-hoc* Holm-Šidák-Test) und der Amplitude ($D=0,0658$, $p=0,0011$ *ns*, Kolmogorov-Smirnov-Test und *post-hoc* Holm-Šidák-Test) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen BURST und REG. Signifikante Unterschiede der kumulativen Verteilungskurven traten bei der Anstiegszeit ($D=0,1366$, $p < 0,001^*$, Kolmogorov-Smirnov-Test und *post-hoc* Holm-Šidák-Test), der FWHMA ($D=0,1650$, $p < 0,001^*$, Kolmogorov-Smirnov-Test und *post-hoc* Holm-Šidák-Test) sowie der maximalen Anstiegssteigung ($D=0,1631$, $p < 0,001^*$, Kolmogorov-Smirnov-Test und *post-hoc* Holm-Šidák-Test) und der maximalen Abstiegssteigung ($D=0,1835$, $p < 0,001^*$, Kolmogorov-Smirnov-Test und *post-hoc* Holm-Šidák-Test) auf. Bei den kumulativen Verteilungskurven der Anstiegszeit und der FWHMA zeigte sich eine Rechtsverschiebung von BURST gegenüber REG. Ferner trat eine sichtbare Linksverschiebung von BURST gegenüber REG bei den kumulativen Verteilungskurven der maximalen Anstiegs- und Abstiegssteigung auf. In Abbildung 29 sind Histogramme und kumulative Verteilungsfunktionen der genannten Parameter dargestellt.

Tabelle 9 Parameter der Spontanaktivität.

Untersuchte Parameter	Burstende Zellen n=41				Regulär feuernde Zellen n=15				Signifikanz Korrektur
	M	SD	SEM	Median	M	SD	SEM	Median	
Frequenz (Hz)	0,79	0,73	0,11	0,59	0,58	0,32	0,08	0,55	$p=0,4861$ ⁽³⁾ $p=0,9303$ ⁽⁴⁾
Mittleres IEI (ms)	2041,03	1270,87	198,48	1711,00	2069,87	811,46	209,52	1876,00	$p=0,9354$ ⁽¹⁾ $p=0,9979$ ⁽⁴⁾
CV IEI (%)	99,47	12,66	1,98	98,94	103,80	15,16	3,92	101,10	$p=0,2892$ ⁽¹⁾ $p=0,9083$ ⁽⁴⁾
Mittlere Amplitude (pA)	16,40	4,17	0,65	15,30	16,18	3,86	0,10	14,90	$p=0,8721$ ⁽³⁾ $p=0,9979$ ⁽⁴⁾
Mittlere Anstiegszeit 20-80% (ms)	1,53	0,34	0,05	1,46	1,56	0,68	0,18	1,39	$p=0,8881$ ⁽²⁾ $p=0,9979$ ⁽⁴⁾
Mittlere FWHMA (ms)	5,34	1,56	0,24	5,03	4,87	1,29	0,33	4,55	$p=0,3076$ ⁽¹⁾ $p=0,9083$ ⁽⁴⁾
Mittlere maximale Anstiegssteigung (pA/ms)	32,52	6,02	0,94	31,52	34,29	6,68	1,73	34,12	$p=0,3471$ ⁽¹⁾ $p=0,9083$ ⁽⁴⁾
Mittlere maximale Abstiegssteigung (pA/ms)	29,09	4,61	0,72	27,93	31,45	4,88	1,26	30,64	$p=0,1008$ ⁽¹⁾ $p=0,5727$ ⁽⁴⁾
n = Anzahl untersuchter Zellen p = Signifikanzwert M = Mittelwert CV = Variationskoeffizient SD = Standardabweichung SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels					(1) = t-Test für unabhängige Stichproben (2) = Welch-Test (3) = Mann-Whitney-Test (4) = <i>post-hoc</i> Holm-Šidák-Test				

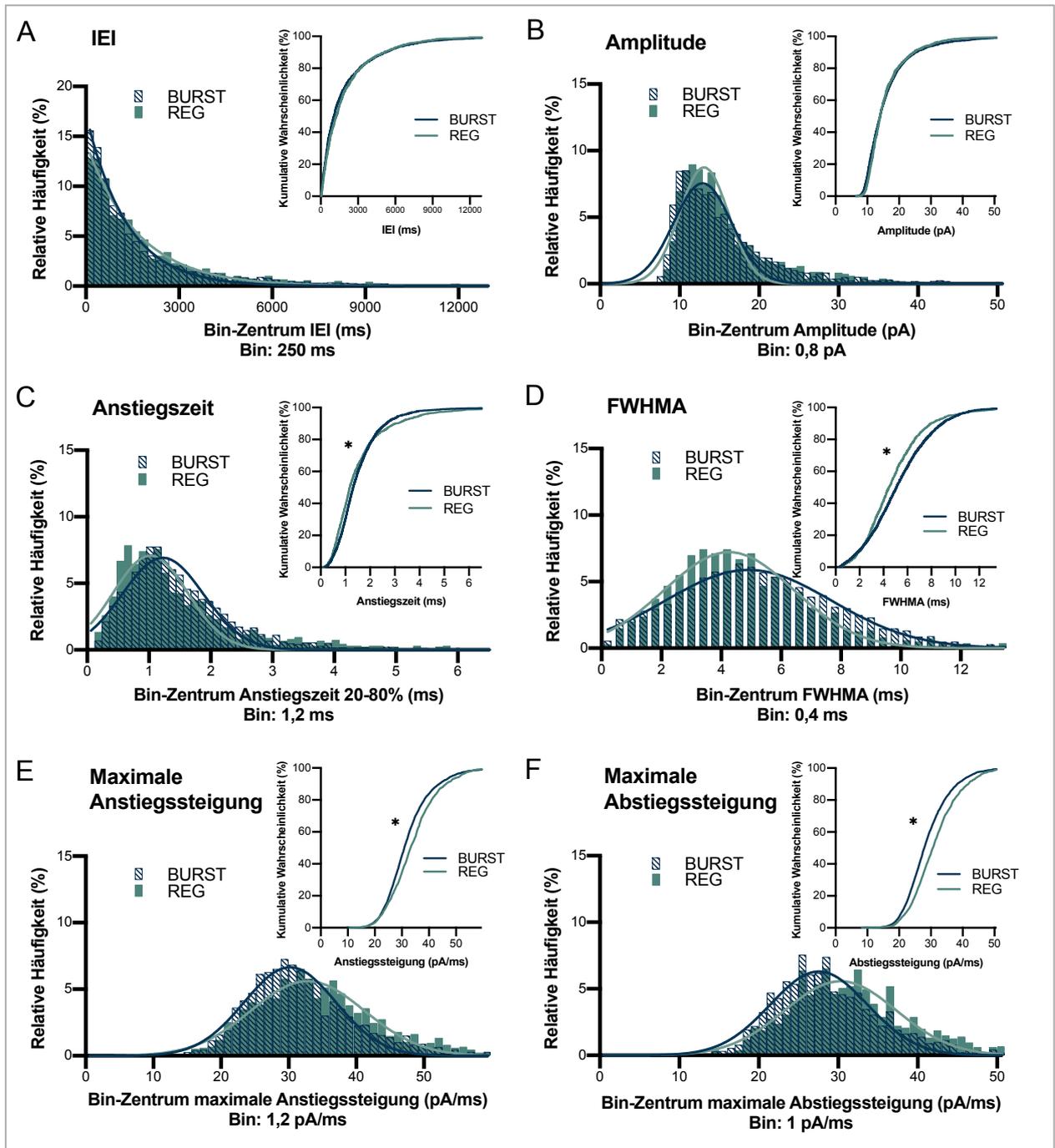


Abbildung 29 Häufigkeitsverteilung und Verteilungskurven der Parameter der Spontanaktivität. Histogramme der relativen Häufigkeitsverteilung der erfassten Parameter der sEPSC bei burstenden und regulär feuernden subikulären Pyramidenzellen (BURST, REG). Die ersten 90 sEPSC einer jeden Messung aus der Gruppe BURST und REG wurden berücksichtigt (sEPSC BURST: n=3690 aus n=41 BURST, sEPSC REG: n=1350 aus n=15 REG). Eingeschobene Graphen zeigen die zugehörigen kumulativen Verteilungskurven. Die X-Achsen wurde auf den Bereich in dem 99% der Ergebnisse lagen beschnitten. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,001$ herabgesetzt. **A** Inter-Event-Intervall (IEI, $p=0,0031$). **B** Amplitude ($p=0,0011$). **C** Anstiegszeit ($p < 0,001^*$). Rechtsverschiebung der Verteilungskurve von BURST. **D** Breite gemessen an der halb-maximalen Amplitude in der auf- und absteigenden Phase des sEPSC (FWHMA; $p < 0,001^*$). Rechtsverschiebung der Verteilungskurve von BURST. **E** Maximale Anstiegssteigung ($p < 0,001^*$). Linksverschiebung der Verteilungskurve von BURST. **F** Maximale Abstiegssteigung ($p < 0,001^*$). Linksverschiebung der Verteilungskurve von BURST.

4.4 Dendritische Morphologie

Eine wichtige Determinante dafür, wie Neuronen Informationen integrieren, ist die Form ihrer Dendriten.^{211,212} In der Architektur des dendritischen Systems spiegelt sich ein Optimierungsvorgang wider, welcher einerseits den Nutzen einer möglichst schnellen Signalweiterleitung bei andererseits gleichsam geringen „Materialkosten“ für dendritische Vernetzung berücksichtigt.²¹³ In Simulationen konnte gezeigt werden, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften einer Nervenzelle - wie ihr Aktionspotential-Entladungsmuster - in einem hohen Grad von der dendritischen Morphologie beeinflusst werden können.²¹⁴

Aus diesem Grund wurden die Parameter der dendritischen Morphologie von 31 gefärbten subikulären Pyramidenzellen untersucht, von welchen 23 als BURST und 8 als REG klassifiziert wurden. Alle subikulären Zellen wiesen ein trianguläres bis ovoides Soma auf. Der lange apikale Dendritenbaum erstreckte sich durch das Stratum moleculare und reichte oft bis zur Fissura hippocampalis, während sich die multiplen basalen Dendriten innerhalb des Stratum pyramidale ausbreiteten und in dessen tiefen Schichten terminierten. Oft konnten an den dendritischen Ausläufern *Spines* sichtbar gemacht werden. In manchen Fällen konnten langstreckige Axonabschnitte, die vom basalen Zellsoma ausgingen und in den Alveus eintraten, identifiziert werden. Im Gegensatz zu basalen Dendriten wiesen diese Axonabschnitte typischerweise keine *Spines* und einen geringeren Durchmesser auf. Bei Betrachtung der gefärbten Zellen unter dem Mikroskop fielen keine morphologischen Unterschiede zwischen den beiden zuvor elektrophysiologisch charakterisierten Typen subikulärer Pyramidenzellen auf. Abbildung 30 zeigt zwei exemplarische Z-Projektionen von immunhistochemisch gefärbten Zellen aus der Gruppe BURST und REG sowie Beispiele für skelettierte Dendritenrekonstruktionen, die auf Basis der Z-Stacks angefertigt wurden. Letztere bildeten die Grundlage für die Sholl-Analyse und alle weiteren Auswertungen der dendritischen Morphologie.

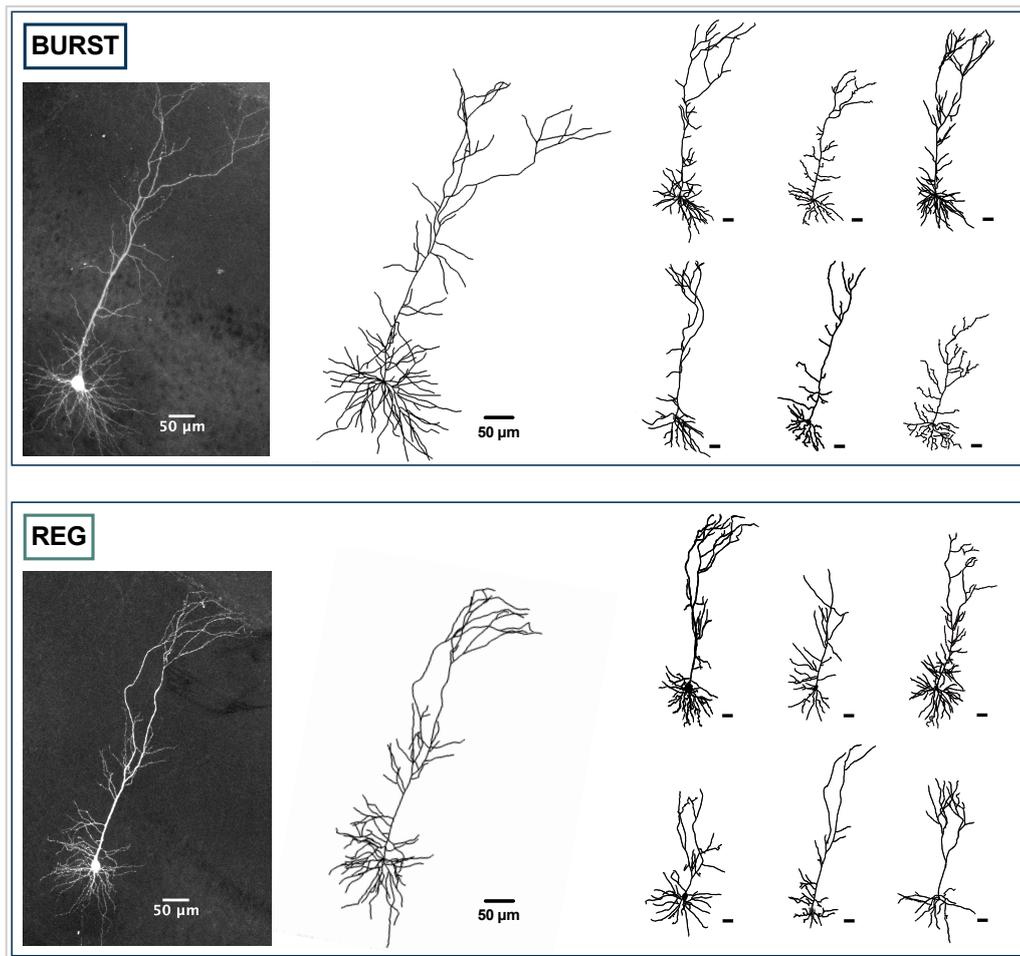


Abbildung 30 Z-Projektionen und Dendritenrekonstruktionen von BURST und REG. Links Z-Projektionen der mit einem 20x Objektiv aufgenommenen immunhistochemisch gefärbten burstenden und regulär feuernden subikulären Pyramidenzelle (BURST, REG). Rechts daneben jeweils die korrespondierende skelettierte Dendritenrekonstruktion sowie weitere skelettierte Dendritenrekonstruktionen beider Zelltypen.

4.4.1 Sholl-Analyse apikaler und basaler Dendriten

Die Sholl-Analyse ist eine morphometrische Methode zur quantitativen Beschreibung der dendritischen Morphologie von Nervenzellen.²⁰⁰ Dabei werden konzentrische Kreise mit zunehmenden Radien, die auf das Soma eines Neurons zentriert sind, auf eine Zelle projiziert. Für jeden dieser Kreise kann so die Anzahl an Schnittpunkten mit den Dendriten ermittelt werden. Sholl-Analysen wurden an apikalen und basalen Dendritenbäumen von BURST und REG mit einer Radiusschrittweite von 10 µm durchgeführt. Das resultierende Diagramm, das die gemittelte Anzahl dendritischer Schnittpunkte als Funktion des Radius für BURST und REG beinhaltet, ist in Abbildung 31 dargestellt.

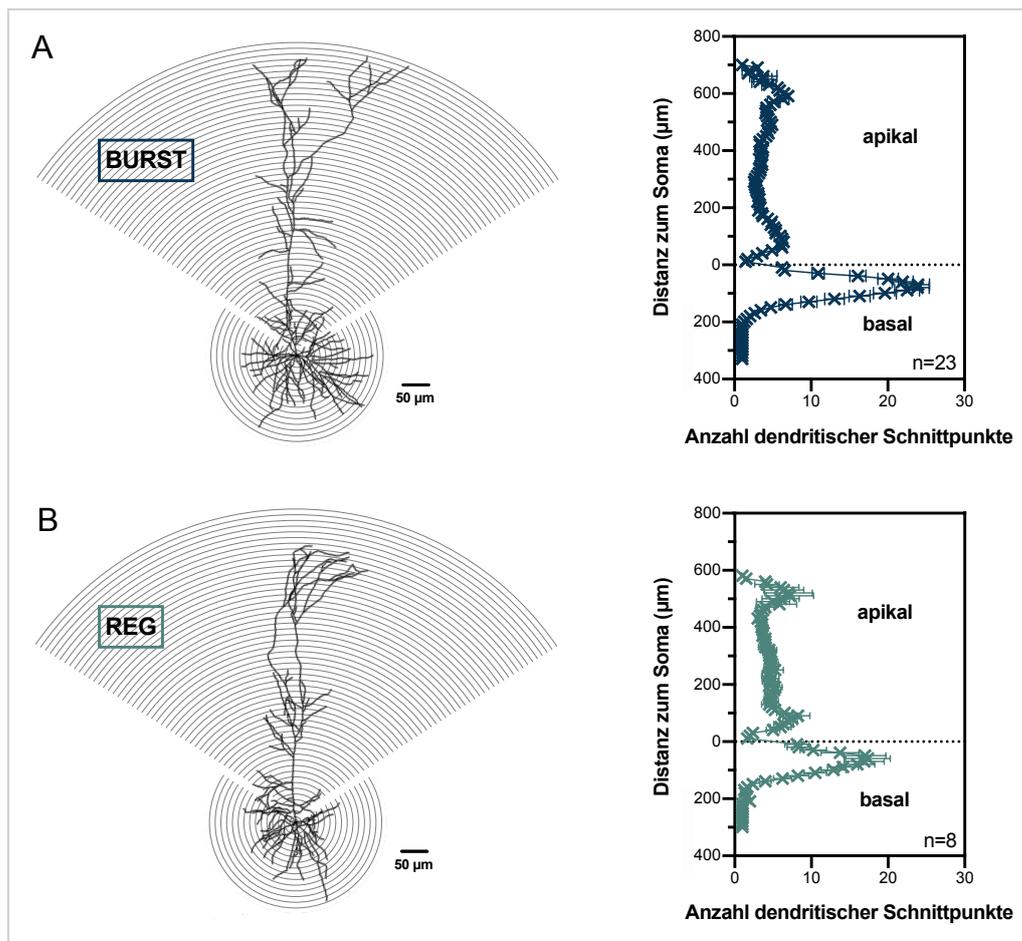


Abbildung 31 Sholl-Diagramme bei BURST und REG. Links Darstellung der Durchführung von Sholl-Analysen bei je einer burstenden (BURST, **A**) und regulär feuernden subikulären Pyramidenzelle (REG, **B**). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die konzentrischen Kreise nur in Teilen dargestellt. Auf eine Differenzierung der dem apikalen oder basalen Dendritenbaum zugeordneten und somit getrennt analysierten Dendriten wurde für die Darstellung verzichtet. Rechts Sholl-Diagramme für BURST (**A**) und REG (**B**), die die gemittelte Anzahl dendritischer Schnittpunkte als Funktion des Radius zeigen. Radiusschrittweite 10 µm.

Aus den Sholl-Diagrammen der apikalen und basalen Dendriten einzelner subikulärer Pyramidenzellen wurden alle im folgenden genannten Parameter extrahiert. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse der Sholl-Analyse apikaler und basaler Dendritenbäume dargestellt. Bei den apikalen Dendriten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Summe, dem Mittelwert oder der maximalen Anzahl dendritischer Schnittpunkte, dem schließenden Radius oder dem Radius mit der maximalen Anzahl an Schnittpunkten zwischen BURST und REG. Gleiches galt für die bei basalen Dendriten erhobenen Sholl-Analyse-Parameter. Auch in Bezug auf die ermittelten Regressionskoeffizienten (log-log-Regressionskoeffizienten bei apikalen Dendriten und semi-log-Regressionskoeffizienten bei basalen Dendriten), welche ein Maß für die Abnahme der Anzahl an dendritischen Schnittpunkten mit zunehmender Entfernung vom Soma darstellen, konnten keine Unterschiede zwischen BURST und REG detektiert werden.

Zusammenfassend zeigten sich bei den hier durchgeführten Sholl-Analysen an basalen und apikalen Dendritenbäumen keine signifikanten Unterschiede zwischen BURST und REG.

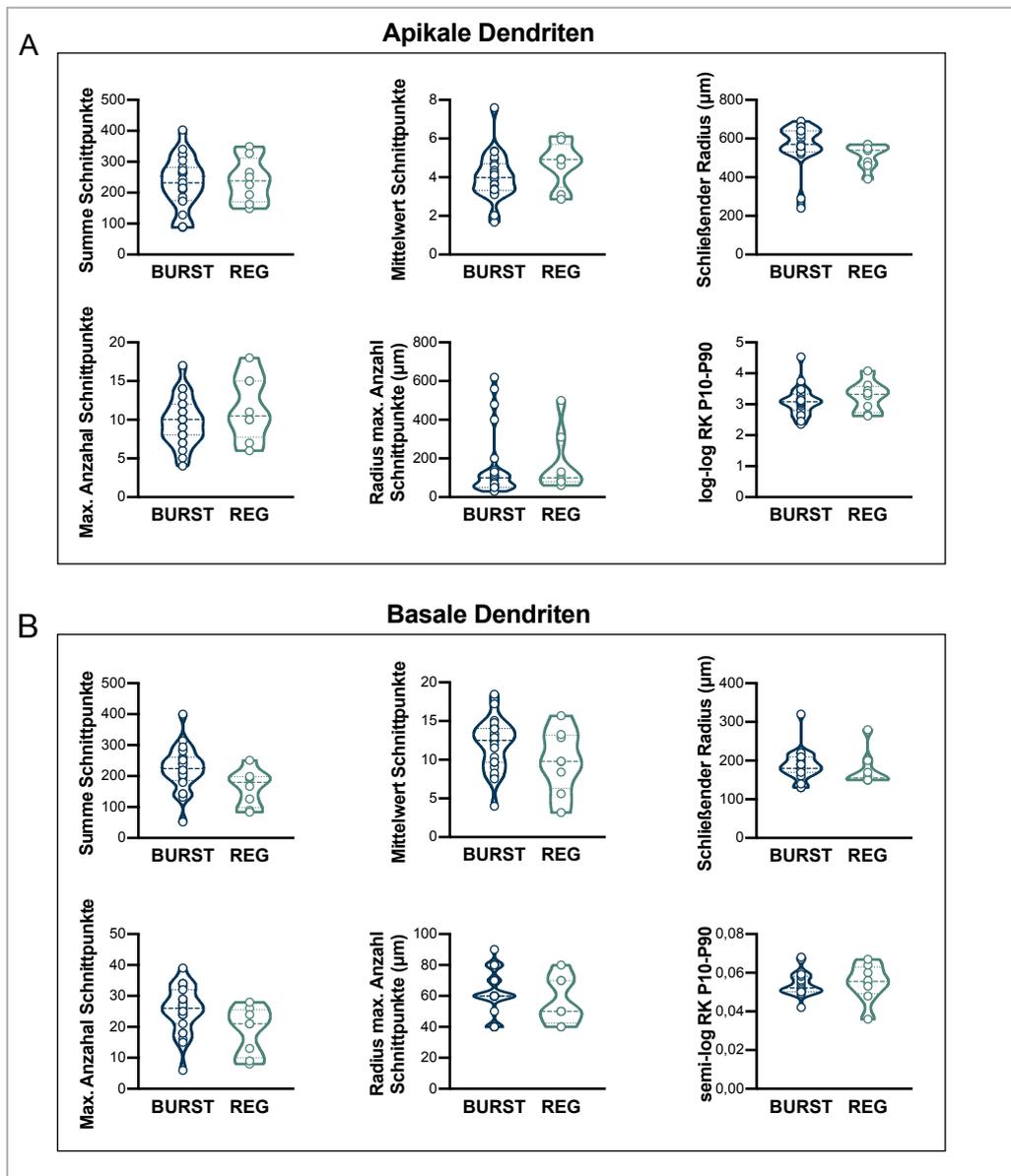


Abbildung 32 Sholl-Parameter apikaler und basaler Dendriten bei BURST und REG. Violinen-Diagramme zeigen die Ergebnisse der Analyse ausgewählter Sholl-Parameter an apikalen (**A**) und basalen Dendriten (**B**) bei burstenden und regulär feuernenden subikulären Pyramidenzellen (BURST, REG). BURST: n=23, REG: n=8. max. = maximal. RK = Regressionskoeffizient.

4.4.2 Weitere Parameter der dendritischen Morphologie

Weiterhin wurden aus den skelettierten Dendritenrekonstruktionen drei weitere charakteristische Parameter ermittelt, wobei auch hier eine separate Betrachtung der apikalen und basalen dendritischen Architektur erfolgte: Die Anzahl an Dendritenästen, die mittlere Kontraktion als durchschnittliches Verhältnis zwischen dem euklidischen Abstand eines Dendritenastes und seiner Weglänge sowie die Gesamtlänge der Dendritenäste. Bei den apikalen Dendriten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Parametern zwischen BURST und REG. Bei der Auswertung basaler Dendriten fiel auf, dass BURST im Mittel mehr Dendritenäste aufwies (BURST: $61,65 \pm 4,14$ $n=23$, REG: $41,13 \pm 6,10$ $n=8$; $p=0,1245$, t-Test für unabhängige Stichproben und *post-hoc* Holm-Šidák-Test), wobei sich dieser Unterschied in der statistischen Testung nach Adjustierung des alpha-Niveaus nicht signifikant zeigte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 dargestellt.

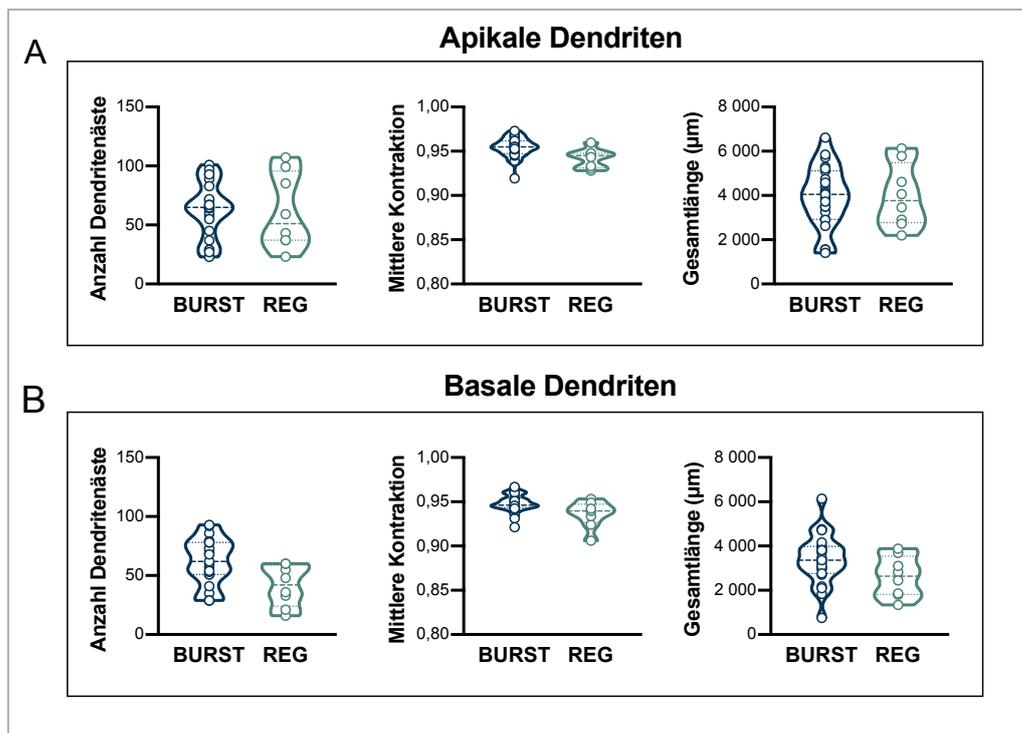


Abbildung 33 Weitere Parameter der dendritischen Morphologie bei BURST und REG. Violinen-Diagramme zeigen die Ergebnisse der Untersuchung der Anzahl an Dendritenästen, der mittleren Kontraktion sowie der Gesamtlänge apikaler (A) und basaler Dendriten (B) bei burstenden und regulär feuерnden subikulären Pyramidenzellen (BURST, REG). BURST: $n=23$, REG: $n=8$.

Die Mittelwerte, Mediane, Standardabweichungen, Standardfehler des arithmetischen Mittels der Parameter der dendritischen Morphologie sowie Informationen zur jeweiligen statistischen Signifikanztestung sind der Tabelle am Ende dieses Kapitels zu entnehmen (Tabelle 10).

Tabelle 10 Parameter apikaler und basaler Dendriten.

Untersuchte Parameter	Burstende Zellen n=23				Regulär feuernde Zellen n=8				Signifikanz Korrektur
	M	SD	SEM	Median	M	SD	SEM	Median	
Apikale Dendriten									
Summe Schnittpunkte	232,91	81,02	16,89	232,00	240,50	72,45	25,62	238,00	p=0,8167 ⁽¹⁾ p=0,9989 ⁽³⁾
Mittelwert Schnittpunkte	4,07	1,17	0,4	3,98	4,68	1,18	0,42	4,92	p=0,2095 ⁽¹⁾ p=0,8071 ⁽³⁾
Schließender Radius (µm)	567,83	109,13	22,76	570,00	512,50	63,64	22,50	540,00	p=0,0547 ⁽²⁾ p=0,3622 ⁽³⁾
Max. Anzahl Schnittpunkte	9,78	2,95	0,62	10,00	11,50	4,18	1,48	10,50	p=0,3084 ⁽¹⁾ p=0,8906 ⁽³⁾
Radius max. Anzahl Schnittpunkte (µm)	160,87	174,25	36,33	100,00	170,00	155,10	54,84	100,00	p=0,8967 ⁽²⁾ p=0,9989 ⁽³⁾
log-log RK P10-P90	3,10	0,46	0,10	3,08	3,25	0,49	0,17	3,32	p=0,4389 ⁽¹⁾ p=0,9444 ⁽³⁾
Anzahl Dendritenäste	63,22	23,32	4,86	65,00	61,25	31,76	11,23	51,00	p=0,8528 ⁽¹⁾ p=0,9989 ⁽³⁾
Mittlere Kontraktion	0,954	0,012	0,002	0,955	0,942	0,011	0,004	0,945	p=0,0172* ⁽¹⁾ p=0,1441 ⁽³⁾
Gesamtlänge Dendritenäste (µm)	3943	1393	290	4045	3986	1435	507	3764	p=0,9409 ⁽¹⁾ p=0,9989 ⁽³⁾
Basale Dendriten									
Summe Schnittpunkte	226,70	66,14	13,79	224,00	163,00	58,63	20,73	180,00	p=0,0226* ⁽¹⁾ p=0,1476 ⁽³⁾
Mittelwert Schnittpunkte	12,04	3,16	0,66	12,50	9,82	4,13	1,46	9,79	p=0,1245 ⁽¹⁾ p=0,3550 ⁽³⁾
Schließender Radius (µm)	190,00	37,05	7,73	180,00	176,25	45,34	16,03	155,00	p=0,0914 ⁽²⁾ p=0,3550 ⁽³⁾
Max. Anzahl Schnittpunkte	25,74	7,11	1,48	26,00	18,75	7,74	2,74	21,00	p=0,0262* ⁽¹⁾ p=0,1476 ⁽³⁾
Radius max. Anzahl Schnittpunkte (µm)	62,61	14,21	2,96	60,00	56,25	15,06	5,32	50,00	p=0,2916 ⁽¹⁾ p=0,4981 ⁽³⁾
semi-log RK P10-P90	0,054	0,006	0,001	0,051	0,055	0,010	0,004	0,056	p=0,6532 ⁽¹⁾ p=0,6532 ⁽³⁾
Anzahl Dendritenäste	61,65	19,87	4,14	62,00	41,13	17,24	6,10	42,00	p=0,0147* ⁽¹⁾ p=0,1245 ⁽³⁾
Mittlere Kontraktion	0,948	0,010	0,002	0,946	0,936	0,015	0,005	0,940	p=0,0157* ⁽¹⁾ p=0,1245 ⁽³⁾
Gesamtlänge Dendritenäste (µm)	3419	1139	238	3356	2618	920	325	2643	p=0,0840 ⁽¹⁾ p=0,3550 ⁽³⁾
n = Anzahl untersuchter Zellen p = Signifikanzwert M = Mittelwert RK = Regressionskoeffizient SD = Standardabweichung SEM = Standardfehler des arithmetischen Mittels					(1) = t-Test für unabhängige Stichproben (2) = Mann-Whitney-Test (3) = <i>post-hoc</i> Holm-Šidák-Test				

4.5 Korrelationsanalyse, Clusteranalysen und Hauptkomponentenanalysen

4.5.1 Korrelationsanalyse

Eine Korrelationsanalyse (Rangkorrelation nach Spearman, $n=31$) wurde durchgeführt, um die Größe und Richtung der statistischen Beziehung zwischen 42 Variablen (17 Parameter der Membraneigenschaften, 7 Parameter der Spontanaktivität, 18 Parameter der Morphologie) unabhängig vom klassifizierten Zelltyp (BURST, REG) zu erfassen. Zur Detektion relevanter versuchstieraltersbedingter Varianzen wurde ferner das Versuchstieralter, welches im Mittel $26 \pm 0,42$ Tage entsprach (BURST: $25,78 \pm 0,50$ Tage; REG: $26,63 \pm 0,80$ Tage), in die Korrelationsanalyse mit aufgenommen. Interessant ist die Korrelationsanalyse hier insbesondere deshalb, weil Zusammenhänge zwischen morphologischen Parametern und den erhobenen elektrophysiologischen Parametern zur den Membraneigenschaften und der Spontanaktivität detektiert werden können. Im Folgenden Text wird daher lediglich auf jene Parameter eingegangen, welche miteinander stark korreliert waren, was ab einem $|r|$ von 0,50 angenommen wurde. Ferner werden im folgenden Text keine naheliegenden Korrelationen zwischen Parametern innerhalb der gleichen Parametergruppe beschrieben, sondern lediglich starke Korrelationen zwischen Parametern aus den drei verschiedenen Parametergruppen (1. Aktive und passive Membraneigenschaften, 2. Spontanaktivität, 3. Dendritische Morphologie). Zwischen dem Versuchstieralter und den anderen untersuchten Parameter konnte keine starke Korrelation detektiert werden, weshalb nicht von dem Vorhandensein relevanter versuchstieraltersbedingter Varianzen ausgegangen wurde. Spannend ist, dass sich zwischen den Parametern der Spontanaktivität und den untersuchten Parametern aus den beiden anderen Parametergruppen bis auf eine starke negative Korrelation zwischen der mittleren Anstiegszeit der sEPSC und dem initialen IAPI ($r_s=-0,52$, $p=0,0029^{**}$) keine starken Korrelationen finden ließen. Eine starke positive Korrelation zeigte sich zwischen dem Sag-Potential und dem schließenden Radius der Sholl-Analyse apikaler Dendriten ($r_s=0,57$, $p<0,001^{***}$). Als stark negativ miteinander korreliert präsentierten sich zum einen die FWHMA ($r_s=-0,54$, $p=0,0016^{**}$) und zum anderen das RMP ($r_s=-0,52$, $p=0,0025^{**}$) mit dem Radius, bei welchem die maximale Anzahl an Schnittpunkte in der Sholl-Analyse basaler Dendriten gemessen wurde. Weiterhin fand sich eine starke negative Korrelation zwischen dem Gain und dem Mittelwert der in der Sholl-Analyse basaler Dendriten ermittelten Schnittpunkte ($r_s=-0,57$, $p<0,001^{***}$). Auffällig waren ferner zahlreiche starke negative Korrelationen zwischen dem Eingangswiderstand als einem Parameter der passiven Membraneigenschaft und Parametern der dendritischen Morphologie. So fanden sich starke negative Korrelationen zwischen dem Eingangswiderstand und der im Rahmen von Sholl-Analysen erfassten apikalen sowie basalen Schnittpunktsumme (apikal: $r_s=-0,55$, $p=0,0014^{**}$; basal: $r_s=-0,74$, $p<0,001^{***}$). Erwartungsgemäß ging dieser Befund zum einen mit einem ebenfalls starken negativen Zusammenhang zwischen

dem Eingangswiderstand und der Anzahl an apikalen und basalen Dendritenästen (apikal: $r_s = -0,59$, $p < 0,001^{***}$; basal: $r_s = -0,74$, $p < 0,001^{***}$) und zum anderen mit einem starken negativen Zusammenhang zwischen dem Eingangswiderstand und der apikalen und basalen Gesamtlänge der Dendriten einher (apikal: $r_s = -0,60$, $p < 0,001^{***}$; basal: $r_s = -0,69$, $p < 0,001^{***}$). Ferner korrelierte der Eingangswiderstand stark negativ mit dem Mittelwert und der maximalen Anzahl an Schnittpunkten in der Sholl-Analyse basaler Dendriten (Mittelwert Schnittpunkte: $r_s = -0,63$, $p < 0,001^{***}$; maximale Anzahl an Schnittpunkten: $r_s = -0,73$, $p < 0,001^{***}$). Abbildung 34 enthält die Korrelationsmatrix, welcher alle positiven und negativen Korrelationen zwischen verschiedenen Parametergruppen farbkodiert entnommen werden können. Die zugehörigen Korrelationstabellen finden sich am Ende dieses Kapitels (Tabelle 11-13).

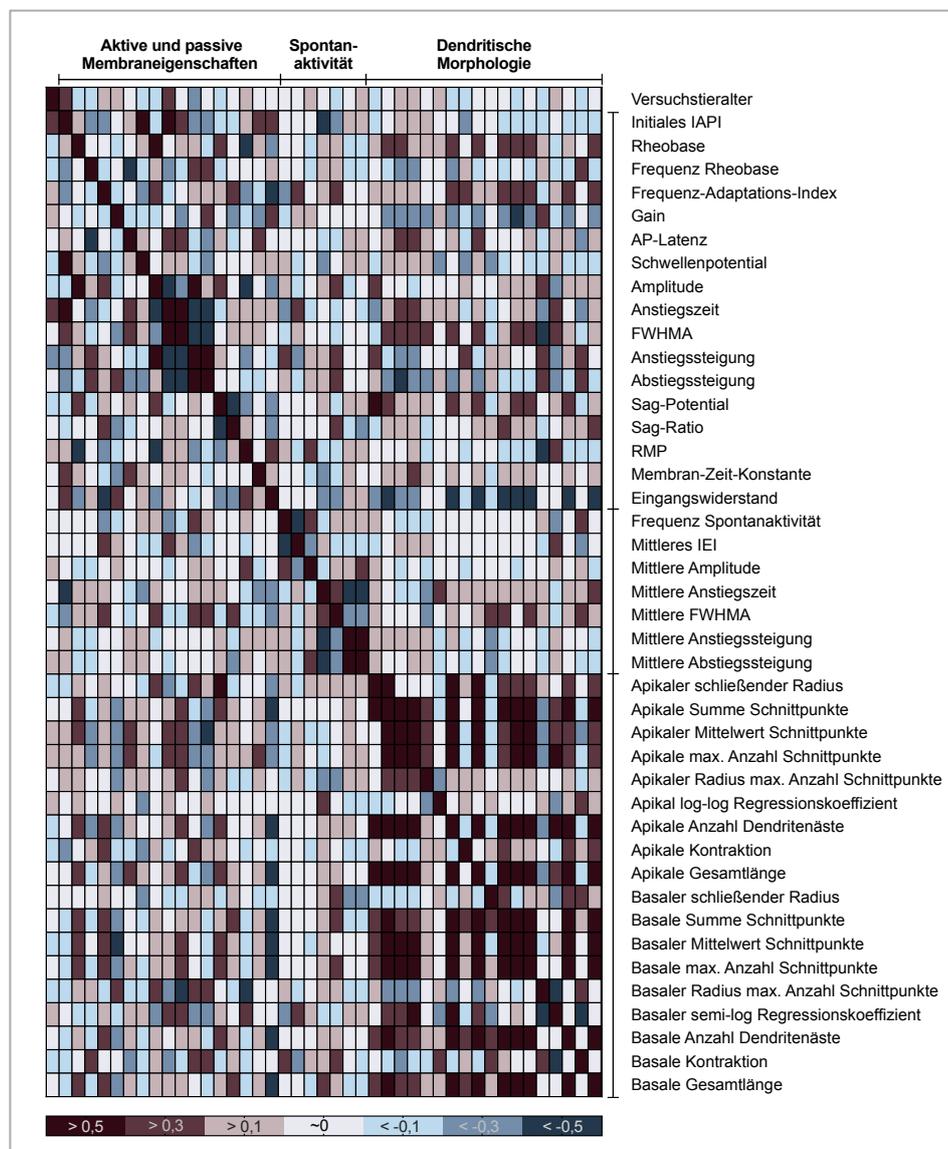


Abbildung 34 Korrelationsanalyse nach Spearman. Farbkodierung am Wert des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman orientiert. Farbgruppen wurden in Anlehnung, an die von Jacob Cohen entwickelte Richtlinie erstellt: $|r| = 0,10$ = schwache Korrelation, $|r| = 0,30$ = moderate Korrelation, $|r| = 0,50$ = starke Korrelation.

PARAMETER DER MEMBRANEIGENSCHAFTEN																	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
A	1.00	0.19	-0.30	-0.47	0.08	0.27	0.51	-0.27	0.50	0.34	-0.45	-0.42	-0.14	-0.18	0.24	0.35	0.47
B	0.19	1.00	-0.08	0.03	-0.15	0.01	0.27	0.52	-0.03	0.24	0.12	-0.25	0.33	-0.03	-0.52	0.17	-0.41
C	-0.30	-0.08	1.00	-0.11	-0.09	-0.62	-0.15	0.14	-0.38	-0.29	0.37	0.40	-0.16	-0.02	-0.05	-0.05	0.20
D	-0.47	0.03	-0.11	1.00	-0.13	0.02	-0.45	0.30	-0.18	0.03	0.28	0.16	0.18	0.31	-0.30	-0.15	-0.67
E	0.08	-0.15	-0.09	-0.13	1.00	-0.11	-0.22	-0.16	0.00	-0.35	-0.07	0.32	-0.07	-0.31	-0.10	-0.39	0.33
F	0.27	0.01	-0.62	0.02	-0.11	1.00	0.27	-0.05	0.35	0.40	-0.24	-0.39	0.19	-0.11	0.07	0.45	0.04
G	0.51	0.27	-0.15	-0.45	-0.22	0.27	1.00	0.03	0.13	0.21	-0.25	-0.45	-0.06	-0.08	0.02	0.27	0.27
H	-0.27	0.52	0.14	0.30	-0.16	-0.05	0.03	1.00	-0.65	-0.32	0.78	0.29	0.36	-0.06	-0.66	0.02	-0.48
I	0.50	-0.03	-0.38	-0.18	0.00	0.35	0.13	-0.65	1.00	0.72	-0.87	-0.68	-0.21	0.12	0.29	0.22	0.26
J	0.34	0.24	-0.29	0.03	-0.35	0.40	0.21	-0.32	0.72	1.00	-0.56	-0.88	0.08	0.13	0.24	0.22	-0.01
K	-0.45	0.12	0.37	0.28	-0.07	-0.24	-0.25	0.78	-0.87	-0.56	1.00	0.60	0.23	-0.08	-0.34	-0.03	-0.29
L	-0.42	-0.25	0.40	0.16	0.32	-0.39	-0.45	0.29	-0.68	-0.88	0.60	1.00	-0.09	-0.03	-0.18	-0.25	-0.07
M	-0.14	0.33	-0.16	0.18	-0.07	0.19	-0.06	0.36	-0.21	0.08	0.23	-0.09	1.00	-0.66	-0.32	-0.02	-0.39
N	-0.18	-0.03	-0.02	0.31	-0.31	-0.11	-0.08	-0.06	0.12	0.13	-0.08	-0.03	-0.66	1.00	0.18	0.06	-0.35
O	0.24	-0.52	-0.05	-0.30	-0.10	0.07	0.02	-0.66	0.29	0.24	-0.34	-0.18	-0.32	0.18	1.00	0.01	0.34
P	0.35	0.17	-0.05	-0.15	-0.39	0.45	0.27	0.02	0.22	0.22	-0.03	-0.25	-0.02	0.06	0.01	1.00	0.12
Q	0.47	-0.41	0.20	-0.67	0.33	0.04	0.27	-0.48	0.26	-0.01	-0.29	-0.07	-0.39	-0.35	0.34	0.12	1.00
R	0.06	0.09	0.02	-0.35	-0.13	-0.09	0.25	0.28	-0.43	-0.29	0.37	0.24	0.00	0.03	0.13	0.02	-0.05
S	-0.05	-0.09	-0.03	0.35	0.13	0.09	-0.25	-0.28	0.43	0.29	-0.37	-0.24	0.00	-0.02	-0.13	-0.02	0.05
T	-0.08	-0.12	-0.15	0.09	0.17	0.07	-0.02	0.03	-0.18	-0.08	0.10	0.15	0.04	0.03	0.30	-0.15	-0.06
U	-0.52	0.18	0.14	0.15	0.06	-0.17	-0.41	0.28	-0.08	-0.02	0.15	0.17	0.20	0.08	-0.20	-0.34	-0.41
V	-0.33	0.24	0.12	0.32	-0.04	-0.15	-0.05	0.45	-0.26	-0.18	0.31	0.31	-0.11	0.45	-0.21	-0.13	-0.46
W	0.19	-0.24	-0.18	0.01	-0.06	0.21	0.21	-0.18	-0.09	-0.03	-0.01	-0.09	0.19	-0.24	0.18	0.23	0.14
X	0.23	-0.12	-0.16	0.06	-0.01	0.12	0.18	-0.08	-0.14	-0.01	0.06	-0.06	0.28	-0.36	0.11	0.09	0.13
Y	-0.29	0.23	0.01	0.13	-0.09	-0.03	-0.10	0.34	-0.42	-0.16	0.44	0.14	0.57	-0.21	-0.07	0.02	-0.44
Z	0.06	0.38	-0.29	0.23	-0.47	0.25	0.17	0.04	0.22	0.37	-0.14	-0.38	0.37	0.12	0.03	0.20	-0.55
AA	0.22	0.30	-0.46	0.21	-0.41	0.39	0.22	-0.07	0.47	0.45	-0.39	-0.50	0.20	0.20	-0.03	0.28	-0.44
AB	0.20	0.22	-0.41	0.21	-0.37	0.36	0.15	-0.17	0.49	0.46	-0.39	-0.49	0.16	0.19	0.10	0.33	-0.39
AC	0.21	0.11	-0.01	0.01	-0.34	0.20	0.28	0.05	0.11	0.32	-0.05	-0.44	0.19	-0.15	-0.18	0.21	-0.04
AD	0.06	0.18	-0.02	0.04	0.17	0.03	-0.37	0.03	0.16	0.04	0.03	0.16	0.02	-0.02	-0.04	0.06	-0.09
AE	-0.05	0.37	-0.30	0.32	-0.41	0.28	0.07	0.08	0.17	0.36	-0.07	-0.32	0.49	0.06	0.07	0.18	-0.59
AF	-0.43	-0.04	0.23	0.31	-0.18	-0.13	-0.37	0.18	-0.28	-0.01	0.38	0.13	0.12	0.09	-0.15	0.07	-0.27
AG	0.00	0.39	-0.29	0.29	-0.47	0.30	0.14	0.09	0.19	0.37	-0.11	-0.35	0.42	0.11	-0.01	0.20	-0.60
AH	-0.07	-0.05	0.04	0.15	0.09	-0.06	-0.33	0.04	-0.11	-0.10	0.10	0.25	-0.24	0.27	0.07	-0.21	-0.18
AI	-0.28	0.32	-0.13	0.46	-0.47	0.08	-0.23	0.21	0.07	0.26	0.10	-0.14	0.21	0.37	-0.20	0.11	-0.74
AJ	-0.20	0.36	-0.08	0.34	-0.57	0.04	-0.04	0.14	0.11	0.33	0.05	-0.25	0.34	0.22	-0.13	0.17	-0.63
AK	-0.24	0.35	-0.15	0.45	-0.48	0.18	-0.20	0.18	0.11	0.30	0.04	-0.19	0.34	0.26	-0.14	0.19	-0.73
AL	-0.12	0.22	0.17	-0.20	0.32	-0.22	-0.23	0.42	-0.36	-0.54	0.46	0.46	0.08	-0.27	-0.52	0.00	0.03
AM	0.08	-0.22	-0.24	0.11	-0.18	0.29	0.13	-0.39	0.43	0.43	-0.45	-0.45	0.19	-0.06	0.48	0.01	0.02
AN	-0.29	0.24	-0.19	0.47	-0.41	0.23	-0.29	0.19	0.03	0.25	0.13	-0.14	0.36	0.17	-0.10	0.14	-0.68
AO	-0.22	-0.01	0.45	0.03	0.03	-0.36	-0.19	0.29	-0.32	-0.24	0.42	0.34	-0.25	0.22	-0.14	-0.06	-0.07
AP	-0.27	0.34	-0.14	0.41	-0.44	0.12	-0.25	0.15	0.15	0.28	0.04	-0.15	0.19	0.36	-0.21	0.19	-0.69

Tabelle 11 Korrelationstabelle mit Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman I. Hervorgehoben sind starke positive und negative Korrelationen nach Spearman (starke Korrelation angenommen ab $|r| = 0,50$). **Aktive und passive Membraneigenschaften:** **A** Initiales IAPI **B** Rheobase **C** Frequenz Rheobase **D** Frequenz-Adaptations-Index **E** Gain **F** AP-Latenz **G** Schwellenpotential **H** Amplitude **I** Anstiegszeit **J** FWHMA **K** Anstiegssteigung **L** Abstiegssteigung **M** Sag-Potential **N** Sag-Ratio **O** RMP **P** Membran-Zeit-Konstante **Q** Eingangswiderstand. **Spontanaktivität:** **R** Frequenz Spontanaktivität **S** Mittleres IEI **T** Mittlere Amplitude **U** Mittlere Anstiegszeit **V** Mittlere FWHMA **W** Mittlere Anstiegssteigung **X** Mittlere Abstiegssteigung. **Dendritische Morphologie:** **Y** Apikaler schließender Radius **Z** Apikale Summe Schnittpunkte **AA** Apikaler Mittelwert Schnittpunkte **AB** Apikale max. Anzahl Schnittpunkte **AC** Apikaler Radius max. Anzahl Schnittpunkte **AD** Apikal log-log Regressionskoeffizient **AE** Apikale Anzahl Dendritenäste **AF** Apikale Kontraktion **AG** Apikale Gesamtlänge **AH** Basaler schließender Radius **AI** Basale Summe Schnittpunkte **AJ** Basaler Mittelwert Schnittpunkte **AK** Basale max. Anzahl Schnittpunkte **AL** Basaler Radius max. Anzahl Schnittpunkte **AM** Basaler semi-log Regressionskoeffizient **AN** Basale Anzahl Dendritenäste **AO** Basale Kontraktion **AP** Basale Gesamtlänge.

PARAMETER DER SPONTANAKTIVITÄT							
	R	S	T	U	V	W	X
A	0.06	-0.05	-0.08	-0.52	-0.33	0.19	0.23
B	0.09	-0.09	-0.12	0.18	0.24	-0.24	-0.12
C	0.02	-0.03	-0.15	0.14	0.12	-0.18	-0.16
D	-0.35	0.35	0.09	0.15	0.32	0.01	0.06
E	-0.13	0.13	0.17	0.06	-0.04	-0.06	-0.01
F	-0.09	0.09	0.07	-0.17	-0.15	0.21	0.12
G	0.25	-0.25	-0.02	-0.41	-0.05	0.21	0.18
H	0.28	-0.28	0.03	0.28	0.45	-0.18	-0.08
I	-0.43	0.43	-0.18	-0.08	-0.26	-0.09	-0.14
J	-0.29	0.29	-0.08	-0.02	-0.18	-0.03	-0.01
K	0.37	-0.37	0.10	0.15	0.31	-0.01	0.06
L	0.24	-0.24	0.15	0.17	0.31	-0.09	-0.06
M	0.00	0.00	0.04	0.20	-0.11	0.19	0.28
N	0.03	-0.02	0.03	0.08	0.45	-0.24	-0.36
O	0.13	-0.13	0.30	-0.20	-0.21	0.18	0.11
P	0.02	-0.02	-0.15	-0.34	-0.13	0.23	0.09
Q	-0.05	0.05	-0.06	-0.41	-0.46	0.14	0.13
R	1.00	-1.00	0.47	-0.13	0.12	0.25	0.29
S	-1.00	1.00	-0.47	0.13	-0.12	-0.25	-0.29
T	0.47	-0.47	1.00	-0.12	0.26	0.29	0.44
U	-0.13	0.13	-0.12	1.00	0.46	-0.74	-0.68
V	0.12	-0.12	0.26	0.46	1.00	-0.43	-0.44
W	0.25	-0.25	0.29	-0.74	-0.43	1.00	0.86
X	0.29	-0.29	0.44	-0.68	-0.44	0.86	1.00
Y	0.26	-0.26	0.18	0.28	0.15	0.13	0.15
Z	-0.06	0.06	-0.08	0.04	0.06	0.11	0.07
AA	-0.16	0.17	-0.15	-0.11	-0.05	0.10	0.05
AB	-0.10	0.11	0.03	-0.18	-0.04	0.25	0.19
AC	-0.14	0.14	-0.29	-0.31	-0.30	0.24	0.24
AD	0.06	-0.06	-0.05	0.36	0.00	-0.29	-0.23
AE	-0.05	0.05	0.08	0.10	0.14	0.13	0.09
AF	-0.08	0.08	-0.27	0.25	-0.05	-0.26	-0.20
AG	-0.06	0.06	-0.06	0.10	0.11	0.09	0.04
AH	0.09	-0.08	0.09	0.18	0.38	-0.31	-0.31
AI	0.08	-0.08	-0.08	0.29	0.36	-0.12	-0.18
AJ	0.08	-0.08	-0.20	0.19	0.07	0.05	-0.01
AK	0.09	-0.09	0.06	0.23	0.30	-0.02	-0.07
AL	0.29	-0.29	-0.04	0.15	0.12	-0.10	-0.13
AM	-0.36	0.36	0.14	-0.15	-0.25	0.22	0.23
AN	0.09	-0.09	0.02	0.25	0.19	-0.02	-0.05
AO	0.31	-0.31	0.10	0.18	0.40	-0.09	-0.19
AP	0.01	-0.01	-0.22	0.36	0.27	-0.18	-0.26

Tabelle 12 Korrelationstabelle mit Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman II. Hervorgehoben sind starke positive und negative Korrelationen (starke Korrelation angenommen ab $|r| = 0,50$). **Aktive und passive Membraneigenschaften:** **A** Initiales IAPI **B** Rheobase **C** Frequenz Rheobase **D** Frequenz-Adaptations-Index **E** Gain **F** AP-Latenz **G** Schwellenpotential **H** Amplitude **I** Anstiegszeit **J** FWHMA **K** Anstiegssteigung **L** Abstiegssteigung **M** Sag-Potential **N** Sag-Ratio **O** RMP **P** Membran-Zeit-Konstante **Q** Eingangswiderstand. **Spontanaktivität:** **R** Frequenz Spontanaktivität **S** Mittleres IEI **T** Mittlere Amplitude **U** Mittlere Anstiegszeit **V** Mittlere FWHMA **W** Mittlere Anstiegssteigung **X** Mittlere Abstiegssteigung. **Dendritische Morphologie:** **Y** Apikaler schließender Radius **Z** Apikale Summe Schnittpunkte **AA** Apikaler Mittelwert Schnittpunkte **AB** Apikale max. Anzahl Schnittpunkte **AC** Apikaler Radius max. Anzahl Schnittpunkte **AD** Apikal log-log Regressionskoeffizient **AE** Apikale Anzahl Dendritenäste **AF** Apikale Kontraktion **AG** Apikale Gesamtlänge **AH** Basaler schließender Radius **AI** Basale Summe Schnittpunkte **AJ** Basaler Mittelwert Schnittpunkte **AK** Basale max. Anzahl Schnittpunkte **AL** Basaler Radius max. Anzahl Schnittpunkte **AM** Basaler semi-log Regressionskoeffizient **AN** Basale Anzahl Dendritenäste **AO** Basale Kontraktion **AP** Basale Gesamtlänge.

PARAMETER DER MORPHOLOGIE																		
	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM	AN	AO	AP
A	-0.29	0.06	0.22	0.20	0.21	0.06	-0.05	-0.43	0.00	-0.07	-0.28	-0.20	-0.24	-0.12	0.08	-0.29	-0.22	-0.27
B	0.23	0.38	0.30	0.22	0.11	0.18	0.37	-0.04	0.39	-0.05	0.32	0.36	0.35	0.22	-0.22	0.24	-0.01	0.34
C	0.01	-0.29	-0.46	-0.41	-0.01	-0.02	-0.30	0.23	-0.29	0.04	-0.13	-0.08	-0.15	0.17	-0.24	-0.19	0.45	-0.14
D	0.13	0.23	0.21	0.21	0.01	0.04	0.32	0.31	0.29	0.15	0.46	0.34	0.45	-0.20	0.11	0.47	0.03	0.41
E	-0.09	-0.47	-0.41	-0.37	-0.34	0.17	-0.41	-0.18	-0.47	0.09	-0.47	-0.57	-0.48	0.32	-0.18	-0.41	0.03	-0.44
F	-0.03	0.25	0.39	0.36	0.20	0.03	0.28	-0.13	0.30	-0.06	0.08	0.04	0.18	-0.22	0.29	0.23	-0.36	0.12
G	-0.10	0.17	0.22	0.15	0.28	-0.37	0.07	-0.37	0.14	-0.33	-0.23	-0.04	-0.20	-0.23	0.13	-0.29	-0.19	-0.25
H	0.34	0.04	-0.07	-0.17	0.05	0.03	0.08	0.18	0.09	0.04	0.21	0.14	0.18	0.42	-0.39	0.19	0.29	0.15
I	-0.42	0.22	0.47	0.49	0.11	0.16	0.17	-0.28	0.19	-0.11	0.07	0.11	0.11	-0.36	0.43	0.03	-0.32	0.15
J	-0.16	0.37	0.45	0.46	0.32	0.04	0.36	-0.01	0.37	-0.10	0.26	0.33	0.30	-0.54	0.43	0.25	-0.24	0.28
K	0.44	-0.14	-0.39	-0.39	-0.05	0.03	-0.07	0.38	-0.11	0.10	0.10	0.05	0.04	0.46	-0.45	0.13	0.42	0.04
L	0.14	-0.38	-0.50	-0.49	-0.44	0.16	-0.32	0.13	-0.35	0.25	-0.14	-0.25	-0.19	0.46	-0.45	-0.14	0.34	-0.15
M	0.57	0.37	0.20	0.16	0.19	0.02	0.49	0.12	0.42	-0.24	0.21	0.34	0.34	0.08	0.19	0.36	-0.25	0.19
N	-0.21	0.12	0.20	0.19	-0.15	-0.02	0.06	0.09	0.11	0.27	0.37	0.22	0.26	-0.27	-0.06	0.17	0.22	0.36
O	-0.07	0.03	-0.03	0.10	-0.18	-0.04	0.07	-0.15	-0.01	0.07	-0.20	-0.13	-0.14	-0.52	0.48	-0.10	-0.14	-0.21
P	0.02	0.20	0.28	0.33	0.21	0.06	0.18	0.07	0.20	-0.21	0.11	0.17	0.19	0.00	0.01	0.14	-0.06	0.19
Q	-0.44	-0.55	-0.44	-0.39	-0.04	-0.09	-0.59	-0.27	-0.60	-0.18	-0.74	-0.63	-0.73	0.03	0.02	-0.68	-0.07	-0.69
R	0.26	-0.06	-0.16	-0.10	-0.14	0.06	-0.05	-0.08	-0.06	0.09	0.08	0.08	0.09	0.29	-0.36	0.09	0.31	0.01
S	-0.26	0.06	0.17	0.11	0.14	-0.06	0.05	0.08	0.06	-0.08	-0.08	-0.08	-0.09	-0.29	0.36	-0.09	-0.31	-0.01
T	0.18	-0.08	-0.15	0.03	-0.29	-0.05	0.08	-0.27	-0.06	0.09	-0.08	-0.20	0.06	-0.04	0.14	0.02	0.10	-0.22
U	0.28	0.04	-0.11	-0.18	-0.31	0.36	0.10	0.25	0.10	0.18	0.29	0.19	0.23	0.15	-0.15	0.25	0.18	0.36
V	0.15	0.06	-0.05	-0.04	-0.30	0.00	0.14	-0.05	0.11	0.38	0.36	0.07	0.30	0.12	-0.25	0.19	0.40	0.27
W	0.13	0.11	0.10	0.25	0.24	-0.29	0.13	-0.26	0.09	-0.31	-0.12	0.05	-0.02	-0.10	0.22	-0.02	-0.09	-0.18
X	0.15	0.07	0.05	0.19	0.24	-0.23	0.09	-0.20	0.04	-0.31	-0.18	-0.01	-0.07	-0.13	0.23	-0.05	-0.19	-0.26
Y	1.00	0.50	0.05	0.05	0.01	-0.17	0.55	0.20	0.52	-0.21	0.38	0.49	0.39	0.12	0.03	0.40	-0.04	0.33
Z	0.50	1.00	0.85	0.78	0.34	-0.12	0.93	-0.07	0.99	-0.28	0.59	0.78	0.63	-0.35	0.46	0.52	-0.25	0.56
AA	0.05	0.85	1.00	0.90	0.41	-0.03	0.75	-0.20	0.83	-0.26	0.47	0.62	0.54	-0.36	0.47	0.41	-0.33	0.48
AB	0.05	0.78	0.90	1.00	0.33	0.06	0.73	-0.21	0.78	-0.19	0.48	0.57	0.57	-0.37	0.50	0.46	-0.13	0.48
AC	0.01	0.34	0.41	0.33	1.00	-0.38	0.13	0.11	0.27	-0.04	0.25	0.25	0.24	-0.01	0.07	0.22	-0.13	0.22
AD	-0.17	-0.12	-0.03	0.06	-0.38	1.00	-0.01	0.13	-0.07	0.21	0.07	0.03	0.08	0.21	-0.33	0.18	0.34	0.20
AE	0.55	0.93	0.75	0.73	0.13	-0.01	1.00	-0.10	0.95	-0.29	0.55	0.74	0.65	-0.34	0.51	0.53	-0.26	0.50
AF	0.20	-0.07	-0.20	-0.21	0.11	0.13	-0.10	1.00	-0.07	0.25	0.33	0.21	0.22	0.05	-0.26	0.43	0.20	0.36
AG	0.52	0.99	0.83	0.78	0.27	-0.07	0.95	-0.07	1.00	-0.26	0.61	0.78	0.66	-0.36	0.46	0.55	-0.22	0.58
AH	-0.21	-0.28	-0.26	-0.19	-0.04	0.21	-0.29	0.25	-0.26	1.00	0.31	-0.23	0.25	0.24	-0.39	0.36	0.33	0.24
AI	0.38	0.59	0.47	0.48	0.25	0.07	0.55	0.33	0.61	0.31	1.00	0.81	0.95	0.08	-0.07	0.91	0.13	0.96
AJ	0.49	0.78	0.62	0.57	0.25	0.03	0.74	0.21	0.78	-0.23	0.81	1.00	0.78	-0.13	0.15	0.69	-0.05	0.83
AK	0.39	0.63	0.54	0.57	0.24	0.08	0.65	0.22	0.66	0.25	0.95	0.78	1.00	0.03	0.08	0.93	0.01	0.90
AL	0.12	-0.35	-0.36	-0.37	-0.01	0.21	-0.34	0.05	-0.36	0.24	0.08	-0.13	0.03	1.00	-0.72	0.06	0.36	0.08
AM	0.03	0.46	0.47	0.50	0.07	-0.33	0.51	-0.26	0.46	-0.39	-0.07	0.15	0.08	-0.72	1.00	0.03	-0.57	-0.09
AN	0.40	0.52	0.41	0.46	0.22	0.18	0.53	0.43	0.55	0.36	0.91	0.69	0.93	0.06	0.03	1.00	0.04	0.87
AO	-0.04	-0.25	-0.33	-0.13	-0.13	0.34	-0.26	0.20	-0.22	0.33	0.13	-0.05	0.01	0.36	-0.57	0.04	1.00	0.08
AP	0.33	0.56	0.48	0.48	0.22	0.20	0.50	0.36	0.58	0.24	0.96	0.83	0.90	0.08	-0.09	0.87	0.08	1.00

Tabelle 13 Korrelationstabelle mit Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman III. Hervorgehoben sind starke positive und negative Korrelationen (starke Korrelation angenommen ab $|r| = 0,50$). **Aktive und passive Membraneigenschaften:** A Initiales IAPI B Rheobase C Frequenz Rheobase D Frequenz-Adaptations-Index E Gain F AP-Latenz G Schwellenpotential H Amplitude I Anstiegszeit J FWHMA K Anstiegssteigung L Abstiegssteigung M Sag-Potential N Sag-Ratio O RMP P Membran-Zeit-Konstante Q Eingangswiderstand. **Spontanaktivität:** R Frequenz Spontanaktivität S Mittleres IEI T Mittlere Amplitude U Mittlere Anstiegszeit V Mittlere FWHMA W Mittlere Anstiegssteigung X Mittlere Abstiegssteigung. **Dendritische Morphologie:** Y Apikaler schließender Radius Z Apikale Summe Schnittpunkte AA Apikaler Mittelwert Schnittpunkte AB Apikale max. Anzahl Schnittpunkte AC Apikaler Radius max. Anzahl Schnittpunkte AD Apikal log-log Regressionskoeffizient AE Apikale Anzahl Dendritenäste AF Apikale Kontraktion AG Apikale Gesamtlänge AH Basaler schließender Radius AI Basale Summe Schnittpunkte AJ Basaler Mittelwert Schnittpunkte AK Basale max. Anzahl Schnittpunkte AL Basaler Radius max. Anzahl Schnittpunkte AM Basaler semi-log Regressionskoeffizient AN Basale Anzahl Dendritenäste AO Basale Kontraktion AP Basale Gesamtlänge.

4.5.2 Clusteranalysen, Hauptkomponentenanalysen

Um die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten - jenseits der Hypothesentestung - in ihrer Gesamtheit weiter statistisch zu explorieren, kamen Methoden zum nicht-hierarchischen *Clustering* sowie zur Dimensionsreduktion zum Einsatz.

Zur Dimensionsreduktion wurden Hauptkomponentenanalysen in R (R Core Team 2020) für drei unterschiedliche Datensätze angefertigt und die ersten drei Hauptkomponenten (engl. *principal components*, PC) graphisch dargestellt. Um die Verteilung der subikulären Pyramidenzellen im Hinblick auf ihre Parameter im multidimensionalen Raum zu betrachten und Cluster zu identifizieren, wurden ferner k-Means-Cluster-Analysen in R (R Core Team 2020) an diesen Datensätzen durchgeführt. Analog zum Vorgehen von Austin Graves et al. (2012) wurden außerdem zusätzlich Cluster- und Hauptkomponentenanalyse erstellt, bei welchen nur die Parameter eingeschlossen wurden, die sich zwischen BURST und REG signifikant im Mann-Whitney-Test unterschieden.⁸⁸ Die optimale Anzahl an Clustern (k) für die k-Means-Cluster-Analysen wurde durch eine Silhouetten-Analyse ermittelt und betrug für alle Datensätze zwei ($k=2$). Auf der Grundlage einer multidimensionalen Matrix wurden Zellen so einem der beiden Cluster zugeordnet. Die Zuordnung basierte dabei auf dem euklidischen Abstand aller Parameter vom Zentrum jedes der beiden Cluster. Um zu visualisieren, ob die identifizierten Muster in Zusammenhang mit der elektrophysiologischen Klassifikation subikulärer Pyramidenzellen in BURST und REG stehen, wurde der Zelltyp immer als zusätzliche qualitative Variable miterfasst.

Zunächst wurden eine Hauptkomponentenanalyse und eine k-Means-Cluster-Analyse auf Grundlage eines Datensatzes von 75 subikulären Pyramidenzellen (BURST $n=54$, REG $n=21$) angefertigt, deren aktive und passive Membraneigenschaften unter Kontrollbedingungen (ACSF, Kalium-Gluconat-Lösung) gemessen worden waren (Abbildung 35). In die Analysen eingeschlossen wurden zunächst alle 15 Parameter der Membraneigenschaften. Die Hauptkomponentenanalyse ergab, dass sich 55,6% der Varianz kumulativ durch die ersten drei Hauptkomponenten erklären lassen (engl. *explained variance*). Die Clusteranalyse ergab keine klare Auftrennung in zwei Cluster und eine eindeutige Zuordnung des elektrophysiologisch ermittelten Zelltyps zu einem der beiden Cluster gelang nicht. Eine leichte Tendenz von BURST dem Cluster 2 zugeordnet zu werden und REG dem Cluster 1 zugeordnet zu werden konnte festgestellt werden und bildete die Grundlage für die Ermittlung der Trefferquote einer erfolgreichen Zuordnung, die 0,71 betrug (Zufallstrefferquote 0,56).

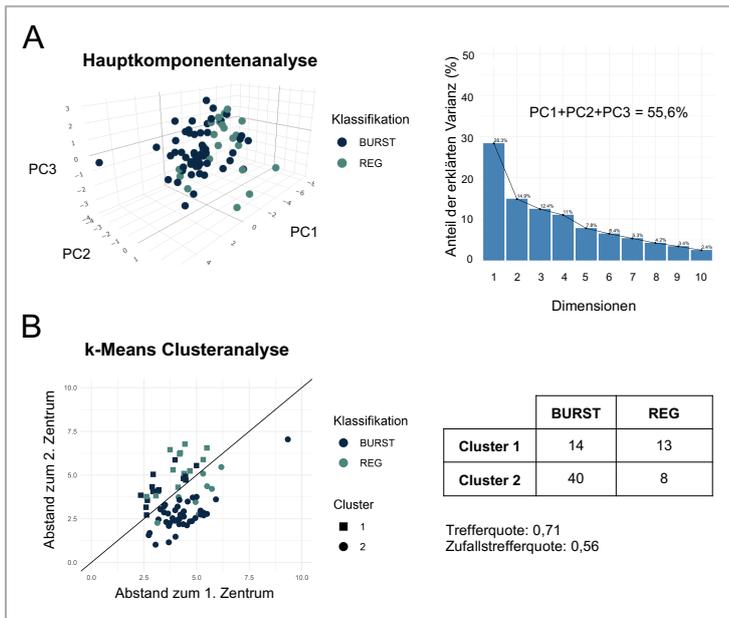


Abbildung 35

Hauptkomponenten- und Clusteranalyse I.

Ergebnisse der Hauptkomponenten und k-Means-Cluster-Analyse basierend auf 15 Parametern der aktiven und passiven Membraneigenschaften von 75 burstenden und regulär feuenden subikulären Pyramidenzellen (BURST, REG).

A Dreidimensionale Visualisierung der Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse mit Veranschaulichung des erklärten Varianzanteils (PC1=28,3%, PC2=14,9%, PC3=12,4%; insgesamt 55,6%).

B Zweidimensionale Visualisierung der k-Means-Clusteranalyse mit Vierfeldertafel zur Verdeutlichung der quantitativen Zuordnung von BURST und REG zu den beiden Clustern ($k=2$). PC = Hauptkomponente. BURST: $n=54$, REG: $n=21$.

Weitere Analysen wurden durchgeführt, in welchen, wie von Austin Graves et al. (2012)⁸⁸ vorgeschlagen, nur die 9 zwischen BURST und REG signifikant unterschiedlichen Parameter in die Analysen eingeschlossen wurden: Frequenz-Adaptations-Index, Gain, Latenz, Schwellenpotential, Anstiegszeit, FWHMA, Anstiegssteigung, Abstiegssteigung, Membran-Zeit-Konstante. Im Rahmen der Hauptkomponentenanalyse zeigte sich, dass durch die ersten drei Hauptkomponenten kumulativ 76,4% der Varianz erklärt werden kann. In der Cluster-Analyse zeigte sich eine bessere Zuordnung der Zelltypen zu einem der beiden Cluster (Trefferquote 0,76, Zufallstrefferquote 0,57), wobei weiterhin keine klare Auftrennung gelang (Abbildung 36).

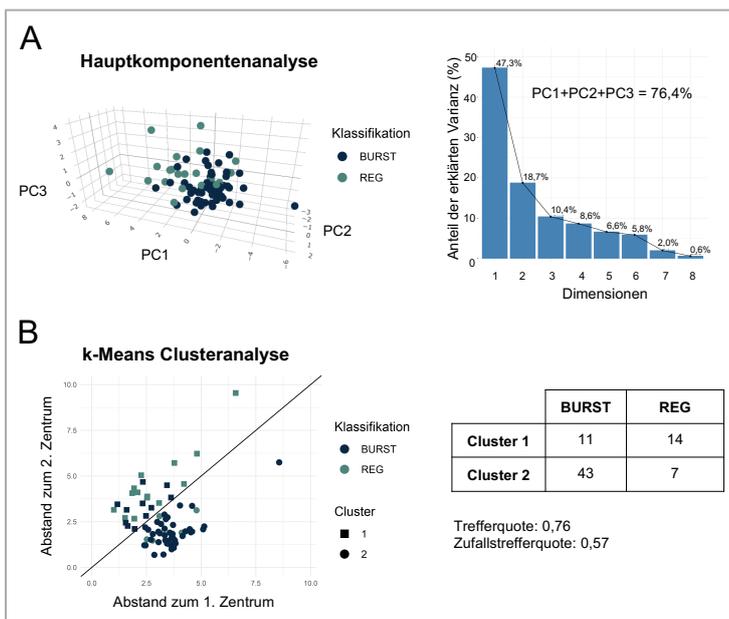


Abbildung 36

Hauptkomponenten- und Clusteranalyse II.

Ergebnisse der Hauptkomponenten und k-Means-Cluster-Analyse basierend auf den 9 sich zwischen BURST und REG signifikant unterscheidenden Parametern der aktiven und passiven Membraneigenschaften von 75 burstenden und regulär feuenden subikulären Pyramidenzellen (BURST, REG).

A Dreidimensionale Visualisierung der Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse mit Veranschaulichung des erklärten Varianzanteils (PC1=47,3%, PC2=18,7%, PC3=10,4%; insgesamt 76,4%).

B Zweidimensionale Visualisierung der k-Means-Clusteranalyse mit Vierfeldertafel zur Verdeutlichung der quantitativen Zuordnung von BURST und REG zu den beiden Clustern ($k=2$). PC = Hauptkomponente. BURST: $n=54$, REG: $n=21$.

Um einen besseren Eindruck über die Verteilung der beiden Typen subikulärer Pyramidenzellen im multidimensionalen Raum durch Vergrößerung des Stichprobenumfangs zu gewinnen, wurde der Gesamtdatensatz aller subikulären Pyramidenzellen, für welche Daten zu den 15 Parametern der Membraneigenschaften erhoben wurden, untersucht. Hierzu wurden 303 subikulären Pyramidenzellen (BURST n=236, REG n=67) ungeachtet der während der Messung verwendeten extra- und intrazellulären Lösungen eingeschlossen. Sowohl die k-Means-Cluster-Analyse als auch die Hauptkomponentenanalyse zeigten ähnliche Befunde wie bereits für den ersten Datensatz beschrieben (Abbildung 37).

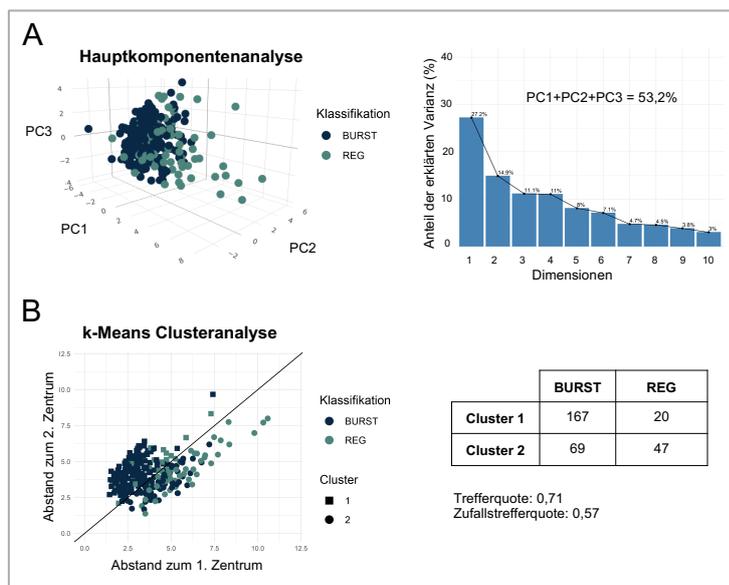


Abbildung 37
Hauptkomponenten- und Clusteranalyse III. Ergebnisse der Hauptkomponenten und k-Means-Cluster-Analyse basierend auf 15 Parametern der aktiven und passiven Membraneigenschaften von 303 burstenden und regulär feuernden subikulären Pyramidenzellen (BURST, REG).

A Dreidimensionale Visualisierung der Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse mit Veranschaulichung des erklärten Varianzanteils (PC1=27,2%, PC2=14,9%, PC3=11,1%; insgesamt 53,2%).

B Zweidimensionale Visualisierung der k-Means-Clusteranalyse mit Vierfeldertafel zur Verdeutlichung der quantitativen Zuordnung von BURST und REG zu den beiden Clustern ($k=2$). PC = Hauptkomponente. BURST: n=236, REG: n=67.

In Analogie zu Austin Graves et al. (2012)⁸⁸ wurden auch hier weitere Analysen durchgeführt, bei welchen lediglich die 9 zwischen BURST und REG signifikant unterschiedlichen Parameter einbezogen wurden: Frequenz-Adaptations-Index, Latenz, Schwellenpotential, Aktionspotential-Amplitude, Anstiegszeit, FWHMA, Anstiegssteigung, Abstiegssteigung, Membran-Zeit-Konstante, Eingangswiderstand, Sag-Ratio. Dies führte zu einer leichten Erhöhung der durch die ersten drei Hauptkomponenten kumulativ erklärten Varianz, wobei sich die Trennschäfte zwischen den beiden Clustern und die Zuordnung der Zelltypen zu einem der beiden Cluster weitestgehend unverändert zeigte (Abbildung 38).

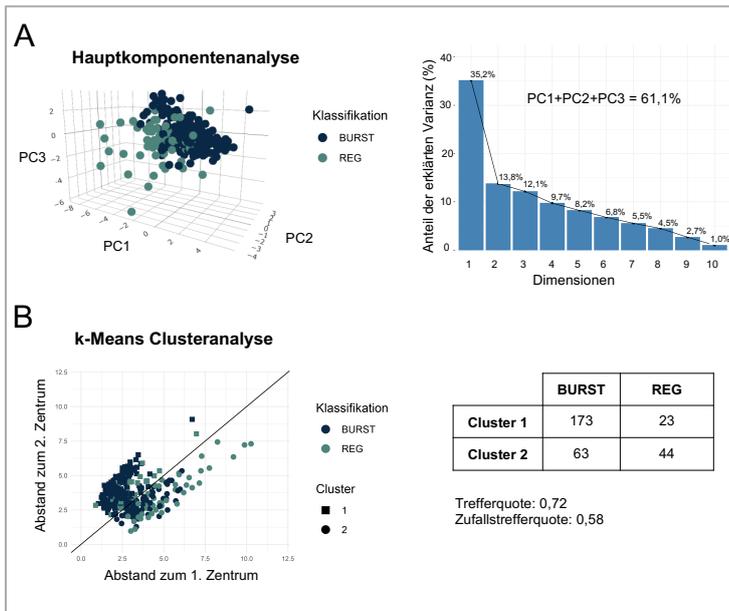


Abbildung 38
Hauptkomponenten- und Clusteranalyse IV. Ergebnisse der Hauptkomponenten und k-Means-Cluster-Analyse basierend auf den 9 sich zwischen BURST und REG signifikant unterscheidenden Parametern der aktiven und passiven Membraneigenschaften von 303 burstenden und regulär feuernden subikulären Pyramidenzellen (BURST, REG). **A** Dreidimensionale Visualisierung der Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse mit Veranschaulichung des erklärten Varianzanteils (PC1=35,2%, PC2=13,8%, PC3=12,1%; insgesamt 61,1%). **B** Zweidimensionale Visualisierung der k-Means-Clusteranalyse mit Vierfeldertafel zur Verdeutlichung der quantitativen Zuordnung von BURST und REG zu den beiden Clustern ($k=2$). PC = Hauptkomponente. BURST: $n=236$, REG: $n=67$.

Weiterhin wurde versucht herauszufinden, ob durch den Einschluss von Parametern der Spontanaktivität sowie Einbeziehung morphologischer Daten eine bessere Dimensionreduktion und eine größere Trennschärfe des *Clusterings* erreicht werden kann. Hierfür wurde ein Datensatz bestehend aus 31 subikulären Pyramidenzellen (BURST $n=23$, REG $n=8$), für welche neben den 15 Parametern der Membraneigenschaften zusätzlich Daten für 7 Parameter der Spontanaktivität und 18 morphologische Parameter vorlagen, untersucht. Unter Einschluss dieser Daten lieferte die Hauptkomponentenanalyse eine durch die ersten drei Hauptkomponenten erklärte Varianz von 50,4%. Mittels der k-Means-Clusteranalyse gelang keine Auftrennung in zwei distinkte Cluster, welche mit einer Trefferquote von 0,65 (Zufallstrefferquote 0,57) auch ohne eindeutige Bezüge zum Zelltyp waren (Abbildung 39).

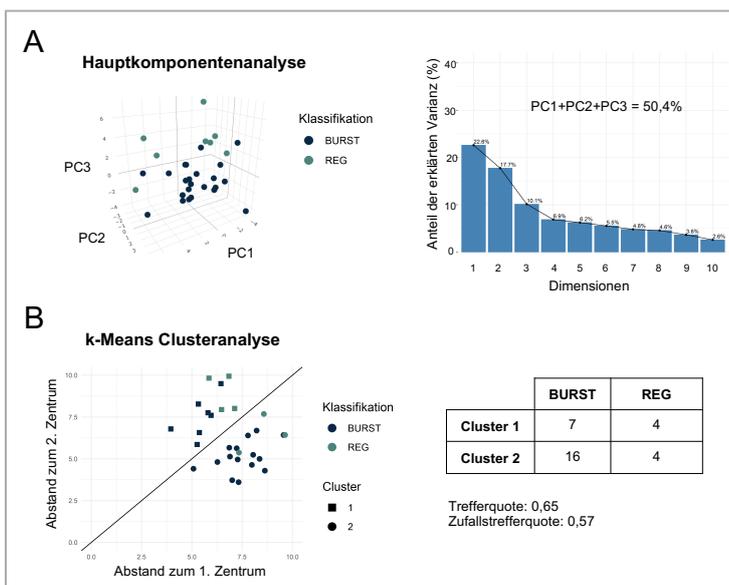


Abbildung 39
Hauptkomponenten- und Clusteranalyse V. Ergebnisse der Hauptkomponenten und k-Means-Cluster-Analyse basierend auf 15 Parametern der Membraneigenschaften, 7 Parametern der Spontanaktivität sowie 18 Parametern der Dendritenmorphologie von 31 burstenden und regulär feuernden subikulären Pyramidenzellen (BURST, REG). **A** Dreidimensionale Visualisierung der Ergebnisse der Hauptkomponenten-analyse mit Veranschaulichung des erklärten Varianzanteils (PC1=22,6%, PC2=17,7%, PC3=10,1%; insgesamt 50,4%). **B** Zweidimensionale Visualisierung der k-Means-Clusteranalyse mit Vierfeldertafel zur Verdeutlichung der quantitativen Zuordnung von BURST und REG zu den beiden Clustern ($k=2$). PC = Hauptkomponente. BURST: $n=23$, REG: $n=8$.

Auch für diesen Datensatz wurden, basierend auf dem Vorgehen von Austin Graves et al. (2012)⁸⁸, weitere Analysen durchgeführt. Aufgrund signifikanter Unterschiede zwischen BURST und REG wurden 7 Parameter der aktiven und passiven Membraneigenschaften (Frequenz-Adaptations-Index, Schwellenpotential, Anstiegszeit, Anstiegssteigung, Abstiegssteigung, Membran-Zeit-Konstante, Eingangswiderstand), 2 Parameter der Spontanaktivität (mittlere Anstiegszeit sEPSC, mittlere FWHMA sEPSC) sowie 5 Parameter der morphologischen Eigenschaften (basale Schnittpunktsumme, basale maximale Anzahl an Schnittpunkten, Anzahl basaler Dendritenäste, basale Kontraktion, apikale Kontraktion) berücksichtigt. Hier zeigte sich schließlich eine durch die ersten drei Hauptkomponenten kumulativ erklärte Varianz von 67,8% sowie eine Trefferquote 0,81 (Zufallstrefferquote 0,52) für die Zuordnung der Zelltypen zu den beiden Clustern (Abbildung 40).

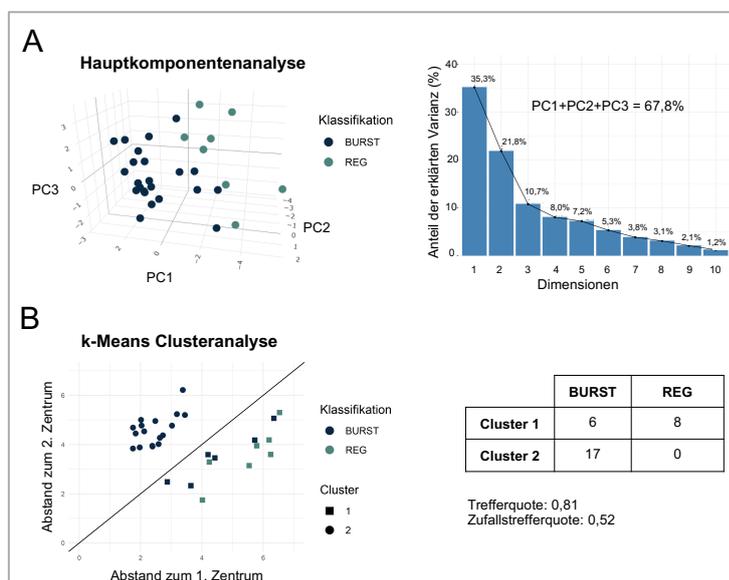


Abbildung 40
Hauptkomponenten- und Clusteranalyse VI. Ergebnisse der Hauptkomponenten- und k-Means-Cluster-Analyse basierend auf den sich zwischen BURST und REG signifikant unterscheidenden 7 Parametern der Membraneigenschaften, 2 Parametern der Spontanaktivität sowie 5 Parametern der Dendritenmorphologie von 31 burstenden und regulär feuernden subikulären Pyramidenzellen (BURST, REG).

A Dreidimensionale Visualisierung der Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse mit Veranschaulichung des erklärten Varianzanteils (PC1=35,3%, PC2=21,8%, PC3=10,7%; insgesamt 67,8%).

B Zweidimensionale Visualisierung der k-Means-Clusteranalyse mit Vierfeldertafel zur Verdeutlichung der quantitativen Zuordnung von BURST und REG zu den beiden Clustern ($k=2$). PC = Hauptkomponente. BURST: $n=23$, REG: $n=8$.

4.6 Synaptische Kurzzeitplastizität an der CA1-Subikulum-Synapse

Synaptische Kurzzeitplastizität bezeichnet eine einige Millisekunden bis Minuten anhaltende, aktivitätsabhängige Veränderung der synaptischen Übertragungsstärke zwischen zwei Neuronen.¹²⁴ Vorangegangene Untersuchungen legen nahe, dass burstendes Entladungsverhalten für die Informationsverarbeitung, also für die neuronale Signalübertragung und die Induktion und Aufrechterhaltung von Plastizität relevant sein könnte.^{53,215} Ob es Unterschiede in der Ausprägung von synaptischer Kurzzeitplastizität und ihren zugrunde liegenden Mechanismen zwischen den beiden Typen subikulärer Pyramidenzelltypen gibt, ist noch nicht ausreichend erforscht und Gegenstand des folgenden Kapitels.

4.6.1 Kurzzeitplastizität bei burstenden und regulär feuernenden Zellen

Um der Frage nachzugehen, ob sich zwischen BURST und REG Unterschiede in der Ausprägung der PTP an der CA1-Subikulum-Synapse finden lassen, wurden Veränderungen der EPSC-Amplituden von Doppelpulse nach tetanischer Stimulation bei insgesamt 75 subikulären Pyramidenzellen (BURST: n=55, REG: n=20) untersucht. Die HFS erfolgte dabei in Form von 50 oder 100 Pulsen, die mit einer Frequenz von 50 Hz appliziert wurden (50x50 Hz, 100x50 Hz).

Es zeigten sich keine offensichtlichen qualitativen Unterschiede der durch Stimulation afferenter Eingänge aus der CA1-Region evozierten EPSC von BURST und REG. Nach HFS kam es bei allen untersuchten Zellen zu einer über Minuten andauernden Erhöhung der synaptischen Übertragungsstärke im Sinne einer PTP. Die PTP zeigte bei beiden Zelltypen und beiden Arten der HFS eine ähnliche Ausprägung (BURST 50x50 Hz: $194 \pm 5\%$ n=41, REG 50x50 Hz: $203 \pm 8\%$ n=16; BURST 100x50 Hz: $200 \pm 11\%$ n=14, REG 100x50 Hz: $204 \pm 15\%$ n=4). Eine zweifaktorielle ANOVA wurde durchgeführt, um die Haupteffekte von Zelltyp (BURST, REG) und HFS-Protokoll (50x50 Hz, 100x50 Hz) sowie die Interaktionseffekte zwischen beiden Faktoren zu vergleichen. Keiner der Effekte zeigte in der statistischen Testung Signifikanz. Der Haupteffekt des Zelltyps erreichte eine F-Ratio von $F(1, 71)=0,34$, $p=0,5597$ (BURST: $195 \pm 5\%$, REG: $203 \pm 7\%$). Der Haupteffekt des HFS-Protokolls erzielte eine F-Ratio von $F(1, 71)=0,11$, $p=0,7464$ (50x50 Hz: $196 \pm 5\%$, 100x50 Hz: $201 \pm 9\%$). Weiterhin konnte kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Faktoren Zelltyp und HFS-Protokoll festgestellt werden ($F(1, 71)=0,05$, $p=0,8292$). Die Induktion der PTP wurde erwartungsgemäß von einem mehrere Minuten andauernden Abfall der Doppelpulsratio begleitet, was als Hinweis auf einen präsynaptischen Ursprung der PTP betrachtet werden kann.

In der überwiegenden Anzahl der Fälle zeigte sich bei einem Doppelpulsintervall von 50 ms eine PPF. Die mittlere Doppelpulsratio vor der HFS (Doppelpulsratio der fünfminütigen Basislinie) betrug bei BURST $1,29 \pm 0,03$ und bei REG $1,19 \pm 0,07$ und unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Zelltypen ($p=0,0879$, Mann-Whitney-Test).

Bekannt ist, dass bei geringer Amplitude des ersten EPSC das darauffolgende EPSC in Übereinstimmung mit der „Restcalcium-Hypothese“ (siehe Kapitel 1.4.3 *Kurzzeitplastizität*) umso größer ist.^{124,127} Zur Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Doppelpulsratio und der Größe der ersten EPSC-Amplitude wurde beide Größen grafisch gegeneinander aufgetragen. Zelltypunabhängig zeigte sich hier erwartungsgemäß ein negativ exponentieller Zusammenhang.

Abschließend ist festzuhalten, dass sich die beiden Typen subikulärer Pyramidenzellen im Hinblick auf das Ausmaß der PPF sowie der durch zwei verschiedene HFS-Protokolle induzierten PTP nicht unterschieden.

Abbildung 41 zeigt den gemittelten normalisierten Verlauf der ersten EPSC-Amplitude sowie den Verlauf der Doppelpulsratio vor und nach der HFS mit 50x50 Hz sowie die Ergebnisse der Auswertung der PTP und der Doppelpulsratio.

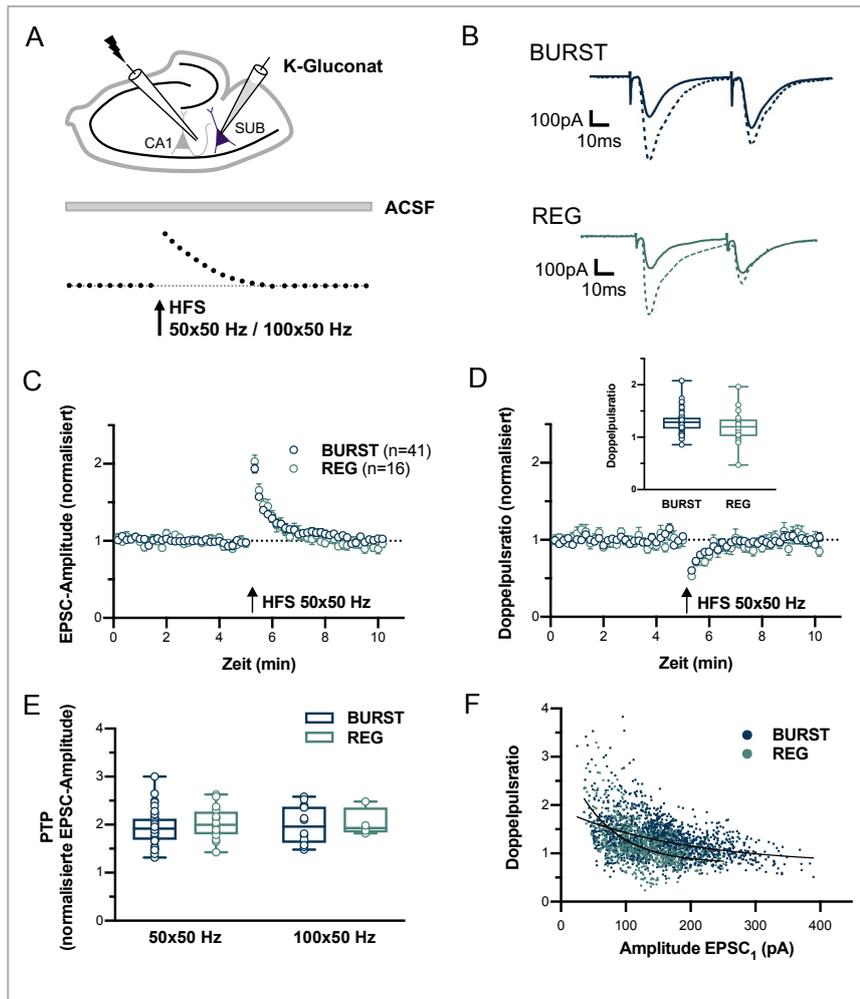


Abbildung 41 PTP bei BURST und REG. Posttetanische Potenzierung (PTP) an der CA1-Subikulum-Synapse von burstenden und regulär feuernden Zellen (BURST, REG). **A** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. **B** Repräsentative Beispiele für die EPSC-Amplituden der Doppelpulse vor (durchgezogene Linie) und nach (gestrichelte Linie) Hochfrequenzstimulation (HFS) mit 50x50Hz **C** Gemittelter normalisierter Verlauf der ersten EPSC-Amplitude vor und nach HFS mit 50x50 Hz. **D** Gemittelter normalisierter Verlauf der Doppelpulsratio vor und nach HFS mit 50x50 Hz. Der Boxplot zeigt die mittlere Doppelpulsratio der fünfminütigen Basislinie (BURST: n=55, REG: n=20; p=0,0879). **E** Ergebnisse der PTP-Messungen (BURST 50x50 Hz: n=41, REG 50x50 Hz: n=16, BURST 100x50 Hz: n=14, REG 100x50 Hz: n=4; Haupteffekt Zelltyp p=0,5597, Haupteffekt HFS-Protokoll p=0,7464, Interaktionseffekt p=0,8292). **F** Darstellung des negativ exponentiellen Zusammenhangs zwischen der Doppelpulsratio und der ersten EPSC-Amplitude (Amplitude EPSC₁). 50x50 Hz = 50 Pulse, Frequenz 50 Hz, 100x50 Hz = 100 Pulse, Frequenz 50 Hz.

4.6.2 Bedeutung postsynaptisch lokalisierter NMDA-Rezeptoren

Um die Frage nach der Rolle postsynaptischer NMDA-R für die Ausprägung der PTP an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST und REG zu adressieren, erfolgte eine pharmakologische Blockade postsynaptischer NMDA-R. Die spezifische Blockade postsynaptischer Rezeptoren wurde durch intrazelluläre Applikation des nicht-kompetitiven NMDA-R-Antagonisten MK801 in

die postsynaptische Zelle durch Diffusion der intrazellulären Messlösung aus der Messpipette gewährleistet. MK801 unterbindet den Ioneneinstrom durch den NMDA-R-Kanal, wobei die Bindungsstelle von MK801 innerhalb des Kanals liegt. Die Bindung von MK801 ist ferner spannungsabhängig, was bedeutet, dass die Kanalpore für die Bindung von MK801 geöffnet sein muss.²¹⁶

Blockade postsynaptischer NMDA-Rezeptoren durch intrazelluläres caged MK801

Zunächst wurde ein Protokoll entwickelt, bei welchem durch Applikation einer photoreaktiven Form von MK801 (*caged* MK801) in die intrazelluläre Lösung eine kontrollierte Aktivierung der MK801-Wirkung durch UV-Licht-Pulse möglich sein sollte. Nach Erfassung der PTP durch eine erste HFS ohne NMDA-R-Blockade (MK801 inaktiv) sollte das *caged* MK801 durch einen UV-Licht-Puls aktiviert und die PTP unter Blockade postsynaptischer NMDA-R durch eine zweite HFS aufgezeichnet werden (Abbildung 42). Das Ziel war es, Veränderungen der PTP-Ausprägung durch Blockade postsynaptischer NMDA-R innerhalb einer Zellmessung detektieren und quantifizieren zu können.

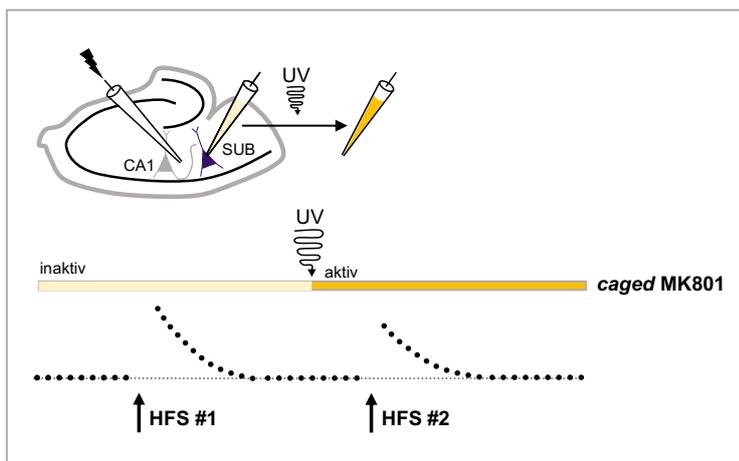


Abbildung 42 Versuchsanordnung *caged* MK801. Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. Ziel war eine kontrollierte Aktivierung von MK801 durch Verwendung einer photoreaktiven MK801-Form (*caged* MK801), um das Ausmaß der durch Hochfrequenzstimulation (HFS) induzierten posttetanischen Potenzierung ohne postsynaptische NMDA-Rezeptor-Blockade (HFS#1, MK801 inaktiv) sowie unter postsynaptischer NMDA-Rezeptor-Blockade (HFS#2, MK801 nach Aktivierung durch UV-Licht-Pulse) zu erfassen.

Um zuvor die Wirksamkeit von intrazellulärem *caged* MK801 zu testen, wurden NMDA-EPSC vor und nach Aktivierung von *caged* MK801 untersucht. AMPA- und GABA-Rezeptoren wurden hierfür pharmakologisch inhibiert. Kontrollmessungen mit intrazellulären Lösungen ohne *caged* MK801 (Kalium-Gluconat-Lösung, Cäsium-Gluconat-Lösung) wurden angefertigt, um eventuell auftretende Effekte der UV-Licht-Applikation zu erfassen.

Hier zeigte sich zelltypunabhängig ein Abfall der NMDA-EPSC-Amplitude nicht wie erwartet lediglich bei den Messungen mit *caged* MK801, sondern auch im Rahmen der Kontrollmessungen. Ferner kam es zu einem nicht erwarteten Abfall des Eingangswiderstandes. Die gemittelten Verläufe der NMDA-EPSC-Amplitude, des Eingangswiderstandes sowie des Haltestroms unter Anwendung der drei verschiedenen

intrazellulären Messlösungen sind in Abbildung 43 dargestellt. Diesem Effekt konnte weder durch eine Verkürzung der UV-Licht-Dauer noch eine Verminderung der UV-Licht-Stärke oder Zugabe von Ascorbinsäure in die intrazellulären Messlösungen entgegengewirkt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Ascorbinsäure verhält sich in wässrigen Lösungen als Reduktionsmittel, weshalb angenommen wurde, dass Ascorbinsäure den schädigenden Einflüssen von UV-Licht entgegenwirken könnte.^{195,196} Zusammenfassend ließ sich eine Schädigung der subikulären Pyramidenzellen, die sich in einem Abfall des Eingangswiderstandes widerspiegelte, durch keine der durchgeführten Modifizierungen des Messprotokolls relevant vermindern. Es wurde davon ausgegangen, dass der für dieses Messprotokoll verwendete UV-Licht-Puls die untersuchten Zellen derart stark schädigte, dass von den Untersuchungen keine verlässlichen Ergebnisse zu erwarten waren. Von der Weiterführung dieser Experimente wurde daher abgesehen.

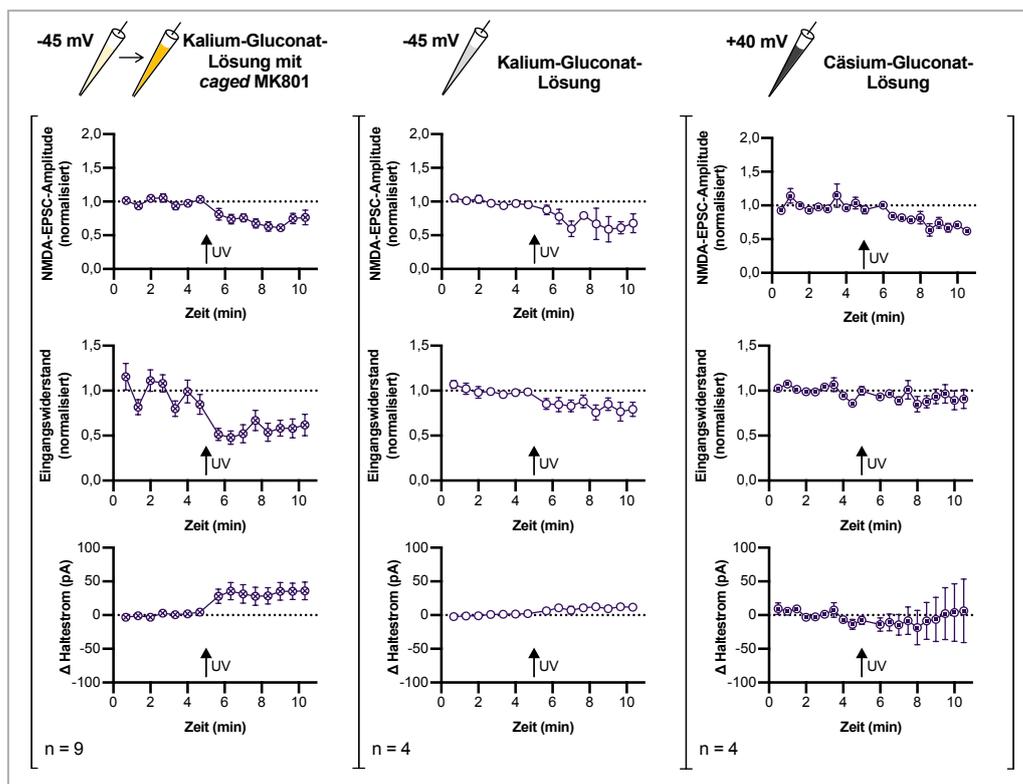


Abbildung 43 Auswirkungen der Applikation von UV-Licht. Diagramme zeigen den Verlauf der NMDA-EPSC-Amplitude, des Eingangswiderstandes und des Haltestroms vor und nach Applikation von UV-Licht (Pfeil) unter Anwendung drei verschiedener intrazellulärer Messlösungen: Kalium-Gluconat-Lösung mit *caged* MK801 (**linker Abschnitt**; Membranpotential -45 mV, Bins von 40s aus zwei Datenpunkten), Kalium-Gluconat-Lösung (**mittlerer Abschnitt**; Membranpotential -45 mV, Bins von 40s aus zwei Datenpunkten), Cäsium-Gluconat-Lösung (**rechter Abschnitt**; Membranpotential +40 mV). Der Abfall der NMDA-EPSC-Amplitude ging unabhängig von der verwendeten Lösung mit einem Abfall des Eingangswiderstandes einher, was ein Hinweis für eine UV-Licht-bedingte Zellschädigung sein kann.

Blockade postsynaptischer NMDA-Rezeptoren durch intrazelluläres MK801

Um weiterhin die Frage nach der Bedeutung postsynaptischer NMDA-R für die Ausprägung der PTP an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST und REG zu adressieren, wurden Untersuchungen mit der nicht-photoreaktiven Form von MK801 durchgeführt. Die spezifische Blockade postsynaptischer NMDA-R wurde auch hier durch die intrazelluläre Applikation von MK801 über die Diffusion der intrazellulären Messlösung in die postsynaptische Zelle gewährleistet. Kontrolluntersuchungen wurden mit einer intrazellulären Kalium-Gluconat-Lösung ohne MK801 durchgeführt, um einen interexperimentellen Vergleich zu ermöglichen.

Zunächst wurde getestet, ob sich intrazelluläres MK801 im Hinblick auf eine Blockade postsynaptischer NMDA-R wirksam zeigt. Hierfür wurde nach PTP-Induktion durch 50x50 Hz HFS der synthetische partielle NMDA-R-Agonist NMDA in einer Konzentration von 20 μ M über einen Zeitraum von 5 Minuten der extrazellulären Messlösung zugeführt. Es wurde davon ausgegangen, dass sich eine suffiziente Blockade postsynaptischer NMDA-R durch intrazelluläres MK801 in einem geringeren NMDA-induzierten Haltestromabfall widerspiegeln würde.

Die Applikation von NMDA führte zelltypunabhängig zu einem zügigen Abfall der EPSC-Amplitude, einer NMDA-induzierten chemischen LTD sowie einem reversiblen Abfall von Haltestrom und Eingangswiderstand durch Öffnung von NMDA-R. Die Doppelpulsratio zeigte einen mit dem NMDA-induzierten Abfall der EPSC-Amplitude synchronen Anstieg. Der Quantifizierung des Effekts der NMDA-Applikation auf die EPSC-Amplitude, den Haltestrom und den Eingangswiderstand wurde das Minimum im Zeitfenster vom Beginn der NMDA-Applikation bis 10 Minuten nach deren Beendigung zugrunde gelegt. Um den Einfluss von „Ausreißern“ zu minimieren wurden hierfür jeweils sechs Datenpunkte zu Bins von 60 s zusammengefasst. Um eine NMDA-induzierte chemische LTD zu erfassen, wurde die mittlere EPSC-Amplitude ab 10 Minuten nach Beendigung der NMDA-Applikation verwendet. Abbildung 44 zeigt den gemittelten normalisierten Verlauf der ersten EPSC-Amplitude, der Doppelpulsratio und des Eingangswiderstandes sowie die mittlere absolute Veränderung des Haltestroms und die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse.

Unter MK801 fiel der maximale absolute Haltestromabfall mit $-64,35 \pm 17,46$ pA signifikant geringer aus als unter Kontrollbedingungen, unter welchen es zu einem maximalen absoluten Haltestromabfall von $-157,43 \pm 34,67$ pA kam, (MK801: n=7; Kontrolle: n=5; $p=0,0257^*$, t-Test für unabhängige Stichproben). Dieser beschriebene signifikante Unterschied im Ausmaß des Haltestromabfalls lässt auf eine suffiziente Blockade postsynaptischer NMDA-R durch MK801 schließen.

Im Folgenden werden die als Nebenbefunde erhobenen Ergebnisse aufgeführt: Unter Kontrollbedingungen betrug die minimale EPSC-Amplitude nach NMDA-Applikation $11 \pm 1\%$ der EPSC-Amplitude der Basislinie und war signifikant niedriger als unter MK801 mit $41 \pm 10\%$

der EPSC-Amplitude der Basislinie (MK801: n=7, Kontrolle: n=5; p=0,0209*, Welch-Test). Der Abfall der EPSC-Amplitude am jeweiligen Punkt seiner stärksten Ausprägung ging unter Kontrollbedingungen sowie unter MK801 gleichermaßen mit einer Erhöhung der Doppelpulsratio gegenüber der mittleren Doppelpulsratio der Basislinie einher (MK801: $140 \pm 12\%$ n=7, Kontrolle: $133 \pm 12\%$ n=5; p=0,7046, t-Test für unabhängige Stichproben). Ferner fiel der maximale Abfall des Eingangswiderstandes gegenüber dem mittleren Eingangswiderstand der Basislinie unter Kontrollbedingungen signifikant stärker aus als unter MK801 (MK801: $78 \pm 6\%$ n=7; Kontrolle: $55 \pm 7\%$ n=5; p=0,0323*, t-Test für unabhängige Stichproben). Die mittlere EPSC-Amplitude ab 10 Minuten nach dem Auswaschen von NMDA quantifizierte die auftretende NMDA-induzierte chemische LTD. Sie unterschied sich zwischen Messungen mit MK801 und unter Kontrollbedingungen signifikant: Unter MK801 zeigte sich eine LTD mit einem mittleren Abfall auf $80\% \pm 6\%$ der EPSC-Amplitude der Basislinie, wohingegen diese Depression unter Kontrollbedingungen mit einem mittleren Abfall auf $35 \pm 7\%$ der Basislinien-Amplitude signifikant stärker ausgeprägt war (MK801: n=7; Kontrolle: n=5; p<0,001***, t-Test für unabhängige Stichproben). In diesem Zeitfenster bestand unter Kontrollbedingungen eine leichte Erhöhung der mittleren Doppelpulsratio gegenüber der mittleren Doppelpulsratio der Basislinie, wobei der Unterschied gegenüber MK801 nicht signifikant war (MK801: $103 \pm 6\%$ n=7, Kontrolle: $123 \pm 9\%$ n=5; p=0,0794, t-Test für unabhängige Stichproben). Zusammenfassend konnte auf Grundlage dieser Untersuchungen von einer suffizienten Blockade postsynaptischer NMDA-R durch intrazelluläres MK801 ausgegangen werden.

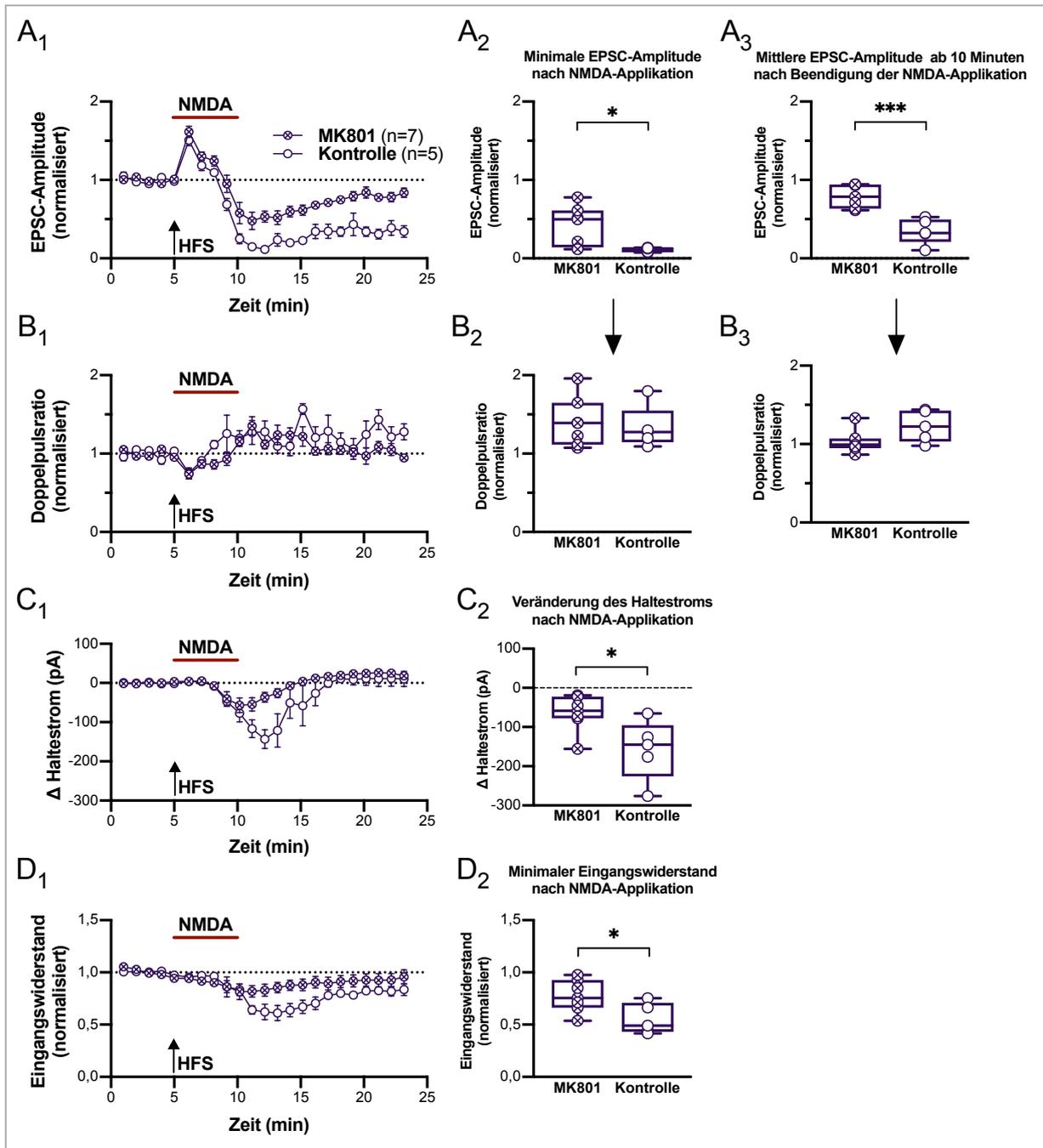


Abbildung 44 Untersuchungen zur Wirksamkeit von intrazellulärem MK801. Diagramme auf der linken Seite zeigen den Verlauf der EPSC-Amplitude (**A₁**), der Doppelpulsratio (**B₁**), des Haltestroms (**C₁**) und des Eingangswiderstandes (**D₁**) vor, während und nach der fünfminütigen Applikation von NMDA. Bins von 60 s aus 6 Datenpunkten. **A₂** Die minimale EPSC-Amplitude nach NMDA-Applikation fiel unter Kontrollbedingungen geringer aus als unter MK801 ($p=0,0209^*$). **B₂** zeigt die zugehörige Veränderung der Doppelpulsratio ($p=0,7046$). **A₃** Die NMDA-induzierte LTD war gemessen an der mittleren EPSC-Amplitude ab 10 Minuten nach Beendigung der NMDA-Applikation unter Kontrollbedingungen stärker ausgeprägt als unter MK801 ($p<0,001^{***}$). **B₃** zeigt die zugehörige Veränderung der Doppelpulsratio ($p=0,0794$). **C₂** Der absolute Haltestromabfall zeigte sich unter MK801 geringer als unter Kontrollbedingungen ($p=0,0257^*$). **D₂** Der Abfall des Eingangswiderstandes war unter Kontrollbedingungen stärker als unter MK801 ($p=0,0323^*$).

Um zu untersuchen, ob postsynaptisch lokalisierte NMDA-R Einfluss auf die Ausprägung der PTP an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST und REG nehmen, wurden Messungen der PTP in An- und Abwesenheit von MK801 in der intrazellulären Messlösung bei insgesamt 74 subikulären Pyramidenzellen (BURST: n=53, REG: n=21) verglichen, von welchen 17 Zellen (BURST n=12, REG: n=5) unter MK801 gemessen wurden. In Abbildung 45 sind der Verlauf der ersten EPSC-Amplitude vor und nach der HFS mit 50x50 Hz sowie die Ergebnisse der PTP-Messungen in MK801 mit den zugehörigen Messungen unter Kontrollbedingungen bei BURST und REG dargestellt.

Die PTP zeigte bei beiden Zelltypen sowie unter MK801 und unter Kontrollbedingungen eine ähnliche Ausprägung (BURST MK801: $189 \pm 7\%$ n=12, BURST Kontrolle: $194 \pm 6\%$ n=41, REG MK801: $186 \pm 21\%$ n=5, REG Kontrolle: $203 \pm 8\%$ n=16). Eine zweifaktorielle ANOVA wurde durchgeführt, um die Haupteffekte von Zelltyp (BURST, REG) und Anwendung von MK801 (MK801, Kontrolle) sowie die Interaktionseffekte zwischen beiden Faktoren zu vergleichen. Keiner der Effekte zeigte sich in der statistischen Testung signifikant. Der Haupteffekt des Zelltyps erreichte eine F-Ratio von $F(1, 70)=0,10$, $p=0,7478$ (BURST: $193 \pm 5\%$, REG: $190 \pm 8\%$). Der Haupteffekt der Anwendung von MK801 erzielte eine F-Ratio von $F(1, 70)=0,30$, $p=0,2997$ (MK801: $188 \pm 8\%$, Kontrolle: $196 \pm 5\%$). Weiterhin konnte kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Faktoren Zelltyp und Anwendung von MK801 festgestellt werden ($F(1, 70)=0,31$, $p=0,5810$).

Ferner wurde die mittlere Doppelpulsratio vor der HFS (Doppelpulsratio der fünfminütigen Basislinie) von insgesamt 92 Zellen verglichen. Sie betrug bei BURST unter MK801 $1,23 \pm 0,05$ und unter Kontrollbedingungen $1,29 \pm 0,03$, sowie bei REG und unter MK801 $1,11 \pm 0,09$ und unter Kontrollbedingungen $1,19 \pm 0,07$ (BURST MK801: n=12, BURST Kontrolle: n=55, REG MK801: n=5, REG Kontrolle: n=20). Auch hier wurde eine zweifaktorielle ANOVA verwendet, um die Haupteffekte von Zelltyp (BURST, REG) und Anwendung von MK801 (MK801, Kontrolle) auf die Doppelpulsratio sowie die Interaktionseffekte zwischen beiden Faktoren zu vergleichen. Hierbei konnten keine signifikanten Effekte detektiert werden: Haupteffekt Zelltyp $F(1, 88)=2,48$, $p=0,1188$ (BURST: $1,28 \pm 0,03$, REG: $1,17 \pm 0,06$); Haupteffekt Anwendung von MK801 $F(1, 88)=1,18$, $p=0,2807$ (MK801: $1,19 \pm 0,05$, Kontrolle: $1,26 \pm 0,03$); Interaktionseffekt $F(1, 88)=0,02$, $p=0,8824$.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass die Blockade postsynaptischer NMDA-R durch intrazelluläres MK801 keinen Einfluss auf die Ausprägung der hier untersuchten Phänomene der Kurzzeitplastizität an der CA1-Subikulum Synapse von BURST und REG zu haben scheint.

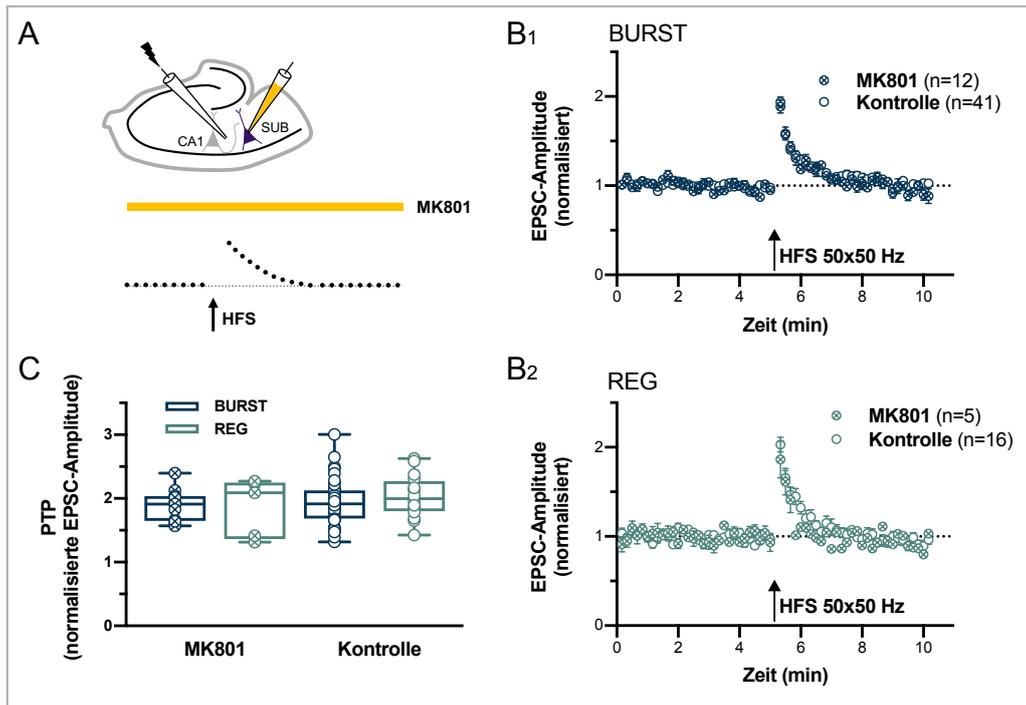


Abbildung 45 PTP unter NMDA-R-Blockade durch intrazelluläres MK801. **A** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. CA1 = Areal 1 des Cornu ammonis, SUB = Subikulum. **B** Verlauf der ersten EPSC-Amplitude bei burstenden und regulär feuernden Zellen (BURST **B**₁, REG **B**₂) vor und nach Induktion einer posttetanischen Potenzierung (PTP) durch eine Hochfrequenzstimulation (HFS) von 50 Pulsen in einer Frequenz von 50 Hz (50x50 Hz). **C** Ergebnisse der durch HFS induzierten PTP unter intrazellulärem MK801 sowie unter Kontrollbedingungen bei BURST und REG (Haupteffekt Zelltyp $p=0,7478$, Haupteffekt Anwendung von MK801 $p=0,2997$, Interaktionseffekt: $p=0,5810$). NMDA-R = NMDA-Rezeptor.

4.6.3 Bedeutung prä- und postsynaptischer NMDA-Rezeptoren

Um neben postsynaptisch lokalisierten NMDA-R auch die Rolle präsynaptisch lokalisierter NMDA-R für die Ausprägung der PTP an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST und REG mit zu erfassen, kam der NMDA-R-Blocker AP5 zum Einsatz. AP5 ist ein NMDA-R-Antagonist der GluN2-Untereinheiten, welcher kompetitiv an die Glutamat-Bindungsstelle der NMDA-R-GluN2-Untereinheit A-D des NMDA-R bindet.²¹⁷ Die Ausprägung der PTP wurde unter dem Einfluss von AP5 in der extrazellulären Lösung (gleichzeitige prä- und postsynaptische NMDA-R-Blockade) sowie unter Kontrollbedingungen gemessen.

Zunächst wurde ein Protokoll gewählt, bei welchem AP5 vor Beginn der Messung in einer Konzentration von 50 μM der extrazellulären Messlösung zugesetzt wurde. Diese Messlösung wurde nach Erfassung einer 5-minütigen Basislinie und der PTP durch eine erste HFS mit 50x50 Hz (PTP in AP5) durch eine AP5-freie extrazelluläre Messlösung ausgetauscht und die PTP durch eine zweite HFS mit 50x50 Hz (PTP ohne AP5) nach Erfassung einer 2,5-minütigen Basislinie erneut aufgezeichnet. Das Ziel war es, Veränderungen der PTP-Ausprägung durch NMDA-R-Blockade innerhalb einer Zellmessung detektieren und quantifizieren zu können.

Erstaunlicherweise zeigte die unter AP5 durch HFS induzierte PTP bei beiden Zelltypen eine stärkere Ausprägung als die nachfolgende PTP durch eine weitere HFS, welche nach Auswaschen von AP5 aus der extrazellulären Lösung induziert worden war. Bei BURST war die PTP nach Auswaschen von AP5 um $34 \pm 4\%$ (HFS #1: $190 \pm 8\%$, HFS #2: $156 \pm 7\%$; $p < 0,001^{***}$, t-Test für abhängige Stichproben; $n = 7$) und bei REG um $48 \pm 13\%$ (HFS #1: $209 \pm 14\%$, HFS #2: $161 \pm 17\%$; $p = 0,0695$, t-Test für abhängige Stichproben; $n = 3$) geringer ausgeprägt als die PTP in Anwesenheit von AP5. Dieser Effekt trat jedoch auch in den Kontrollexperimenten auf, wobei die zweite PTP bei BURST im Mittel um $27 \pm 7\%$ (HFS #1: $202 \pm 7\%$, HFS #2: $175 \pm 6\%$; $p = 0,0016^{**}$, t-Test für abhängige Stichproben; $n = 17$) und bei REG um $11 \pm 11\%$ (HFS #1: $202 \pm 11\%$, HFS #2: $198 \pm 17\%$; $p = 0,3153$, t-Test für abhängige Stichproben; $n = 8$) geringer war als die durch die erste HFS induzierte PTP. Dieser Effekt einer geringer ausgeprägten PTP im Rahmen der zweiten HFS zeigte sich demnach bei BURST, nicht aber bei REG, in der statistischen Testung signifikant. In Abbildung 46 sind der gemittelte normalisierte Verlauf der ersten EPSC-Amplitude vor und nach den PTP-Induktionen bei BURST und REG sowie die Ergebnisse der AP5- und Kontrollmessungen im Hinblick auf die PTP dargestellt.

Der Befund könnte sich dadurch erklären lassen, dass es bei der *whole-cell*-Konfiguration mit zunehmender Zeit zu einer Dialyse der intrazellulären Flüssigkeit und ihrer Bestandteile kommen kann. Dieses Risiko stellt einen Nachteil der verwendeten Methode bei der Untersuchung von Plastizitätsmechanismen im Rahmen zeitlich langer Messungen dar. Ferner kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hier um ein Phänomen der Metaplastizität handelt. Wie eingangs geschildert beschreibt der Begriff der Metaplastizität, dass vorausgegangene Aktivitätszustände einer Nervenzelle Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit einer zukünftigen Plastizitätsinduktion nehmen können.^{117,123} In diesem Fall könnte die vorausgegangene erste HFS die Ausprägung von Kurzzeitplastizität bei der zweiten HFS negativ beeinflusst und so eine Reduktion der PTP bewirkt haben. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich das verwendete Protokoll zur Untersuchung der eigentlichen Fragestellung als nicht geeignet erwies, weshalb im Weiteren ein interexperimenteller Vergleich der PTP-Ausprägung in An- und Abwesenheit von AP5 angestrebt wurde.

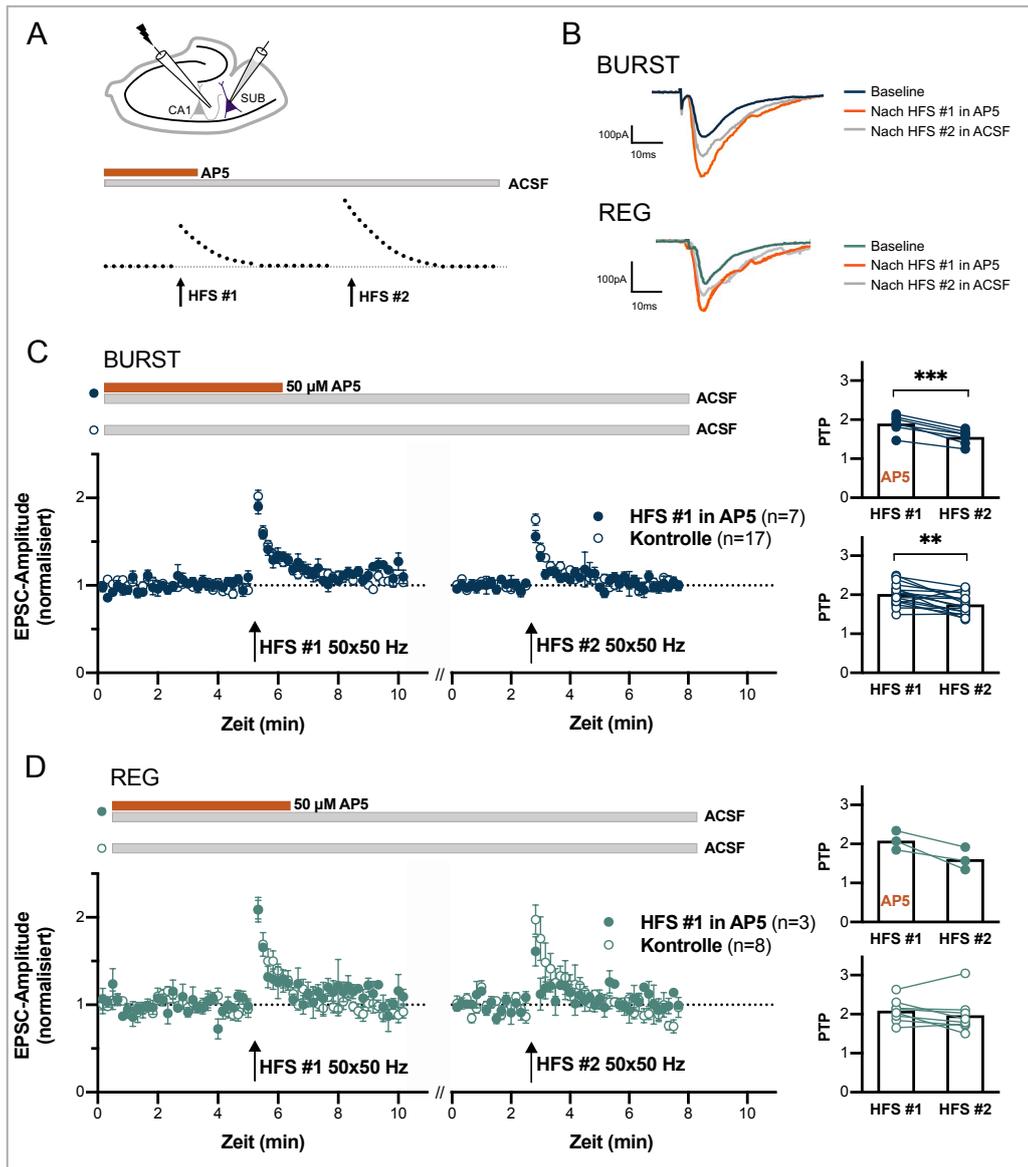


Abbildung 46 PTP unter NMDA-R-Blockade durch AP5 I. **A** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. **B** Repräsentative Beispiele für die erste EPSC-Amplitude vor und nach den Induktionen von posttetanischer Potenzierung (PTP) durch Hochfrequenzstimulation (HFS) in An- und Abwesenheit von AP5. **C** Verlauf der ersten EPSC-Amplitude vor und nach den Induktionen von PTP durch HFS mit 50 Pulsen in einer Frequenz von 50 Hz (50x50 Hz) bei burstenden subikulären Pyramidenzellen (BURST) sowie Ergebnisse der zugehörigen gepaarten Analyse der durch die erste (HFS #1) und zweite HFS (HFS #2) induzierten PTP (HFS #1 in AP5 versus HFS #2: $p < 0,001^{***}$; HFS #1 versus HFS #2: $p = 0,0016^{**}$). **D** Verlauf der ersten EPSC-Amplitude vor und nach den Induktionen von PTP durch HFS mit 50x50 Hz bei regulär feuernden subikulären Pyramidenzellen (REG) sowie Ergebnisse der zugehörigen gepaarten Analyse der durch die erste und zweite HFS induzierten PTP (HFS #1 in AP5 versus HFS #2: $p = 0,0695$; HFS #1 versus HFS #2: $p = 0,3153$). NMDA-R = NMDA-Rezeptor.

Um der Frage nach der Bedeutung einer NMDA-R-Blockade für die Ausprägung der PTP an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST und REG weiter nachzugehen, kamen zwei extrazelluläre Messlösungen zum Einsatz, in welchen jeweils eine einmalige PTP-Induktion erfolgte: (1) ACSF mit AP5 in einer Konzentration von 50 μ M und (2) ACSF ohne einen NMDA-R-Blocker (Kontrollbedingungen). Ferner wurde untersucht, ob die Verwendung einer höheren Konzentration von AP5 (100 μ M) und einer HFS von 100x50 Hz das Ergebnis der Untersuchung beeinflusst. Abbildung 47 zeigt den gemittelten normalisierten Verlauf der ersten EPSC-Amplitude vor und nach einer HFS von 50x50 Hz bei BURST und REG sowie die Ergebnisse der PTP-Messungen in AP5 (50 μ M oder 100 μ M) durch HFS (50x50 Hz oder 100x50 Hz) mit den zugehörigen Messungen unter Kontrollbedingungen.

Bei Blockade prä- und postsynaptisch lokalisierter NMDA-R durch AP5 in einer Konzentration von 50 μ M zeigte sich keine signifikante Verminderung der PTP durch HFS mit 50x50 Hz. BURST wiesen unter AP5 eine PTP von $209 \pm 14\%$ und unter Kontrollbedingungen eine PTP von $203 \pm 8\%$ der EPSC-Amplitude der Basislinie auf. REG zeigten unter AP5 eine PTP von $198 \pm 11\%$ und unter Kontrollbedingungen eine PTP von $194 \pm 6\%$ der EPSC-Amplitude der Basislinie. Eine zweifaktorielle ANOVA wurde durchgeführt, um die Haupteffekte von Zelltyp (BURST, REG) und 50 μ M AP5 (AP5, Kontrolle) sowie die Interaktionseffekte zwischen beiden Faktoren zu vergleichen. Keiner der Effekte zeigte sich in der statistischen Testung signifikant. Der Haupteffekt des Zelltyps erreichte eine F-Ratio von $F(1, 66)=0,67$, $p=0,4169$. Der Haupteffekt der Anwendung von AP5 in einer Konzentration von 50 μ M erzielte eine F-Ratio von $F(1, 66)=0,15$, $p=0,7044$. Weiterhin konnte kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Faktoren Zelltyp und Anwendung von AP5 festgestellt werden ($F(1, 66)=0,01$, $p=0,9336$).

Auch eine Erhöhung der Konzentration von AP5 auf 100 μ M und eine Verdopplung der Pulsanzahl der HFS auf 100 Pulse führten nicht zu einer Veränderung dieser Befunde (BURST 100 μ M AP5: $219 \pm 28\%$ $n=7$; BURST Kontrolle: $200 \pm 11\%$ $n=14$, REG 100 μ M AP5 $186 \pm 14\%$ $n=2$, REG Kontrolle: $204 \pm 15\%$, $n=4$). Auch hier wurde eine zweifaktorielle ANOVA verwendet, um die Haupteffekte von Zelltyp (BURST, REG) und Anwendung von AP5 in einer Konzentration von 100 μ M (AP5, Kontrolle) auf die PTP sowie die Interaktionseffekte zwischen beiden Faktoren zu vergleichen. Hierbei konnten keine signifikanten Effekte detektiert werden: Haupteffekt Zelltyp $F(1, 23)=0,37$, $p=0,5479$; Haupteffekt AP5 in einer Konzentration von 100 μ M $F(1, 23)=0,0004$, $p=0,9842$; Interaktionseffekt $F(1, 23)=0,60$, $p=0,4412$.

Die mittlere Doppelpulsratio vor der HFS (Doppelpulsratio der fünfminütigen Basislinie) betrug bei BURST unter 50 μ M AP5 $1,28 \pm 0,04$, unter 100 μ M AP5 $1,24 \pm 0,10$ und unter Kontrollbedingungen $1,29 \pm 0,03$ (BURST 50 μ M AP5: $n=10$, BURST 100 μ M AP5: $n=7$, BURST Kontrolle: $n=55$). Bei REG zeigte sich eine mittlere Doppelpulsratio vor der HFS von $1,14 \pm 0,04$ unter 50 μ M AP5, von $1,04 \pm 0,01$ unter 100 μ M AP5 sowie von $1,19 \pm 0,07$ unter Kontrollbedingungen (REG 50 μ M AP5: $n=3$, REG 100 μ M AP5: $n=2$, REG Kontrolle: $n=20$).

Eine zweifaktorielle ANOVA wurde durchgeführt, um die Haupteffekte von Zelltyp (BURST, REG) und der Anwendung von AP5 (50 μ M AP5, 100 μ M AP5, Kontrolle) sowie die Interaktionseffekte zwischen beiden Faktoren auf die Doppelpulsratio zu vergleichen. Keiner der Effekte zeigte sich in der statistischen Testung signifikant. Der Haupteffekt des Zelltyps erreichte eine F-Ratio von $F(1, 91)=3,18$, $p=0,0777$. Der Haupteffekt der Anwendung von AP5 in einer Konzentration von 50 μ M oder 100 μ M erzielte eine F-Ratio von $F(2, 91)=0,59$, $p=0,5541$. Weiterhin konnte kein signifikanter Interaktionseffekt zwischen den Faktoren Zelltyp und Anwendung von AP5 festgestellt werden ($F(2, 91)=0,15$, $p=0,8624$).

Die PTP und PPF zeigten demnach bei beiden Zelltypen und beiden Messprotokollen eine ähnliche Ausprägung, welche durch den NMDA-R-Blocker AP5 nicht beeinflusst wurde.

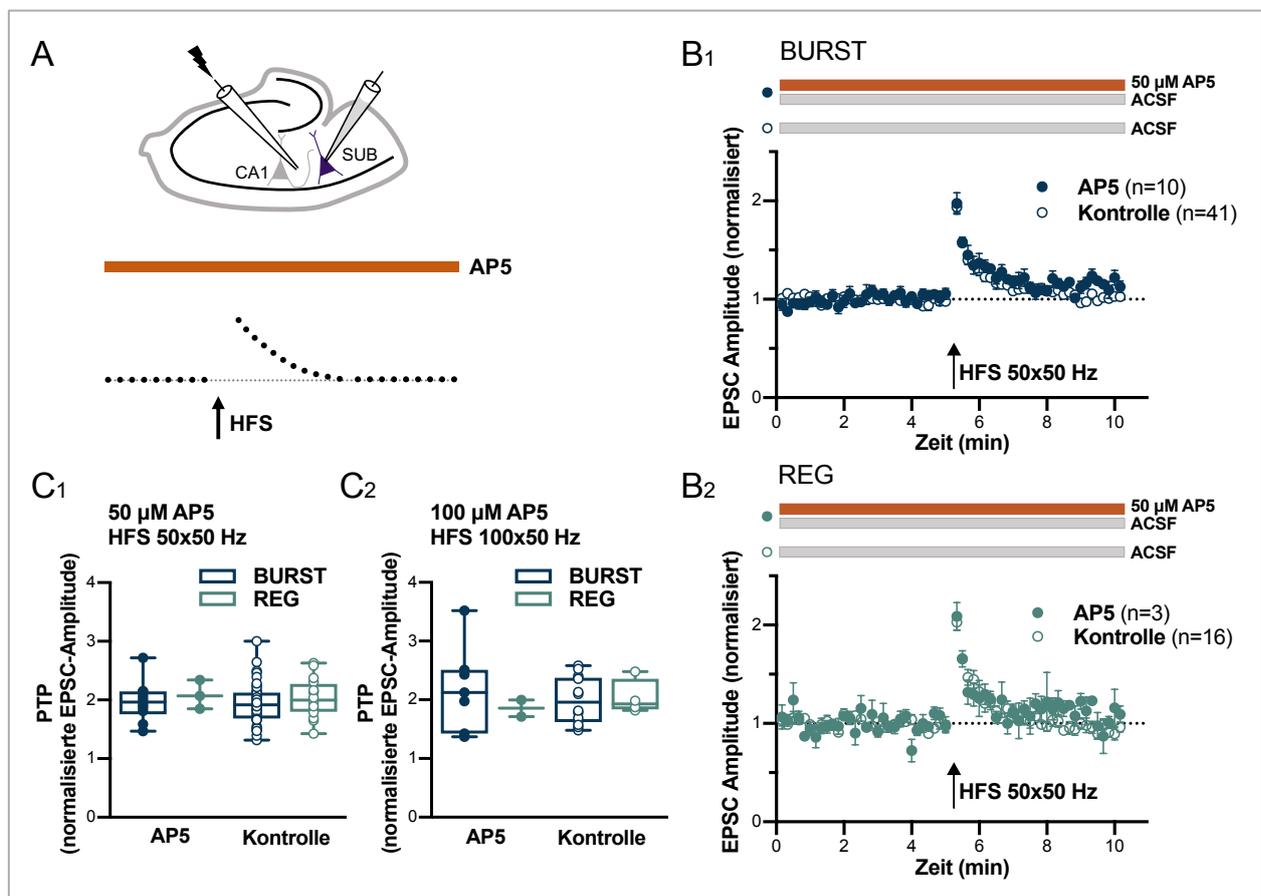


Abbildung 47 PTP unter NMDA-R-Blockade durch AP5 II. **A** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung **B** Gemittelter normalisierter Verlauf der ersten EPSC-Amplitude in 50 μ M AP5 und unter Kontrollbedingungen vor und nach der Hochfrequenzstimulation (HFS) mit 50x50 Hz bei burstenden und regulär feuernden Zellen (BURST **B₁**, REG **B₂**). **C** Ergebnisse der Untersuchungen in 50 μ M AP5 mit einer 50x50 Hz HFS zur Induktion von posttetanischer Potenzierung (PTP) bei BURST und REG (**C₁**; Haupteffekt Zelltyp $p=0,4169$, Haupteffekt Anwendung von AP5 $p=0,7044$, Interaktionseffekt: $p=0,9336$) sowie der Untersuchungen in 100 μ M AP5 mit einer 100x50 Hz HFS zur Induktion von PTP bei BURST und REG (**C₂**; BURST 100 μ M AP5: $n=7$, BURST Kontrolle: $n=14$, REG 100 μ M AP5: $n=2$, REG Kontrolle: $n=4$; Haupteffekt Zelltyp $p=0,5479$, Haupteffekt Anwendung von AP5 $p=0,9842$, Interaktionseffekt: $p=0,4412$). 50x50 Hz = 50 Pulse, Frequenz 50 Hz; 100x50 Hz = 100 Pulse, Frequenz 50 Hz; NMDA-R = NMDA-Rezeptor.

4.7 Untersuchungen zu NMDA-Rezeptor-Subtypen an der CA1-Subikulum-Synapse burstender Zellen

Funktionelle NMDA-R sind Heterotetramere, die sich aus zwei GluN1- und typischerweise zwei GluN2-Untereinheiten zusammensetzen. Durch das Vorhandensein verschiedener GluN2-Untereinheiten ergeben sich unterschiedliche Rezeptor-Subtypen, die sich im Hinblick auf ihr Vorkommen und ihre Rezeptorkinetik unterscheiden und die funktionellen Eigenschaften des Rezeptors bestimmen.^{1,16,113,114} Um zu untersuchen, welche NMDA-R-Subtypen eine Rolle bei der synaptischen Transmission an der CA1-Subikulum-Synapse spielen, wurden Messungen unter Verwendung von NMDA-R-Blockern mit unterschiedlicher NMDA-R-Subtyp-Selektivität durchgeführt. Abbildung 48 zeigt schematisch die Angriffspunkte der drei verwendeten NMDA-R-Blocker: AP5, Ifenprodil und DQP-1105. Weitere Informationen über die verwendeten NMDA-R-Blocker und ihre spezifische biologische Wirkung können der Tabelle im Kapitel 3.7 *Verwendete Lösungen und Pharmaka* des Methodenteils dieser Arbeit entnommen werden.

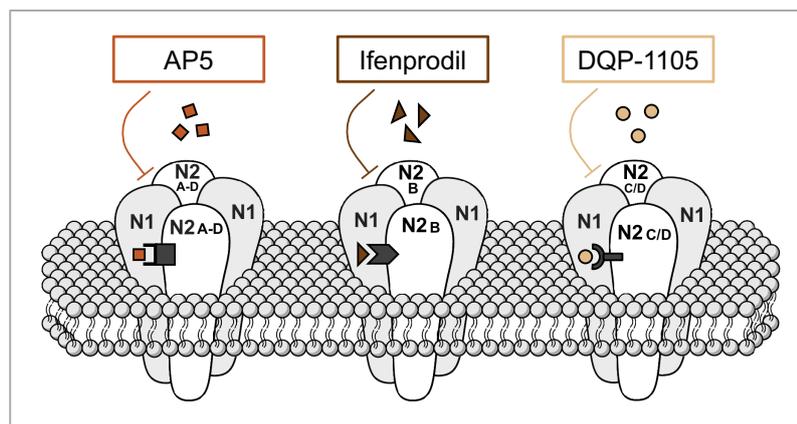


Abbildung 48 NMDA-Rezeptor-Blocker. Schematische Darstellung zur Verdeutlichung der Angriffspunkte der drei verwendeten NMDA-R-Blocker: AP5, Ifenprodil und DQP-1105.

4.7.1 Auswirkungen einer pharmakologischen NMDA-Rezeptor-Blockade auf die synaptische Transmission an der CA1-Subikulum-Synapse

Initial sollte geklärt werden, ob NMDA-R - unabhängig vom NMDA-R-Subtyp - an der basalen synaptischen Transmission an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST und REG beteiligt sind. Dazu erfolgte eine afferente Stimulation der subikulärer Pyramidenzellen mit einem Doppelpulsprotokoll, wobei nach Erfassung einer Basislinie AP5 in einer Konzentration von 100 μM die extrazelluläre Lösung eingebracht wurde. Wie schon erwähnt ist AP5 ein NMDA-R-Antagonist, welcher kompetitiv an die Glutamat-Bindungsstelle der NMDA-R-GluN2-Untereinheiten A-D des NMDA-R bindet.²¹⁷

Es zeigten sich keine offensichtlichen qualitativen Unterschiede bei den durch Stimulation afferenter Eingänge aus der CA1-Region evozierten EPSC von BURST und REG. Bei beiden Zelltypen führte die Applikation von AP5 zu einer Reduktion der EPSC-Amplitude. Anzumerken ist, dass die maximale Ausprägung des Effektes nicht im Zeitfenster der Applikation von AP5 lag, sondern ein Plateau der Effektausprägung stets gegen Ende des Messprotokolls erreicht wurde. Die mittlere EPSC-Amplitude des Plateaus, welchem die letzten 5 Minuten der Messung zugrunde gelegt wurden, betrug bei BURST $77 \pm 3\%$ der mittleren EPSC-Amplitude der Basislinie, was sich als signifikant herausstellte (BL: $-136,99 \pm 9,25$ pA, AP5: $-105,39 \pm 7,34$ pA; $p < 0,001^{***}$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben, $n=6$). Bei REG zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der mittleren EPSC-Amplitude auf $80 \pm 9\%$ der mittleren EPSC-Amplitude der Basislinie, wobei diese nicht signifikant war (BL: $-155,60 \pm 3,81$ pA, AP5: $-123,93 \pm 16,22$ pA; $p=0,1554$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben, $n=3$). Bei BURST ging die Applikation von AP5 nicht mit einer signifikanten Veränderung der Doppelpulsratio einher (BL: $1,15 \pm 0,03$, AP5: $1,18 \pm 0,04$, $p=0,3363$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben, $n=6$). Bei REG zeigte sich ein leichter, signifikanter Abfall der Doppelpulsratio in der Plateauphase des AP5-Effektes (BL: $1,22 \pm 0,07$, AP5: $1,15 \pm 0,06$, $p=0,0250^*$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben, $n=3$). In Abbildung 49 sind der gemittelte normalisierte Verlauf der ersten EPSC-Amplitude und der Doppelpulsratio sowie die erhobenen Messwerte zur mittleren EPSC-Amplitude der Basislinie und der Plateauphase von AP5 ($100 \mu\text{M}$) dargestellt.

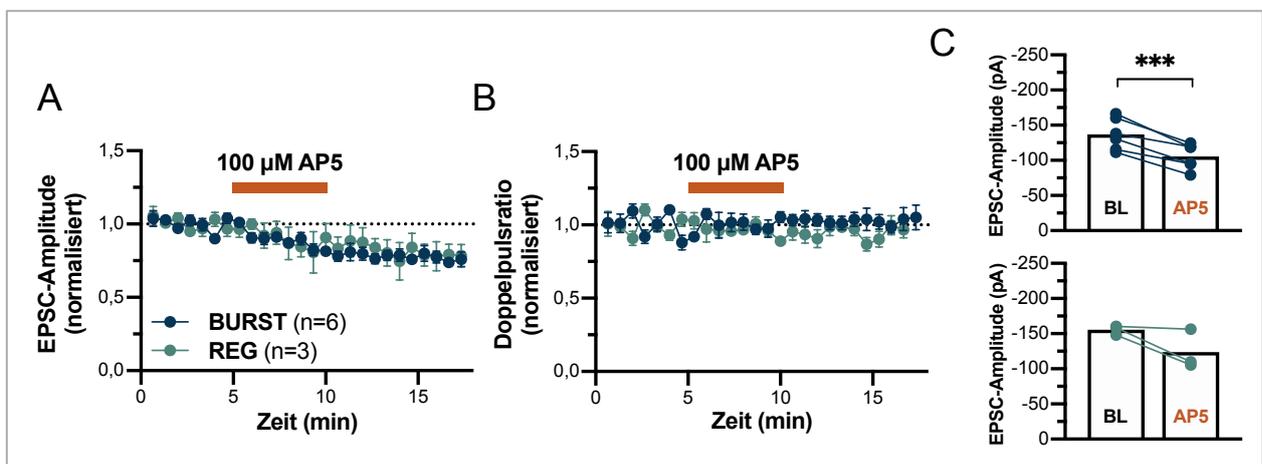


Abbildung 49 Synaptische Transmission unter NMDA-R-Blockade durch AP5. Gemittelter normalisierter Verlauf der ersten EPSC-Amplitude (**A**; Bins von 40 s aus 4 Datenpunkten) und der Doppelpulsratio (**B**; Bins von 40 s aus 4 Datenpunkten) bei burstenden und regulär feuernenden subikulären Pyramidenzellen (BURST, REG) unter Zugabe von $100 \mu\text{M}$ AP5. **C** Gepaarte Ergebnisse der mittleren EPSC-Amplitude der Basislinie (BL) und der Plateauphase bei Applikation von $100 \mu\text{M}$ AP5 bei BURST ($p < 0,001^{***}$) und REG ($p=0,1554$). NMDA-R = NMDA-Rezeptor.

Um zu klären, welche spezifischen NMDA-R-Subtypen für die Verminderung der synaptischen Transmission verantwortlich sind, wurden zwei Substanzen verwendet, die an bestimmten NMDA-R-Subtypen antagonistisch wirken: Ifenprodil und DQP. Wegen des geringen

Stichprobenumfangs bei REG wurde entschieden, sich im Folgenden auf die Ergebnisse der Untersuchung von BURST zu beschränken.

NMDA-R-Subtypen, die GluN2B-Untereinheiten enthalten, werden selektiv durch Ifenprodil nicht-kompetitiv inhibiert.²¹⁸ Unter Ifenprodil in einer Konzentration von 3 μM kam es bei BURST zeitverzögert zur Applikation zu einem Abfall der EPSC-Amplitude mit einem Plateau gegen Ende des Messprotokolls. Die mittlere EPSC-Amplitude des Plateaus, welchem die letzten 5 Minuten der Messung zugrunde gelegt wurden, betrug $83 \pm 4\%$ der mittleren EPSC-Amplitude der Basislinie. Der Unterschied zwischen der mittleren EPSC-Amplitude der Basislinie und der Plateauphase war signifikant (BL: $-154,84 \pm 15,42$ pA, Ifenprodil: $-130,24 \pm 14,67$ pA; $p=0,0037^{**}$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben, $n=10$). Dieser Effekt ging nicht mit einer relevanten Veränderung der Doppelpulsratio einher (BL: $1,26 \pm 0,07$, Ifenprodil: $1,24 \pm 0,06$; $p=0,6988$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben, $n=10$). In Abbildung 50 sind der gemittelte normalisierte Verlauf der ersten EPSC-Amplitude und der Doppelpulsratio sowie die erhobenen Messwerte zur mittleren EPSC-Amplitude der Basislinie und der Plateauphase von Ifenprodil (3 μM) dargestellt.

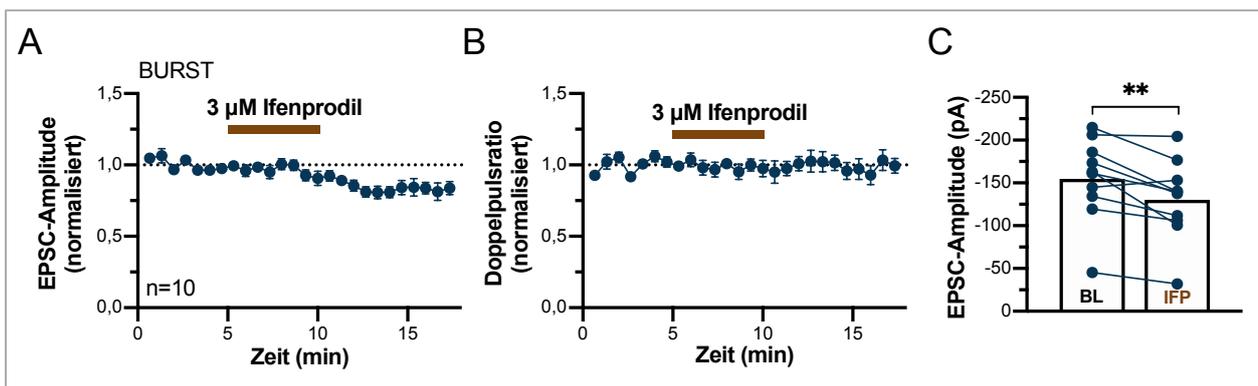


Abbildung 50 Synaptische Transmission unter NMDA-R-Blockade durch Ifenprodil. Gemittelter normalisierter Verlauf der ersten EPSC-Amplitude (**A**; Bins von 40 s aus 4 Datenpunkten) und der Doppelpulsratio (**B**; Bins von 40 s aus 4 Datenpunkten) bei burstenden subikulären Pyramidenzellen (BURST) unter Zugabe von 3 μM Ifenprodil. **C** Gepaarte Ergebnisse der mittleren EPSC-Amplitude der Basislinie (BL) und der Plateauphase bei Applikation von 3 μM Ifenprodil (IFP) bei BURST ($p=0,0037^{**}$). NMDA-R = NMDA-Rezeptor.

DQP-1105 ist ein selektiver NMDA-R-Antagonist, welcher zu einer nicht-kompetitiven Blockade von GluN2C- und GluN2D-Untereinheiten enthaltenden NMDA-R führt.²¹⁹ Unter fünfminütiger Applikation von DQP-1105 in einer Konzentration von 20 μM kam es bei BURST nicht zu einer Verminderung der EPSC-Amplitude (Abbildung 51). Um einen Vergleich mit den anderen beiden Substanzen zu ermöglichen, wurde auch hier ein Plateauwert ermittelt, welchem die letzten 5 Minuten des Messprotokolls zugrunde gelegt wurden. Dieser betrug unter DQP $97 \pm 3\%$ der mittleren EPSC-Amplitude der Basislinie (BL: $-147,76 \pm 23,73$ pA, DQP: $-139,97 \pm 19,61$ pA; $p=0,3697$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben, $n=3$). Ferner kam es nicht zu einer

relevanten Veränderung der Doppelpulsratio (BL: $1,15 \pm 0,11$, DQP: $1,09 \pm 0,16$; $p=0,3860$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben, $n=3$).

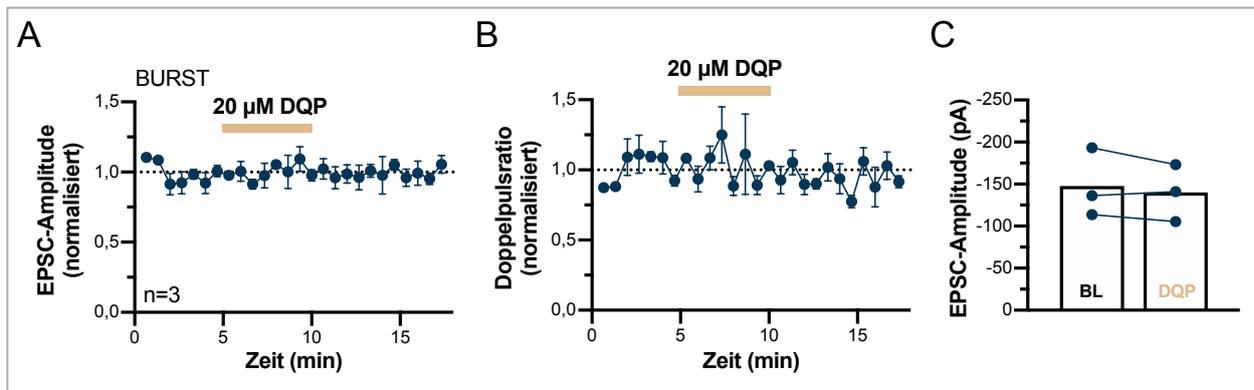


Abbildung 51 Synaptische Transmission unter NMDA-R-Blockade durch DQP. Gemittelter normalisierter Verlauf der ersten EPSC-Amplitude (**A**; Bins von 40 s aus 4 Datenpunkten) und der Doppelpulsratio (**B**; Bins von 40 s aus 4 Datenpunkten) bei burstenden subikulären Pyramidenzellen (BURST) unter Zugabe von 20 µM DQP-1105. **C** Gepaarte Ergebnisse der mittleren EPSC-Amplitude der Basislinie (BL) und der Plateauphase bei Applikation von 20 µM DQP-1105 bei BURST ($p=0,3697$). NMDA-R = NMDA-Rezeptor.

Die Wirkung der drei pharmakologisch aktiven Substanzen zeigte in der statistischen Testung in Bezug auf die EPSC-Amplitude in der Plateauphase keine signifikanten Unterschiede, wobei ein Trend in Richtung eines signifikanten Effektes erkennbar war (AP5: $77 \pm 3\%$ $n=6$, Ifenprodil: $83 \pm 4\%$ $n=10$, DQP: $97 \pm 3\%$ $n=3$; $p=0,0600$, einfaktorische ANOVA für unabhängige Stichproben; Abbildung 52).

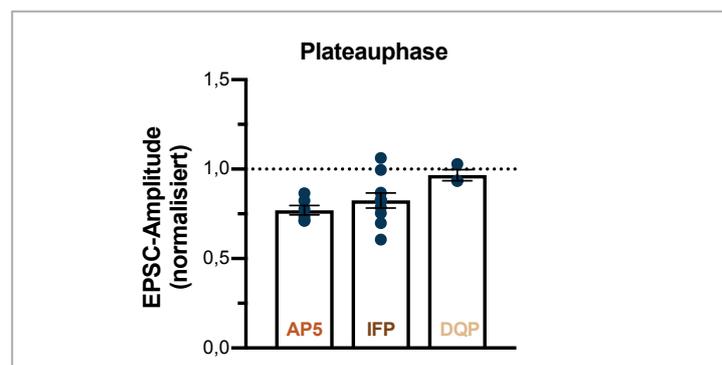


Abbildung 52 Vergleich AP5, Ifenprodil und DQP. Vergleich der Werte der normalisierten mittleren EPSC-Amplituden in der Plateauphase von 100 µM AP5 ($n=6$), 3 µM Ifenprodil (IFP, $n=10$) und 20 µM DQP-1105 ($n=3$) bei burstenden subikulären Pyramidenzellen ($p=0,0600$).

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass eine NMDA-R-Blockade durch AP5 in einer Konzentration von 100 µM eine Verminderung der synaptischen Transmission an der CA1-Subikulum-Synapse bei BURST und REG bewirkte. Weiterhin führte eine selektive Blockade von GluN2B-NMDA-R-Subtypen durch Ifenprodil ebenfalls zu einer Verminderung der

synaptischen Transmission an der CA1-Subikulum-Synapse burstender Zellen. Warum die Effekte von Ifenprodil zeitverzögert auftraten, konnte nicht abschließend geklärt werden. Eine Verzögerung beim Applikationsvorgang konnte durch Adjustierung und Überwachung des zuführenden Systems (peristaltische Schlauchpumpe, Perfusionsschläuche) ausgeschlossen werden. NMDA-R-Subtypen, die GluN2C- oder GluN2D-Untereinheiten enthalten, schienen an der synaptischen Transmission an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST nicht relevant beteiligt zu sein. Insgesamt entstand der Eindruck, dass die Blockade von GluN2B-NMDA-R-Subtypen durch Ifenprodil die Wirkung von AP5 in großen Anteilen erklären könnte. Daraus, dass die Effekte von AP5 gegenüber Ifenprodil zügiger einsetzten, könnte abgeleitet werden, dass ferner GluN2A-NMDA-R-Subtypen enthaltende Rezeptoren eine Rolle an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST spielen könnten. Die fehlende Veränderung der Doppelpulsratio nach Applikation von AP5 und Ifenprodil könnte als ein Hinweis auf eine postsynaptische Lokalisation der durch diese Substanzen inhibierten NMDA-R gedeutet werden.

4.7.2 Auswirkungen von AP5 und Ifenprodil auf NMDA-Rezeptor-Ströme

Um die Wirksamkeit der durch AP5 und Ifenprodil induzierten NMDA-R-Blockade an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST zu quantifizieren, wurde die direkte Wirkung von beiden Substanzen auf NMDA-EPSC erfasst. NMDA-EPSC wurden bei einem depolarisierten Membranpotential von +40 mV und unter pharmakologischer Blockade von AMPA-R und Kainat-R durch NBQX induziert. Die Messung unter einem depolarisierten Membranpotential von +40 mV gewährleistete dabei die vollständige Dissoziation des spannungsabhängigen Magnesiumblocks. Die Verwendung einer cäsiumhaltigen intrazellulären Lösung ermöglicht eine stabile Messung bei einem derart depolarisierten Membranpotential. Ein Nachteil dieser Lösung ist jedoch, dass das zelluläre elektrophysiologische Entladungsverhalten nicht erhoben werden kann. Aus diesem Grund wurden sogenannte *Repatch*-Experimente durchgeführt. Im ersten Schritt wurde dafür das charakteristische Entladungsverhalten unter Verwendung einer Kalium-haltigen Pipettenlösung ermittelt. Schließlich wurde die Messpipette von der Zellmembran gelöst und durch eine mit einer Cäsium-haltigen Pipettenlösung gefüllte Messpipette ersetzt. In einem zweiten Schritt konnten so die NMDA-EPSC derselben, zuvor elektrophysiologisch charakterisierten subikulären Pyramidenzelle bei einem auf +40 mV gehaltenen Membranpotential gemessen werden. Abbildung 53 zeigt beispielhaft zwei repräsentative Messungen sowie den gemittelten normalisierten Verlauf der NMDA-EPSC-Amplitude vor und während der pharmakologischen NMDA-R-Blockade durch AP5 und Ifenprodil.

Unter AP5 in einer Konzentration 100 μM kam es zu einem zügigen Abfall der NMDA-EPSC-Amplitude, die nach ca. 5 Minuten ein Plateau erreichte. Dem Messwert für das Plateau wurde hier und im Folgenden die mittlere NMDA-EPSC-Amplitude in den letzten 5 Minuten der Messung zugrunde gelegt. Die mittlere NMDA-EPSC-Amplitude in der Plateauphase reduzierte sich unter AP5 im Mittel auf $24 \pm 6\%$ der mittleren NMDA-EPSC-Amplitude der Basislinienmessung (BL: $94,83 \pm 26,76$ pA, Plateau: $17,81 \pm 2,59$ pA; $p=0,0095^{**}$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben; $n=4$).

Ifenprodil in einer Konzentration von 3 μM führe zu ebenfalls zu einer Verminderung der mittleren NMDA-EPSC-Amplitude, wobei sich der Abfall, verglichen mit AP5, langsamer vollzog. Stabile Werte wurden erst nach ca. 19 Minuten erreicht, weshalb das ursprüngliche Messprotokoll zur Erfassung des Plateaus um 5 Minuten verlängert wurde. Bei Ifenprodil zeigte sich eine signifikante Verminderung der NMDA-EPSC-Amplitude in der Plateauphase auf $47 \pm 4\%$ der mittleren NMDA-EPSC-Amplitude der Basislinienmessung (BL: $134,12 \pm 66,79$ pA, Plateau: $66,26 \pm 35,50$ pA; $p=0,0014^{**}$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben; $n=5$).

Der Abfall der NMDA-EPSC-Amplitude in der Plateauphase war unter AP5 signifikant stärker ausgeprägt als unter Ifenprodil (AP5: $24 \pm 6\%$ $n=4$, Ifenprodil: $47 \pm 4\%$ $n=5$; $p=0,0098^{**}$, t-Test für unabhängige Stichproben).

Abschließend lässt sich feststellen, dass es sowohl unter AP5 (100 μM) als auch unter Ifenprodil (3 μM) zu einer deutlichen Reduktion der NMDA-EPSC-Amplitude kam. Anhand der Ausprägung der Effekte von AP5 und Ifenprodil lässt sich rückschließen, dass GluN2B-Untereinheiten enthaltende NMDA-R-Subtypen die hier untersuchten Strömen in einem relevanten Anteil - jedoch nicht ausschließlich - zu vermitteln scheinen. Dies bestärkt, unter Einbeziehung der vorhergehenden Befunde, die These, dass es sich bei den, an der an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST vorkommenden NMDA-R um GluN2A- und GluN2B-Untereinheiten enthaltende NMDA-R-Subtypen handelt.

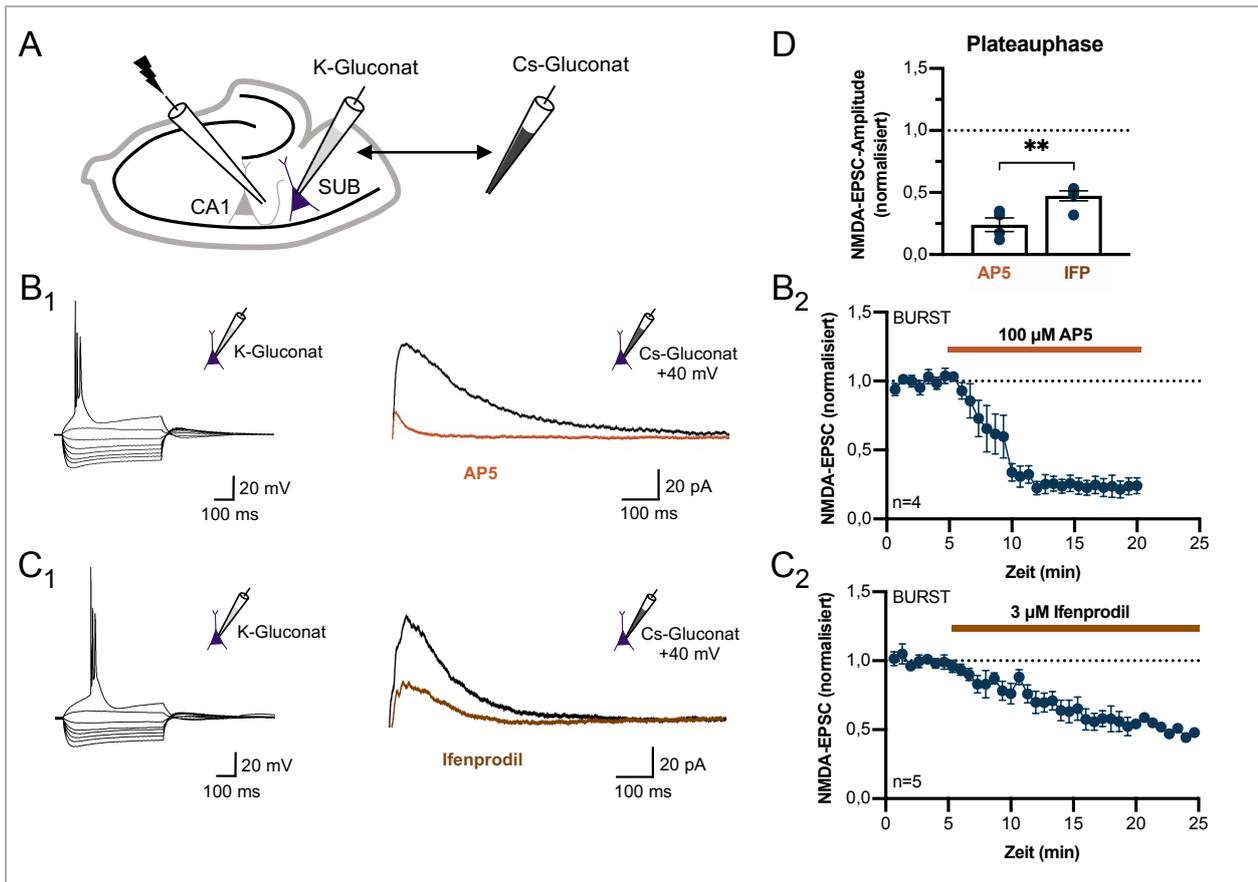


Abbildung 53 Repatch-Experimente unter NMDA-R-Blockade durch AP5 und Ifenprodil. **A** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung der *Repatch*-Experimente. **B₁, C₁** Repräsentative Beispiele der initialen elektrophysiologischen Charakterisierung unter Verwendung einer Kalium-Gluconat-Lösung (K-Gluconat) und der anschließenden Erfassung von NMDA-EPSC in An- und Abwesenheit von AP5 und Ifenprodil (IFP) bei einem Membranpotential von +40 mV unter Verwendung einer Cäsium-Gluconat-Lösung (Cs-Gluconat) bei burstenden subikulären Pyramidenzellen (BURST). **B₂, C₂** Mittlerer normalisierter Verlauf der NMDA-EPSC-Amplitude vor und während der pharmakologischen NMDA-Rezeptor-Blockade durch AP5 und Ifenprodil bei BURST. Bins von 40 s aus zwei Datenpunkten. **D** Vergleich der Ergebnisse der mittleren normalisierten NMDA-EPSC-Amplituden in der Plateauphase von 100 µM AP5 und 3 µM Ifenprodil (IFP) bei BURST ($p=0,0098^{**}$). NMDA-R = NMDA-Rezeptor.

4.8 Feldpotentialmessungen zur Untersuchung der Auswirkungen einer pharmakologischen Blockade von NMDA-Rezeptoren an Schaffer-Kollateral-CA1-Synapsen

Der bereits beschriebene primäre Schaltkreis durch die hippocampale Formation beinhaltet unter anderem die Projektion der als Schaffer-Kollaterale bezeichneten Axone der CA3-Pyramidenzellen zu Pyramidenzellen des CA1-Areals, welche wiederum mit ihren Axonen das Subikulum erreichen.¹ Um einen Eindruck über die Auswirkungen einer pharmakologischen Blockade von NMDA-R in der CA1-Region zu gewinnen, wurden extrazelluläre Feldpotentiale in diesem Areal abgeleitet. Feldpotentiale sind das extrazelluläre Gegenstück der an einzelnen Nervenzellen erfassten EPSP und spiegeln die an den Postsynapsen der abgeleiteten

Nervenzellpopulation ablaufenden Vorgänge wider. Eine Stimulation der Axone der Pyramidenzellen des CA3-Areals mit fünf Pulsen mit einer Frequenz von 50 Hz führte zur Erzeugung messbarer Feldpotentiale. Die Stimulationsstärke wurde so adjustiert, dass 70% der maximalen fEPSP-Amplitude erreicht wurden. Die Effekte einer NMDA-R-Inhibition auf die fEPSP der Schaffer-Kollateral-CA1-Synapsen wurde nach Aufzeichnung einer zwanzigminütigen Basislinie (gekennzeichnet als „BL“) durch Zugabe von AP5 in einer Konzentration von 50 μM über einen Zeitraum von 20 Minuten ermittelt. Die Auswirkungen von AP5 auf die mittlere fEPSP-Steigung sowie die mittlere fEPSP-FWHMA wurden dabei im Zeitraum zwischen 5 Minuten nach AP5-Applikation bis 5 Minuten nach Beendigung der AP5-Applikation erfasst (gekennzeichnet als „+AP5“). Den Werten für die mittlere fEPSP-Steigung sowie die mittlere fEPSP-FWHMA nach Auswaschen von AP5 aus der extrazellulären Lösung wurde der Messabschnitt ab 15 Minuten nach Beendigung der AP5-Applikation zugrunde gelegt (gekennzeichnet als „-AP5“). Abbildung 54 zeigt das Ergebnis einer repräsentativen Messung sowie Darstellungen des gemittelten normalisierten Verlaufs einzelner erfasster Parameter über den Messzeitraum.

Ein reversibler Abfall der mittleren fEPSP-Steigung auf $94 \pm 2\%$ unter AP5 mit einem Rückgang des Effektes nach Beendigung der Applikation auf $99 \pm 3\%$ der mittleren fEPSP-Steigung der Basislinie wurden sichtbar. Der Unterschied in der mittleren fEPSP-Steigung zwischen AP5 und der Basislinie zeigte sich in der statistischen Testung signifikant (BL: $-0,21 \pm 0,03$ mV/ms, +AP5: $-0,20 \pm 0,03$ mV/ms; $p=0,0395^*$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben; $n=5$). Die Ratio der fEPSP-Steigung zwischen dem ersten fEPSP und dem fünften fEPSP fiel unter AP5 und auch nach Beendigung der Applikation im Mittel leicht von den Werten der Basislinie ab, wobei sich der Unterschied zwischen AP5 und der Basislinie als signifikant herausstellte (BL: $0,48 \pm 0,07$, +AP5: $0,47 \pm 0,07$; $p=0,0466^*$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben; $n=5$). Unter AP5 traten verglichen mit der Basislinie keine signifikanten Veränderungen der mittleren fEPSP-Breite gemessen an der FWHMA (BL: $9,03 \pm 1,08$ ms, +AP5: $9,10 \pm 1,02$ ms; $p=0,5400$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben; $n=5$) oder der mittleren FWHMA-Ratio zwischen dem ersten fEPSP und dem fünften fEPSP (BL: $1,01 \pm 0,11$, +AP5: $0,98 \pm 0,11$; $p=0,1113$, Ratio-t-Test für abhängige Stichproben; $n=5$) auf. Die *Fiber-Volley*-Amplitude als Maß für das Erreichen der abgeleiteten Zielregion durch die afferente Stimulation zeigte sich während der gesamten Messdauer unverändert (BL: $-0,12 \pm 0,03$ mV, +AP5: $-0,11 \pm 0,03$ mV, -AP5: $-0,11 \pm 0,03$ mV). Insgesamt konnte bei den Untersuchungen ein signifikanter negativer Effekt von AP5 auf die Steigung der im CA1-Areal abgeleiteten Feldpotentiale gezeigt werden. Die Ratio der fEPSP-Steigung zwischen dem ersten fEPSP und dem fünften fEPSP fiel unter AP5 signifikant von den Werten der Basislinie ab. Letzteres könnte als erster Hinweis für einen präsynaptischen Ursprung des Effektes von AP5 auf die fEPSP-Steigung gewertet werden, wobei die Beständigkeit dieses Effektes in weiteren Messungen überprüft werden sollte.

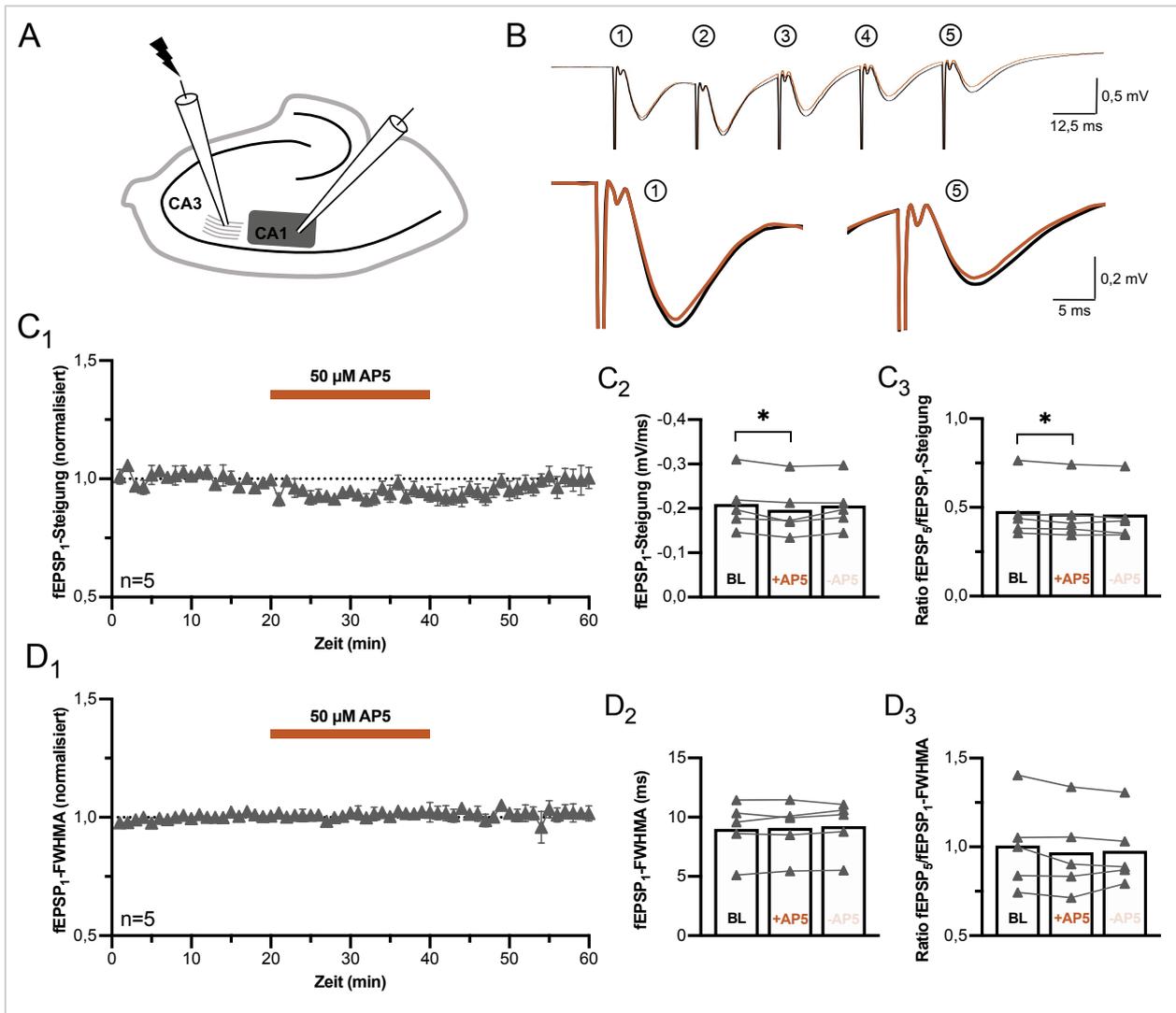


Abbildung 54 Feldpotentialmessungen in der CA1-Region. **A** Schematische Darstellung der Versuchsanordnung. **B** Repräsentatives Beispiel für die mittleren gemessenen Feldpotentiale unter 50 μM AP5 (grau) und Kontrollbedingungen (schwarz). **C**, **D** Mittler normalisierter Verlauf der fEPSP₁-Steigung (**C**₁) und der fEPSP₁-FWHMA (**D**₁) sowie Ergebnisse des gepaarten Vergleichs zwischen unterschiedlichen Messphasen (siehe Text) in Bezug auf die genannten Parameter sowie die korrespondierende fEPSP₁/fEPSP₅-Ratio. **C**₂ fEPSP₁-Steigung BL versus +AP5: $p=0,0395^*$. **C**₃ fEPSP₁/fEPSP₅-Steigung-Ratio BL versus +AP5: $p=0,0466^*$. **D**₂ fEPSP₁-FWHMA BL versus +AP5: $p=0,5400$. **D**₃ fEPSP₁/fEPSP₅-FWHMA-Ratio BL versus +AP5: $p=0,1113$.

5 Diskussion

Zwei durch ihr spezifisches Entladungsverhalten charakterisierte Pyramidenzelltypen im Subikulum der Maus wurden im Hinblick auf ihre Membraneigenschaften, ihre Spontanaktivität, ihre dendritische Morphologie sowie die Ausprägung von Kurzzeitplastizität an der CA1-Subikulum-Synapse untersucht. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass sich BURST und REG in einigen, die Membraneigenschaften betreffenden Parametern, jedoch nicht in den erhobenen Parametern der dendritischen Morphologie oder der Spontanaktivität signifikant unterschieden. In Bezug auf die PTP als einer Form der Kurzzeitplastizität wurden keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gefunden. Ferner hatte die pharmakologische Blockade von NMDA-R bei beiden Typen subikulärer Pyramidenzellen keinen Einfluss auf die Ausprägung der PTP, führte jedoch zu einer relevanten Verminderung der synaptischen Transmission an der CA1-Subikulum-Synapse. Letzteres beruhte in den hier vorgestellten Untersuchungen bei BURST vermutlich auf der Blockade postsynaptisch lokalisierter GluN2A- und GluN2B-Untereinheiten enthaltender NMDA-R-Subtypen. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit mit anderen Veröffentlichungen verglichen und die Limitationen der verwendeten Methoden diskutiert werden.

5.1 Zelltypspezifisches Entladungsverhalten subikulärer Pyramidenzellen

Wie in zahlreichen Veröffentlichungen vorbeschrieben, konnten im Rahmen depolarisierender somatischer Strominjektionen bei subikulären Pyramidenzellen zwei unterschiedliche Entladungsmuster beobachtet werden: Burstende Entladungen und Einzelentladungen in Form zeitlich voneinander separierter Aktionspotentiale.^{77-82,98} Im Rahmen dieser Arbeit gelang es für die hier untersuchte Zellpopulation ein objektives Kriterium zur zuverlässigen Differenzierung zwischen BURST und REG zu ermitteln. Unter Zuhilfenahme des initialen IAPI als quantitatives Klassifikationskriterium wurden so die insgesamt 369 untersuchten subikulären Pyramidenzellen entweder der Gruppe der BURST (initiales IAPI <25 ms) oder der REG (initiales IAPI \geq 25 ms) zugeordnet. In Übereinstimmung mit zahlreichen früheren Veröffentlichungen überwog in dieser Arbeit der Anteil der als BURST klassifizierten Zellen (BURST: 77,5%; REG: 22,5%). In der Vergleichsliteratur zeigt sich jedoch eine große Variationsbreite des Verhältnisses von BURST (37%-100%) zu REG (0%-63%) im Subikulum.^{46-48,77-84,93,98,101,102,106,177,220,221} Zu erwähnen sind hier eine Veröffentlichung von Donatella Mattia et al. (1993), in welcher ausschließlich BURST detektiert wurden sowie Untersuchungen von Liset Menendez de la Prida et al. (2003), Yujin Kim und Nelson Spruston (2012) sowie Austin Graves et al. (2016) bei welchen der Anteil an REG gegenüber BURST

leicht überwog.^{48,77,83,90} Die große Variabilität könnte sich dadurch erklären lassen, dass die Untersuchungen zum Teil fokussiert auf unterschiedliche Bereiche des Subikulums durchgeführt wurden, wobei bekannt ist, dass die Verteilung der subikulären Pyramidenzelltypen innerhalb des Subikulums variiert (siehe Kapitel 1.3.3 *Zelltypspezifische Verteilung*).^{48,78,86,98} Um Stichprobenverzerrungen durch Verteilungsgradienten zu vermeiden, wurden die in dieser Arbeit untersuchten subikulären Pyramidenzellen ungeachtet ihrer Lage auf den räumlichen Achsen des Subikulums ausgewählt. Eine andere Ursache könnten Klassifikationsfehler aufgrund einer „Maskierung“ des burstenden Entladungsverhaltens bei Depolarisation des Membranpotentials sein, wobei dieses Phänomen einer depolarisationsbedingten Veränderung des Entladungsverhaltens in anderen Studien nicht reproduziert werden konnte (siehe Kapitel 1.3.1 *Burstende und regulär feuernde Zellen*).^{77,78,80,82,83,89}

Unabhängig von der Häufigkeit des Auftretens von oder eventuellen Einflussfaktoren auf burstendes Entladungsverhalten, kann davon ausgegangen werden, dass diese elektrophysiologische Eigenschaft Auswirkungen auf die Signalübertragung hat. Es wird angenommen, dass die durch das burstende Entladungsverhalten erhöhte Wahrscheinlichkeit der präsynaptischen Freisetzung von Neurotransmittern zu einer effizienteren Informationsweiterleitung führt.⁹⁴⁻⁹⁶ Außerdem wird vermutet, dass multiple Aktionspotentiale aus burstenden Entladungen in die Dendriten zurücklaufen (engl. *backpropagating actionpotentials*) und dort stärker Einfluss auf synaptische Integration und synaptische Plastizität nehmen könnten als ein einzelnes Aktionspotential.^{78,97}

Neben der angenommenen funktionellen Relevanz des unterschiedlichen Entladungsverhaltens von BURST und REG stellt sich die Frage, ob diese Heterogenität das Vorhandensein verschiedener Zelltypen oder die Existenz lediglich eines einzelnen Zelltyps mit variabler Erregbarkeit widerspiegelt.^{78,86,88,98,99}

5.2 Membraneigenschaften

Bis heute besteht Uneinigkeit über mögliche Unterschiede in den elektrophysiologischen Eigenschaften der beiden subikulären Pyramidenzelltypen. Für diese Arbeit wurden die Parameter der aktiven und passiven Membraneigenschaften von 75 subikulären Pyramidenzellen (BURST: n=54, REG: n=21) unter Kontrollbedingungen ermittelt.

BURST zeigten gegenüber REG erwartungsgemäß eine signifikant höhere Aktionspotential-Frequenz an der Rheobase. In Übereinstimmung mit anderen Studien zeigten REG eine signifikant stärkere Frequenzadaptation als BURST, wobei der absolute Wert für den mittleren Frequenz-Adaptations-Index bei REG mit knapp 74% vergleichsweise hoch, also die

Frequenzadaptation vergleichsweise gering ausfiel.^{77,81,85,102,106} Dies könnte beispielsweise darin begründet liegen, dass die Experimente in dieser Arbeit unter Raumtemperatur und nicht wie in den Untersuchungen der Vergleichsliteratur bei circa 33 °C durchgeführt wurden. Insgesamt könnte dieses Ergebnis auf Unterschiede bei den an der Aktionspotential-Erzeugung beteiligten Ionenkanal-Subtypen von REG und BURST hindeuten. Der Vergleich der Eigenschaften der initialen Aktionspotentiale an der Rheobase ergab, dass die Aktionspotentiale bei BURST gegenüber REG signifikant früher im Verlauf der Strominjektion auftraten, hyperpolarisiertere Schwellenpotentiale aufwiesen und steilere maximale Anstiegssteigungen zeigten. Diese Ergebnisse stimmen mit den 2012 von Yujin Kim und Nelson Spruston veröffentlichten Ergebnissen überein.⁴⁸ In einigen anderen Untersuchungen wurden jedoch derartige Unterschiede zwischen BURST und REG nicht detektiert.^{78,79,81,88,106} Sag-Potentiale und Rebound-Depolarisationen werden durch bei Hyperpolarisation aktivierte Kationenleitfähigkeiten (I_h -Ströme über HCN-Kanäle) vermittelt.^{99,222} In einigen Veröffentlichung sowie bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigten beide subikulären Pyramidenzelltypen ausgeprägte Sag-Potentiale und Rebound-Depolarisationen, wobei diese zwischen BURST und REG in ihrer Ausprägung keine signifikanten Unterschiede aufwiesen.^{78,79,81} In zahlreichen Vergleichsuntersuchungen anderer Autoren wurden Sag-Potentiale jedoch ausschließlich oder in signifikant größerer Ausprägung bei BURST gegenüber REG gemessen. Ähnliches galt auch für die Rebound-Depolarisationen.^{48,77,80,82,84,98,99,106,221} In Bezug auf die passiven Membraneigenschaften wiesen BURST gegenüber REG einen signifikant niedrigeren Eingangswiderstand sowie eine signifikant kürzere Membran-Zeit-Konstante auf. Die Befunde zeigten sich damit analog zu den Ergebnissen mehrerer früherer Veröffentlichungen.^{48,77,80,82,84,88,90,98,99,221} Andere Autoren konnten hingegen keine signifikanten zelltypspezifischen Unterschiede bei den passiven Membraneigenschaften finden.^{46,78,79,101} Was die Ursache für so unterschiedliche und teils auch konträre Befunde der verschiedenen Arbeitsgruppen ist, bleibt unklar. Erschwert wird ein valider Vergleich von Ergebnissen, da den Untersuchungen oft unterschiedliche Messwertdefinitionen zugrunde gelegt wurden. Ferner wird eine Vergleichbarkeit durch Unterschiede im präexperimentellen und experimentellen *Setting* eingeschränkt. Bei vielen Veröffentlichungen gibt es beispielsweise Unterschiede bei der Präparations-, Lagerungs- und Messmethode, der Zusammensetzung der verwendeten Lösungen oder der Temperatur, unter der die Messungen stattfanden. Neben den vielen Vorteilen der Patch-Clamp-Technik resultiert aus dem sehr komplexen methodischen Vorgehen auch eine hohe Störanfälligkeit. Insbesondere werden die neuronalen Zellen in den Hirnschnitten zwangsläufig unnatürlichen mechanischen Reizen sowie hypoxischem Stress ausgesetzt. Bisher ist auch nicht geklärt, ob und wenn ja in welchem Ausmaß Unterschiede zwischen verschiedenen Versuchstierspezies bestehen. In den meisten Fällen wurden die hier

zitierten Studien *in vitro* an Ratten durchgeführt, wohingegen die hier dargestellten Befunde in Hirnschnitten von männlichen Mäusen erhoben wurden.

Insgesamt zeigten sich zwar Unterschiede in den elektrophysiologischen Eigenschaften von BURST und REG, jedoch war abgesehen von der Fähigkeit burstende Entladungen zu erzeugen, keiner der untersuchten Parameter eigens für einen der beiden Typen subikulärer Pyramidenzellen charakteristisch und damit für eine unterscheidende Kategorisierung geeignet.

5.3 Spontanaktivität

Spontane synaptische Entladungen entstehen in Abwesenheit einer extra- oder intrazellulären Stimulation durch spontane Freisetzung von Neurotransmittern aus synaptischen Vesikeln. Ein großer Vorteil der Untersuchung spontaner synaptischer Ströme (gegenüber evozierten synaptischen Strömen) ist, dass sowohl präsynaptische als auch postsynaptische Mechanismen neuronaler Interaktionen untersucht werden können. Die sEPSC-Frequenz bildet vor allem präsynaptische Faktoren (Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung, Anzahl synaptischer Verbindungen) ab. Die sEPSC-Amplituden hingegen repräsentieren die Ansprechbarkeit und Dichte der postsynaptischen Rezeptoren.^{124,210,223} Im Hinblick auf die mittlere Frequenz der Spontanaktivität, die sEPSC-Amplitude sowie die weiteren erhobenen Parameter der sEPSC-Kinetik zeigten sich bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zwischen REG und BURST. Bei Betrachtung der kumulativen Verteilungsfunktionen aller bei BURST und REG ausgewerteten sEPSC zeigte sich bei BURST eine Verlagerung der Verteilung in Richtung einer längeren Anstiegszeit, einer größeren Breite und einer geringeren maximalen An- und Abstiegssteigung der sEPSC. Ob es sich hierbei um einen Zufallsbefund oder einen Hinweis auf Unterschiede in der Ansprechbarkeit oder Dichte postsynaptischer Rezeptoren bei BURST und REG handelt, bedarf weiterer Untersuchungen.

5.4 Dendritische Morphologie

Die Dendriten sind hochkomplexe neuronale Strukturen und für die Kommunikation von Nervenzellen essenziell. Wie nicht anders zu erwarten, besteht insbesondere hier eine enge Beziehung zwischen Morphologie und Funktion. In der Architektur des dendritischen Systems spiegelt sich ein Optimierungsvorgang wider, welcher zum einen den Nutzen einer möglichst schnellen Signalweiterleitung bei zum anderen gleichsam geringen „Materialkosten“ für dendritische Vernetzung berücksichtigt.²¹³ Ferner konnte in Modellierungsstudien gezeigt werden, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften einer Nervenzelle in einem hohen Grad

von der zellulären Morphologie beeinflusst werden können. Innerhalb dieser Modelle erhöhte sich beispielsweise bei Zunahme der dendritischen Membranoberfläche die Tendenz der Nervenzelle, ein burstendes Entladungsverhalten zu zeigen.²¹⁴ Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die dendritische Struktur von subikulären Pyramidenzellen vom Zelltyp BURST und REG miteinander verglichen.

Bei Betrachtung der gefärbten Zellen unter dem Mikroskop fielen keine morphologischen Unterschiede zwischen den beiden zuvor elektrophysiologisch charakterisierten Typen subikulärer Pyramidenzellen auf. Der lange apikale Dendritenbaum zog sich durch das Stratum moleculare und reichte oft bis zur Fissura hippocampalis, während sich die multiplen basalen Dendriten innerhalb des Stratum pyramidale ausbreiteten. Oft konnten an den dendritischen Ausläufern *Spines* sichtbar gemacht werden.

In der Sholl-Analyse von sieben Parametern (Summe Schnittpunkte, mittlere Schnittpunktzahl, maximale Schnittpunktzahl, schließender Radius, Radius mit der maximalen Schnittpunktzahl, Regressionskoeffizient) konnte kein Hinweis auf einen signifikanten Unterschied in der apikalen oder basalen dendritischen Struktur der beiden subikulären Zelltypen gefunden werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen der im Rahmen anderer Arbeiten durchgeführten Sholl-Analysen an Dendriten von BURST und REG überein.^{46,78,101} Bei der Analyse dreier weiterer Parameter auf Basis der Dendritenrekonstruktionen (Anzahl Dendritenäste, mittlere Kontraktion, Gesamtlänge Dendritenäste) ließen sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen BURST und REG feststellen. Auch in der Vergleichsliteratur wurde vielfach beschrieben, dass Zellsomata, Dendriten und Axone beider Pyramidenzelltypen ähnliche morphologische Charakteristika aufweisen.^{46,47,77-79,82,98,101,103,104} In drei Veröffentlichungen wurde eine größere Entfernung von Soma zu dem ersten Hauptverzweigungspunkt des apikalen Dendriten bei BURST gegenüber REG beschrieben.^{47,88,98} Dieser Unterschied könnte jedoch auf die unterschiedliche Position der Zellen im Stratum pyramidale, bezogen auf die Entfernung von der Fissura hippocampalis, zurückzuführen sein.^{7,47,98} In der Arbeit von Elana Harris et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass das Muster der dendritischen und axonalen Verzweigungen besser mit der Position der Zellsomata innerhalb der subikulären Zellschicht, als mit dem Entladungsverhalten der subikulären Pyramidenzelltypen (BURST, REG) korrelierte.⁴⁷ Aufgrund der erheblichen Ähnlichkeit aller anderen dendritischen morphologischen Parameter in dieser und anderen Arbeiten ist jedoch nicht davon auszugehen, dass die dendritische Morphologie das Entladungsverhalten subikulärer Pyramidenzellen entscheidend zu bestimmen scheint.

Die meisten der hier zitierten Studien zur Morphologie subikulärer Pyramidenzellen wurden an Hirnschnitten von Ratten durchgeführt. Während viele afferente und efferente subikuläre Projektionen artübergreifend konserviert zu sein scheinen, sind auch einige subtile Unterschiede beschrieben worden.^{38,39}

An dieser Stelle sollen ferner kurz die allgemeinen Limitationen der bei der Zellfärbung und der Rekonstruktion angewandten Methoden diskutiert werden. Zunächst besteht die Möglichkeit, dass der Dendritenbaum nicht vollständig im horizontalen Hirnschnitt liegt, so dass Dendritenbäume angeschnitten und so nicht vollständig erfasst werden. Ein ähnlich kritischer Punkt ist die suffiziente Füllung der Zellen, die von der Diffusion der Pipettenlösung in alle Zellausläufer abhängt. Nicht zuletzt besteht insbesondere bei der manuellen Dendritenrekonstruktion eine hohe sogenannte *Interobserver-Variabilität*, wobei sich die Untersucherabhängigkeit durch die Verwendung softwarebasierter *Tracing*-Methoden, wie sie hier verwendet wurden, verringern lässt. Die genannten Schwierigkeiten treten jedoch bei BURST und REG in gleichem Maße auf, so dass sie bei einem ausreichenden Stichprobenumfang keinen Einfluss auf die Detektion möglicher Unterschiede zwischen beiden Zelltypen haben sollten. Natürlich besteht ferner immer die Möglichkeit, dass es einen Unterschied im Phänotyp der dendritischen Architektur von BURST und REG gibt, der durch die für diese Arbeit zur Analyse ausgewählten Parameter nicht erfasst wird.

5.5 Korrelationsanalyse, Clusteranalysen und Hauptkomponentenanalysen

Eine Korrelationsanalyse wurde durchgeführt, um die Größe und Richtung der statistischen Beziehung zwischen Parametern der Membraneigenschaften, der Spontanaktivität, sowie der dendritischen Morphologie zu erfassen. In der Korrelationsanalyse fiel ein ausgeprägter negativer Zusammenhang zwischen dem Eingangswiderstand und der Länge und Komplexität der apikalen und basalen Dendritenbäume auf, welcher bereits für Pyramidenzellen im zerebralen Kortex beschrieben.^{224,225} Dieser Befund könnte sich durch die Vergrößerung der Gesamtoberfläche einer Nervenzelle mit Zunahme der dendritischen Membranoberfläche erklären lassen. Weiterhin waren das Sag-Potential und der schließende Radius der Sholl-Analyse apikaler Dendriten stark positiv miteinander korreliert. Interessant ist dieser Befund, da die Amplitude des Sag-Potentials die Aktivierung von unspezifischen Kationenkanälen, die als HCN-Kanäle (engl. *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*) bezeichnet werden, abbildet. Stephen Williams und Greg Stuart (2000) konnten am Beispiel von Layer 5 neokortikalen Pyramidenzellen zum einen nachweisen, dass die Dichte an dendritischen HCN-Kanälen mit der Distanz vom Soma zunimmt und zum anderen zeigen, dass durch Aktivierung dieser Kanäle eine Anpassung der EPSP-Breite erfolgt, die den Zeitverlauf somatischer EPSP unabhängig vom Ort ihrer Erzeugung werden lässt.²²⁶ Man könnte also annehmen, dass sich in der Ausprägung des Sag-Potentials das Vorhandensein von HCN-Kanälen im distalen apikalen Dendritenbaum widerspiegelt.

Um die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten - jenseits der Hypothesentestung - in ihrer Gesamtheit weiter statistisch zu explorieren, kamen Methoden zur Dimensionsreduktion sowie Methoden des nicht-hierarchischen *Clusterings* zum Einsatz. Eine Hauptkomponentenanalyse reduziert die Dimensionalität eines komplexen Datensatzes, indem Linearkombinationen der ursprünglichen Variablen erstellt werden. In den hier durchgeführten Hauptkomponentenanalysen konnte die Varianz in den Datensätzen, bei Einbeziehung aller untersuchten Parameter, nur in Anteilen durch die ersten drei Hauptkomponenten erklärt werden, was sich in einer fehlenden Gruppenbildung in der multidimensionalen Visualisierung widerspiegelte. Bei einer k-Means-Clusteranalyse werden, sehr vereinfacht beschrieben, „ähnliche“ Datenpunkte durch die Optimierung der quadratischen Mittelwertabweichungen gruppiert, wodurch eine Erkennung zugrunde liegender Muster möglich wird. Bei der Verteilung der die Zellen repräsentierenden Datenpunkte im Rahmen der k-Means-Cluster-Analysen konnten keine klar voneinander abgrenzbaren Cluster identifiziert werden und die Zuordnung der beiden Zelltypen zu einem der beiden überlappenden Cluster war nicht eindeutig.

Warum im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit in der Veröffentlichung von Austin Graves et al. (2012) bei der k-Means-Clusteranalyse eine klare Clustertrennung erreicht werden konnte, welche in der Veröffentlichung zusätzlich in allen Fällen mit der elektrophysiologischen Zelltypklassifikation übereinstimmte, lässt sich schwer erklären.⁸⁸ Analog zum Vorgehen von Austin Graves et al. (2012) wurden für diese Arbeit daher zusätzlich Analysen unter Verwendung nur der Parameter, die sich zwischen BURST und REG signifikant unterschieden, erstellt. Darunter kam es zwar erwartungsgemäß zu einer Verbesserung des *Clusterings* und der Dimensionsreduktion, wobei weiterhin keine klare Trennung zwischen BURST und REG oder den beiden Clustern erzielt werden konnte.

Diese Tatsache könnte dadurch erklärt werden, dass es sich bei BURST und REG weniger um zwei distinkte Zelltypen mit grundlegend unterschiedlichen elektrophysiologischen oder morphologischen Eigenschaften handelt, sondern beispielsweise um einen Zelltyp, der entlang eines Kontinuums verschiedene elektrophysiologische und morphologische Eigenschaften zeigen kann.

Ferner könnte dieses Ergebnis auch darin begründet liegen, dass nicht das burstende oder regulär feuernde Entladungsverhalten das entscheidende Kriterium zur Klassifizierung subikulärer Pyramidenzellen darstellt, sondern beispielsweise die Lage einer Zelle innerhalb des Subikulums, welches im Rahmen dieser Arbeit bezogen auf die proximal-distale Achse zwar durch Zellfärbungen und Mikrophotographien miterfasst, jedoch nicht ausgewertet wurde.

In aktuellen Veröffentlichungen gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass sich die Pyramidenzellpopulation des Subikulums aus multiplen Subpopulationen zusammensetzt. Sequenzierungsmethoden haben sich hier als ein vielversprechender methodischer Ansatz zur Untersuchung von Heterogenität innerhalb von definierten Zellpopulationen erwiesen. Mark

Cembrowski et al. (2019) konnten mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung zeigen, dass sich die Population subikulärer Pyramidenzellen hierdurch weiter in acht Untergruppen auftrennen lässt. Ferner konnten sie nachweisen, dass die auf Transkriptomebene definierten Subpopulationen mit unterschiedlichen Proteinprodukten und spezifischen efferenten Projektionen assoziiert sind. Das legt nahe, dass sich diese subikulären Subpopulationen in ihrer übergeordneten Organisation und ihren spezifischen Funktionen unterscheiden. Inwiefern transkriptomische Subgruppen mit dem burstenden oder regulär feuernenden Entladungsverhalten der subikulären Pyramidenzellen korrespondieren bleibt unklar.

Für die insbesondere funktionelle Relevanz der Unterteilung in BURST und REG spricht eine aktuelle Veröffentlichung meiner Arbeitsgruppe. Mit Hilfe eines von Christian Wozny et al. (2018) entdeckten molekulargenetischen Markers für BURST im Subikulum (basierend auf der zelltypspezifischen Expression von VGLUT2 in BURST, siehe auch Kapitel 1.3.6 *Zelltypspezifische molekulargenetische Marker*) konnten BURST selektiv markiert und genetisch modifiziert werden. Unter Verwendung optogenetischer Methoden konnte eine zelltypspezifische monosynaptische Verbindung von BURST zu *Layer 5B*, jedoch nicht zu *Layer 5A* Pyramidenzellen im medialen entorhinalen Kortex nachgewiesen werden.¹¹²

Die Ergänzung elektrophysiologischer Untersuchungen um transkriptomische Daten stellt einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige Experimente dar.

5.6 Synaptische Kurzzeitplastizität an der CA1-Subikulum-Synapse

Das Vorhandensein von BURST im Subikulum legt nahe, dass burstendes Entladungsverhalten für die Informationsverarbeitung, also für die neuronale Signalübertragung und die Induktion und Aufrechterhaltung von Plastizität relevant sein könnte.^{53,215} In bisherigen Veröffentlichungen fanden sich Hinweise darauf, dass Synapsen von BURST und REG unterschiedliche Formen der Langzeitplastizität ausprägen und verschiedene pharmakologische Ansprechbarkeiten aufweisen (siehe auch Kapitel 1.4.5 *Neuronale Plastizität an der CA1-Subikulum-Synapse*).^{84,88,90,101,173,179,186,188}

Wie schon in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, weisen BURST und REG unterschiedliche Formen der LTP auf.^{101,178} REG prägen eine NMDA-R-abhängige LTP-Form aus, bei der die postsynaptische Calciumkonzentration eine grundlegende Rolle zu spielen scheint. Bei BURST konnte eine ebenfalls NMDA-R-abhängige LTP-Form, die jedoch mit einer Beteiligung präsynaptischen Calciums einherging, beobachtet werden.¹⁰¹ Ob die an der LTP von BURST und REG beteiligten NMDA-R demnach auch eine prä- oder postsynaptische Lokalisation aufweisen, ist bisher nicht abschließend geklärt. Weiterhin erscheint auch eine retrograde Modulation der präsynaptischen Calciumkonzentration über postsynaptische NMDA-R denkbar.

Ein solches Modell wurde von Pei-Yu Shih et al. (2013) für die gut untersuchte Schaffer-Kollateral-CA1-Synapse entwickelt. Die Ergebnisse der Studie weisen auf eine retrograde synaptische Signalübertragung, vermittelt durch einen Efflux von Kalium über postsynaptische NMDA-R hin.¹⁸⁰

Da sich die Mechanismen der Langzeitplastizität bei den beiden Typen subikulärer Pyramidenzellen unterscheiden, stellt sich die Frage, ob diese auch Unterschiede in Bezug auf die Kurzzeitplastizität zeigen. Im Gegensatz zur Langzeitplastizität wurden bisher nur wenige Untersuchungen zur Kurzzeitplastizität an der CA1-Subikulum-Synapse durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob sich die Ausprägung von Kurzzeitplastizität an der CA1-Subikulum-Synapse bei den beiden subikulären Pyramidenzelltypen unterscheidet und inwiefern prä- und postsynaptische NMDA-R involviert sind.

Die Untersuchungen von Christian Wozny et al. (2008) an 18 Zellen hatten gezeigt, dass die in Folge hochfrequenter Stimulation (100 Pulse, 50 Hz, keine LTP-Induktion) gemessene PTP bei BURST signifikant stärker ausgeprägt war als bei REG.¹⁰¹ Anders als erwartet, zeigten sich aber bei den hier durchgeführten Untersuchungen an insgesamt 75 subikulären Pyramidenzellen keine signifikanten Unterschiede der hochfrequenzinduzierten PTP bei BURST und REG. Die PTP betrug im Mittel bei beiden Zelltypen circa 200%, wohingegen bei den Untersuchungen von Christian Wozny et al. (2008) die mittlere PTP bei BURST mit $308 \pm 27\%$ und bei REG mit $179 \pm 9\%$ angegeben wurde.¹⁰¹ Im Unterschied zu den hier dargestellten Untersuchungen wurde die Studie von Christian Wozny et al. (2008) an Ratten und bei deutlich höheren Temperaturen (30-32 °C) durchgeführt. Ob sich die unterschiedlichen Ergebnisse auf einen dieser beiden Faktoren zurückführen lassen, ist noch nicht abschließend geklärt.

In den Veröffentlichungen von Christian Wozny et al. (2008) und Jason Aoto et al. (2013) hatte sich weiterhin angedeutet, dass die Zugabe des NMDA-R-Blockers AP5, neben der Blockade von LTP, bei beiden subikulären Pyramidenzelltypen auch zu einer Reduktion der PTP führt.^{101,178} Auf dieser Grundlage wurde in dieser Arbeit auch die Frage nach einer Beteiligung von NMDA-R bei der PTP an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST und REG adressiert.

Die spezifische Blockade postsynaptischer NMDA-R durch intrazelluläre Applikation des nicht-kompetitiven NMDA-R-Antagonisten MK801 hatte keinen Einfluss auf die Ausprägung der PTP bei BURST und REG. Ferner zeigte sich auch im Rahmen einer gleichzeitigen prä- und postsynaptischen NMDA-R-Blockade durch extrazelluläre Applikation des kompetitiven NMDA-R-Antagonisten AP5 keine relevante Reduktion der PTP bei BURST und REG. Auch die PPF zeigten bei beiden Zelltypen eine ähnliche Ausprägung, welche auch durch eine NMDA-R-Blockade nicht beeinflusst wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass NMDA-R – entgegen bisheriger Vermutungen - keine relevante Beteiligung bei der Kurzzeitplastizität an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST und REG aufweisen.

Es muss erwähnt werden, dass die statistische Aussagekraft (engl. *statistical power*), wenngleich keine *Power*-Analysen durchgeführt wurden, zumindest bei einigen der hier aufgeführten Untersuchungen als eher gering eingestuft werden könnte. Es könnten also schwach Effekte bestehen, welche erst bei einem großen Stichprobenumfang statistische Signifikanz zeigen und somit hier nicht detektiert wurden. In einem solchen Fall wäre die Effektstärke jedoch gering, so dass man die Relevanz einer solchen Beobachtung wiederum in Frage stellen könnte.

5.7 Untersuchungen zu NMDA-Rezeptor-Subtypen an der CA1-Subikulum-Synapse burstender Zellen

Es ist bekannt, dass die basale synaptische Transmission an der CA1-Subikulum-Synapse über die glutamaterge Aktivierung von AMPA-R und NMDA-R vermittelt wird.^{79,172} Sowohl in der Vergleichsliteratur, als auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde kein Anhalt für einen zelltypspezifischen Unterschied der evozierten synaptischen Antworten (EPSC) bei Stimulation afferenter Eingänge aus der CA1-Region gefunden.^{87,177} In einer Veröffentlichung wurde interessanterweise beschrieben, dass die synaptischen Eingänge auf BURST, nicht aber auf REG eine Modulation durch präsynaptisch lokalisierte metabotrope Glutamat-Rezeptoren der Gruppe II erfahren.¹⁷³

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass eine NMDA-R-Blockade durch AP5 eine Verminderung der synaptischen Transmission an der CA1-Subikulum-Synapse bei BURST und REG bewirkt. Um einen Eindruck über die Beteiligung verschiedener NMDA-R-Subtypen zu gewinnen, wurden die Auswirkungen einer Blockade spezifischer NMDA-R-Subtypen bei BURST untersucht. Interessant ist die spezifische Untersuchung von NMDA-R bei BURST unter anderem deshalb, weil es Hinweise auf das Vorhandensein präsynaptischer NMDA-R an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST gibt, welche für die Induktion von LTP bedeutend zu sein scheinen.¹⁰¹ Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt eine selektive Blockade von GluN2B-NMDA-R-Subtypen durch Ifenprodil zu einer Verminderung der synaptischen Transmission an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST. NMDA-R-Subtypen, die GluN2C- oder GluN2D-Untereinheiten enthalten, scheinen hier nicht relevant beteiligt zu sein: Die Applikation von DQP-1105 hatte keinen Einfluss auf die gemessenen Ströme an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST. Eine eindeutige Aussage über die Lokalisation der hier untersuchten NMDA-R kann nicht getroffen werden. Die fehlende Veränderung der Doppelpulsratio nach Applikation von AP5 und Ifenprodil weist jedoch auf einen postsynaptischen Ursprung des Effektes und so auch auf eine eventuelle postsynaptische Rezeptorlokalisierung hin.

Im Rahmen der weiteren Exploration der AP5- und Ifenprodil-Wirkung auf die NMDA-R-vermittelte Neurotransmission an der CA1-Subikulum-Synapse von BURST konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, sogenannte *Repatch*-Experimente an diesen Zellen durchzuführen. Hierdurch war es möglich, nach der Ermittlung des elektrophysiologischen Zelltyps durch postsynaptische NMDA-R vermittelte Ströme bei einem depolarisierten Membranpotential von +40 mV zu studieren. Auch hier zeigte sich, eine deutliche Reduktion der NMDA-R-vermittelten Neurotransmission unter AP5 und Ifenprodil. Anhand der Ausprägung der Effekte von AP5 und Ifenprodil ließ sich rückschließen, dass GluN2B-Untereinheiten enthaltende NMDA-R-Subtypen die hier untersuchten Strömen in einem relevanten Anteil - jedoch nicht ausschließlich - zu vermitteln scheinen. Eine Beteiligung GluN2A-Untereinheiten enthaltende NMDA-R-Subtypen scheint in Zusammenschau der Ergebnisse plausibel.

In zukünftigen Untersuchungen sollte die Frage nach NMDA-R-Subtypen an der CA1-Subikulum-Synapse von REG adressiert werden. Weiterhin sind zusätzliche Messungen anzustreben, in denen spezifisch GluN2A-Untereinheiten enthaltende NMDA-R-Subtypen inhibiert werden. Dies könnte beispielsweise durch Verwendung des selektiven NMDA-R-Antagonisten TCN-201 (Antagonist der NMDA-R-GluN2A-Untereinheit) erfolgen.

In den hier durchgeführten Untersuchungen an der CA1-Subikulum-Synapse ergaben sich keine Hinweise auf über postsynaptische NMDA-R retrograd vermittelte präsynaptische Effekte auf die Kurzzeitplastizität. Wie schon erwähnt, wird ein solcher Mechanismus von Pei-Yu Shih et al. (2013) an der Schaffer-Kollateral-CA1-Synapse vermutet. Die Ergebnisse der zugehörigen Studie wiesen auf eine, über einen Efflux von Kalium über postsynaptische NMDA-R vermittelte, retrograde synaptische Signalübertragung hin.¹⁸⁰ Analog zu der genannten Veröffentlichung von Pei-Yu Shih et al. (2013) fiel bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Feldmessungen an Schaffer-Kollateral-CA1-Synapsen die Ratio der fEPSP-Steigung zwischen dem ersten fEPSP und dem fünften fEPSP unter AP5 ebenfalls signifikant ab. Dies könnte als Hinweis für einen präsynaptischen Ursprung des Effektes von AP5 auf die fEPSP-Steigung an der Schaffer-Kollateral-CA1-Synapse gewertet werden, wobei die Beständigkeit dieses Effektes zukünftig in weiteren Messungen überprüft werden sollte.

Als sehr komplexe neuronale Struktur stellt die hippocampale Formation in Bezug auf die Untersuchung elektrophysiologischer Phänomene eine große Herausforderung dar. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, Charakteristika der beiden subikulären Pyramidenzelltypen zu identifizieren und den Mechanismen der Kurzzeitplastizität an der CA1-Subikulum-Synapse auf den Grund zu gehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit und die durch die beiden Typen subikulärer Pyramidenzellen repräsentierte Dichotomie innerhalb des Subikulums bildet die Grundlage für zahlreiche interessante weiterführende Fragestellungen.

Literaturverzeichnis

1. Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. The Hippocampus Book. New York, NY, US: Oxford University Press; 2007.
2. Insausti R. Comparative anatomy of the entorhinal cortex and hippocampus in mammals. *Hippocampus* 1993;3:19-26.
3. Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci* 2014;15:655-69.
4. Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 1989;31:571-91.
5. Bentivoglio M, Swanson LW. On the fine structure of the pes Hippocampi major (with plates XIII-XXIII). *Brain Res Bull* 2001;54:461-83.
6. Mazzarello P. The Hidden Structure: A Scientific Biography of Camillo Golgi. New York, NY, US: Oxford University Press; 1999.
7. Lorente De Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system: Johann Ambrosius Barth; 1934.
8. Witter MP, Amaral DG. CHAPTER 21 - Hippocampal Formation. In: Paxinos G, ed. *The Rat Nervous System (Third Edition)*. Burlington: Academic Press; 2004:635-704.
9. Filimonoff IN. A rational subdivision of the cerebral cortex. *Arch Neurol Psychiatry* 1947;58:296-311.
10. Witter MP. Connectivity of the Hippocampus. In: Cutsuridis V, Graham B, Cobb S, Vida I, eds. *Hippocampal Microcircuits: A Computational Modeler's Resource Book*. New York, NY, US: Springer New York; 2010:5-26.
11. Andersen P, Bliss TVP, Skrede KK. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp Brain Res* 1971;13:222-38.
12. Witter MP, Doan TP, Jacobsen B, Nilssen ES, Ohara S. Architecture of the Entorhinal Cortex A Review of Entorhinal Anatomy in Rodents with Some Comparative Notes. *Front Syst Neurosci* 2017;11:46.
13. Köhler C. A projection from the deep layers of the entorhinal area to the hippocampal formation in the rat brain. *Neurosci Lett* 1985;56:13-9.
14. Steinvorth S, Levine B, Corkin S. Medial temporal lobe structures are needed to re-experience remote autobiographical memories: evidence from H.M. and W.R. *Neuropsychologia* 2005;43:479-96.
15. Bayley PJ, Hopkins RO, Squire LR. The fate of old memories after medial temporal lobe damage. *J Neurosci* 2006;26:13311-7.
16. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell T, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, eds. *Principles of neural science*. 5. ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2012.
17. Postle BR, Druzgal TJ, D'Esposito M. Seeking the neural substrates of visual working memory storage. *Cortex* 2003;39:927-46.
18. Eichenbaum H. Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 2004;44:109-20.
19. Squire LR, Stark CE, Clark RE. The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* 2004;27:279-306.

20. Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* 1986;6:2950-67.
21. Tulving E, Markowitsch HJ. Episodic and declarative memory: role of the hippocampus. *Hippocampus* 1998;8:198-204.
22. Burgess N, Maguire EA, O'Keefe J. The Human Hippocampus and Spatial and Episodic Memory. *Neuron* 2002;35:625-41.
23. Colgin LL, Moser EI. Gamma oscillations in the hippocampus. *Physiology (Bethesda)* 2010;25:319-29.
24. Buzsáki G. Two-stage model of memory trace formation: a role for "noisy" brain states. *Neuroscience* 1989;31:551-70.
25. O'Keefe J, Nadel L. *The Hippocampus as a Cognitive Map*: Oxford: Clarendon Press; 1978.
26. Buzsáki G, Draguhn A. Neuronal Oscillations in Cortical Networks. *Science* 2004;304:1926-9.
27. Hartley T, Bird CM, Chan D, Cipolotti L, Husain M, Vargha-Khadem F, Burgess N. The hippocampus is required for short-term topographical memory in humans. *Hippocampus* 2007;17:34-48.
28. O'Keefe J. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. *Exp Neurol* 1976;51:78-109.
29. Brotons-Mas JR, Schaffelhofer S, Guger C, O'Mara SM, Sanchez-Vives MV. Heterogeneous spatial representation by different subpopulations of neurons in the subiculum. *Neuroscience* 2017;343:174-89.
30. Hartley T, Lever C, Burgess N, O'Keefe J. Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014;369:20120510.
31. Fernandez-Lamo I, Sanchez-Campusano R, Gruart A, Delgado-Garcia JM. Functional states of rat cortical circuits during the unpredictable availability of a reward-related cue. *Sci Rep* 2016;6:37650.
32. O'Mara SM, Sanchez-Vives MV, Brotons-Mas JR, O'Hare E. Roles for the subiculum in spatial information processing, memory, motivation and the temporal control of behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33:782-90.
33. Lowry CA. Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol* 2002;14:911-23.
34. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RGM. *Synaptic Plasticity and Memory: An Evaluation of the Hypothesis*. *Annu Rev Neurosci* 2000;23:649-711.
35. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004;44:5-21.
36. Behr J, Wozny C, Fidzinski P, Schmitz D. Synaptic plasticity in the subiculum. *Prog Neurobiol* 2009;89:334-42.
37. Hasselmo ME, McClelland JL. Neural models of memory. *Curr Opin Neurobiol* 1999;9:184-8.
38. Ding S-L. Comparative anatomy of the prosubiculum, subiculum, presubiculum, postsubiculum, and parasubiculum in human, monkey, and rodent. *J Comp Neurol* 2013;521:4145-62.
39. Aggleton JP, Christiansen K. The subiculum: the heart of the extended hippocampal system. *Prog Brain Res* 2015;219:65-82.
40. Amaral DG, Dolorfo C, Alvarez-Royo P. Organization of CA1 projections to the subiculum: a PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus* 1991;1:415-35.

41. Tamamaki N, Nojyo Y. Disposition of the slab-like modules formed by axon branches originating from single CA1 pyramidal neurons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 1990;291:509-19.
42. Naber PA, Lopes da Silva FH, Witter MP. Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum. *Hippocampus* 2001;11:99-104.
43. Witter MP. Connections of the subiculum of the rat: topography in relation to columnar and laminar organization. *Behav Brain Res* 2006;174:251-64.
44. Sun Y, Nguyen AQ, Nguyen JP, Le L, Saur D, Choi J, Callaway EM, Xu X. Cell-type-specific circuit connectivity of hippocampal CA1 revealed through Cre-dependent rabies tracing. *Cell Rep* 2014;7:269-80.
45. Commins S, Aggleton JP, O'Mara SM. Physiological evidence for a possible projection from dorsal subiculum to hippocampal area CA1. *Exp Brain Res* 2002;146:155-60.
46. Knopp A, Kivi A, Wozny C, Heinemann U, Behr J. Cellular and network properties of the subiculum in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Comp Neurol* 2005;483:476-88.
47. Harris E, Witter MP, Weinstein G, Stewart M. Intrinsic connectivity of the rat subiculum: I. Dendritic morphology and patterns of axonal arborization by pyramidal neurons. *J Comp Neurol* 2001;435:490-505.
48. Kim Y, Spruston N. Target-specific output patterns are predicted by the distribution of regular-spiking and bursting pyramidal neurons in the subiculum. *Hippocampus* 2012;22:693-706.
49. Cembrowski MS, Phillips MG, DiLisio SF, Shields BC, Winnubst J, Chandrashekar J, Bas E, Spruston N. Dissociable Structural and Functional Hippocampal Outputs via Distinct Subiculum Cell Classes. *Cell* 2018;173:1280-92 e18.
50. O'Mara S. The subiculum: what it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *J Anat* 2005;207:271-82.
51. Tang H, Wu GS, Xie J, He X, Deng K, Wang H, Xu F, Luo HR. Brain-wide map of projections from mice ventral subiculum. *Neurosci Lett* 2016;629:171-9.
52. Naber PA, Witter MP. Subicular efferents are organized mostly as parallel projections: a double-labeling, retrograde-tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 1998;393:284-97.
53. O'Mara SM, Commins S, Anderson M, Gigg J. The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol* 2001.
54. Anderson MI, O'Mara SM. Responses of dorsal subicular neurons of rats during object exploration in an extended environment. *Exp Brain Res* 2004;159:519-29.
55. Deadwyler SA, Hampson RE. Differential but complementary mnemonic functions of the hippocampus and subiculum. *Neuron* 2004;42:465-76.
56. Herman JP, Mueller NK. Role of the ventral subiculum in stress integration. *Behav Brain Res* 2006;174:215-24.
57. Roy DS, Kitamura T, Okuyama T, Ogawa SK, Sun C, Obata Y, Yoshiki A, Tonegawa S. Distinct Neural Circuits for the Formation and Retrieval of Episodic Memories. *Cell* 2017;170:1000-12 e19.
58. Davies DC, Wilmott AC, Mann DM. Senile plaques are concentrated in the subicular region of the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 1988;94:228-33.
59. Hyman B, Van Hoesen G, Damasio A, Barnes C. Alzheimer's disease: cell-specific pathology isolates the hippocampal formation. *Science* 1984;225:1168-70.

60. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82:239-59.
61. Carlesimo GA, Piras F, Orfei MD, Iorio M, Caltagirone C, Spalletta G. Atrophy of presubiculum and subiculum is the earliest hippocampal anatomical marker of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (Amst)* 2015;1:24-32.
62. Cohen I, Navarro V, Clemenceau S, Baulac M, Miles R. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science* 2002;298:1418-21.
63. Wozny C, Knopp A, Lehmann T, Heinemann U, Behr J. The Subiculum: A Potential Site of Ictogenesis in Human Temporal Lobe Epilepsy. 2005.
64. Behr J, Heinemann U. Low Mg²⁺ induced epileptiform activity in the subiculum before and after disconnection from rat hippocampal and entorhinal cortex slices. *Neurosci Lett* 1996;205:25-8.
65. Harris E, Stewart M. Propagation of synchronous epileptiform events from subiculum backward into area CA1 of rat brain slices. *Brain Res* 2001;895:41-9.
66. Wozny C, Kivi A, Lehmann T-N, Dehnicke C, Heinemann U, Behr J. Comment on "On the Origin of Interictal Activity in Human Temporal Lobe Epilepsy in Vitro". *Science* 2003;301:463-.
67. Harrison PJ. The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;174:151-62.
68. Weinberger DR. Cell biology of the hippocampal formation in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1999;45:395-402.
69. Harrison PJ, Eastwood SL. Neuropathological studies of synaptic connectivity in the hippocampal formation in schizophrenia. *Hippocampus* 2001;11:508-19.
70. Heckers S. Neuroimaging studies of the hippocampus in schizophrenia. *Hippocampus* 2001;11:520-8.
71. Cole J, Toga AW, Hojatkashani C, Thompson P, Costafreda SG, Cleare AJ, Williams SC, Bullmore ET, Scott JL, Mitterschiffthaler MT, Walsh ND, Donaldson C, Mirza M, Marquand A, Nosarti C, McGuffin P, Fu CH. Subregional hippocampal deformations in major depressive disorder. *J Affect Disord* 2010;126:272-7.
72. Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM. Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry* 2004;161:598-607.
73. Posener JA, Wang L, Price JL, Gado MH, Province MA, Miller MI, Babb CM, Csernansky JG. High-dimensional mapping of the hippocampus in depression. *Am J Psychiatry* 2003;160:83-9.
74. Vorel SR, Liu X, Hayes RJ, Spector JA, Gardner EL. Relapse to Cocaine-Seeking After Hippocampal Theta Burst Stimulation. *Science* 2001;292:1175-8.
75. Glangetas C, Fois GR, Jalabert M, Lecca S, Valentinova K, Meye FJ, Diana M, Faure P, Mameli M, Caille S, Georges F. Ventral Subiculum Stimulation Promotes Persistent Hyperactivity of Dopamine Neurons and Facilitates Behavioral Effects of Cocaine. *Cell Rep* 2015;13:2287-96.
76. Bossert JM, Adhikary S, St Laurent R, Marchant NJ, Wang HL, Morales M, Shaham Y. Role of projections from ventral subiculum to nucleus accumbens shell in context-induced reinstatement of heroin seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2016;233:1991-2004.
77. Menendez de la Prida L, Suarez F, Pozo MA. Electrophysiological and Morphological Diversity of Neurons From the Rat Subicular Complex In vitro. *Hippocampus* 2003;13:728-44.
78. Staff NP, Jung H-Y, Thiagarajan T, Yao M, Spruston N. Resting and Active Properties of Pyramidal Neurons in Subiculum and CA1 of Rat Hippocampus. *J Neurophysiol* 2000;84:2398-408.

79. Taube JS. Electrophysiological properties of neurons in the rat subiculum in vitro. *Exp Brain Res* 1993;96:304-18.
80. Stewart M, Wong RK. Intrinsic properties and evoked responses of guinea pig subicular neurons in vitro. *J Neurophysiol* 1993;70:232-45.
81. Behr J, Empson RM, Schmitz D, Gloveli T, Heinemann U. Electrophysiological properties of rat subicular neurons in vitro. *Neurosci Lett* 1996;220:41-4.
82. Mason A. Electrophysiology and burst-firing of rat subicular pyramidal neurons in vitro: a comparison with area CA1. *Brain Res* 1993;600:174-8.
83. Mattia D, Hwa GG, Avoli M. Membrane properties of rat subicular neurons in vitro. *J Neurophysiol* 1993;70:1244-8.
84. Greene JR, Mason A. Neuronal diversity in the subiculum: correlations with the effects of somatostatin on intrinsic properties and on GABA-mediated IPSPs in vitro. *J Neurophysiol* 1996;76:1657-66.
85. Mattia D, Kawasaki H, Avoli M. In vitro electrophysiology of rat subicular bursting neurons. *Hippocampus* 1997;7:48-57.
86. Jarsky T, Mady R, Kennedy B, Spruston N. Distribution of bursting neurons in the CA1 region and the subiculum of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 2008;506:535-47.
87. Stewart M. Antidromic and orthodromic responses by subicular neurons in rat brain slices. *Brain Res* 1997;769:71-85.
88. Graves AR, Moore SJ, Bloss EB, Mensh BD, Kath WL, Spruston N. Hippocampal pyramidal neurons comprise two distinct cell types that are countermodulated by metabotropic receptors. *Neuron* 2012;76:776-89.
89. Cooper DC, Moore SJ, Staff NP, Spruston N. Psychostimulant-Induced Plasticity of Intrinsic Neuronal Excitability in Ventral Subiculum. *The Journal of Neuroscience* 2003;23:9937-46.
90. Graves AR, Moore SJ, Spruston N, Tryba AK, Kaczorowski CC. Brain-derived neurotrophic factor differentially modulates excitability of two classes of hippocampal output neurons. *J Neurophysiol* 2016;116:466-71.
91. Cooper DC, Chung S, Spruston N. Output-mode transitions are controlled by prolonged inactivation of sodium channels in pyramidal neurons of subiculum. *PLoS Biol* 2005;3:e175.
92. Jung HY, Staff NP, Spruston N. Action potential bursting in subicular pyramidal neurons is driven by a calcium tail current. *J Neurosci* 2001;21:3312-21.
93. Joksimovic SM, Eggan P, Izumi Y, Joksimovic SL, Tesic V, Dietz RM, Orfila JE, DiGruccio MR, Herson PS, Jevtovic-Todorovic V, Zorumski CF, Todorovic SM. The role of T-type calcium channels in the subiculum: to burst or not to burst? *J Physiol* 2017;595:6327-48.
94. Lisman JE. Bursts as a unit of neural information: making unreliable synapses reliable. *Trends Neurosci* 1997;20:38-43.
95. Williams SR, Stuart GJ. Mechanisms and consequences of action potential burst firing in rat neocortical pyramidal neurons. *The Journal of physiology* 1999;521 Pt 2:467-82.
96. Hablitz J, Johnston D. Endogenous nature of spontaneous bursting in hippocampal pyramidal cells. *Cell Mol Neurobiol* 1982;1:325-34.
97. Pike FG, Meredith RM, Olding AW, Paulsen O. Rapid report: postsynaptic bursting is essential for 'Hebbian' induction of associative long-term potentiation at excitatory synapses in rat hippocampus. *The Journal of physiology* 1999;518 (Pt 2):571-6.

98. Greene JR, Totterdell S. Morphology and distribution of electrophysiologically defined classes of pyramidal and nonpyramidal neurons in rat ventral subiculum in vitro. *J Comp Neurol* 1997;380:395-408.
99. van Welie I, Remme MW, van Hooft JA, Wadman WJ. Different levels of Ih determine distinct temporal integration in bursting and regular-spiking neurons in rat subiculum. *J Physiol* 2006;576:203-14.
100. Cembrowski MS, Spruston N. Heterogeneity within classical cell types is the rule: lessons from hippocampal pyramidal neurons. *Nat Rev Neurosci* 2019;20:193-204.
101. Wozny C, Maier N, Schmitz D, Behr J. Two different forms of long-term potentiation at CA1-subiculum synapses. *J Physiol* 2008;586:2725-34.
102. Wu CP, Huang HL, Asl MN, He JW, Gillis J, Skinner FK, Zhang L. Spontaneous rhythmic field potentials of isolated mouse hippocampal-subicular-entorhinal cortices in vitro. *J Physiol* 2006;576:457-76.
103. Finch DM, Nowlin NL, Babb TL. Demonstration of axonal projections of neurons in the rat hippocampus and subiculum by intracellular injection of HRP. *Brain Res* 1983;271:201-16.
104. Mattia D, Kawasaki H, Avoli M. Repetitive firing and oscillatory activity of pyramidal-like bursting neurons in the rat subiculum. *Exp Brain Res* 1997;114:507-17.
105. Böhm C, Peng Y, Maier N, Winterer J, Poulet JF, Geiger JR, Schmitz D. Functional Diversity of Subicular Principal Cells during Hippocampal Ripples. *J Neurosci* 2015;35:13608-18.
106. Eller J, Zarnadze S, Bauerle P, Dugladze T, Gloveli T. Cell type-specific separation of subicular principal neurons during network activities. *PLoS One* 2015;10:e0123636.
107. Stanford IM, Traub RD, Jefferys JGR. Limbic Gamma Rhythms. II. Synaptic and Intrinsic Mechanisms Underlying Spike Doublets in Oscillating Subicular Neurons. *J Neurophysiol* 1998;80:162-71.
108. Nitzan N, McKenzie S, Beed P, English DF, Oldani S, Tukker JJ, Buzsaki G, Schmitz D. Propagation of hippocampal ripples to the neocortex by way of a subiculum-retrosplenial pathway. *Nat Commun* 2020;11:1947.
109. Böhm C, Peng Y, Geiger JRP, Schmitz D. Routes to, from and within the subiculum. *Cell Tissue Res* 2018;373:557-63.
110. Tsao A, Moser MB, Moser EI. Traces of experience in the lateral entorhinal cortex. *Curr Biol* 2013;23:399-405.
111. Földy C, Darmanis S, Aoto J, Malenka RC, Quake SR, Südhof TC. Single-cell RNAseq reveals cell adhesion molecule profiles in electrophysiologically defined neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016;113:E5222-E31.
112. Wozny C, Beed P, Nitzan N, Possnecker Y, Rost BR, Schmitz D. VGLUT2 Functions as a Differential Marker for Hippocampal Output Neurons. *Front Cell Neurosci* 2018;12:337.
113. Wyllie DJ, Livesey MR, Hardingham GE. Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology* 2013;74:4-17.
114. Salussolia CL, Prodromou ML, Borker P, Wollmuth LP. Arrangement of subunits in functional NMDA receptors. *J Neurosci* 2011;31:11295-304.
115. Bear MF, Malenka RC. Synaptic plasticity: LTP and LTD. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4:389-99.
116. Cramer SC, Sur M, Dobkin BH, O'Brien C, Sanger TD, Trojanowski JQ, Rumsey JM, Hicks R, Cameron J, Chen D, Chen WG, Cohen LG, deCharms C, Duffy CJ, Eden GF, Fetz EE, Filart R,

- Freund M, Grant SJ, Haber S, Kalivas PW, Kolb B, Kramer AF, Lynch M, Mayberg HS, McQuillen PS, Nitkin R, Pascual-Leone A, Reuter-Lorenz P, Schiff N, Sharma A, Shekim L, Stryker M, Sullivan EV, Vinogradov S. Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain* 2011;134:1591-609.
117. Citri A, Malenka RC. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 2008;33:18-41.
 118. Daoudal G, Debanne D. Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem* 2003;10:456-65.
 119. Mozzachiodi R, Byrne JH. More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory. *Trends Neurosci* 2010;33:17-26.
 120. Frick A, Johnston D. Plasticity of dendritic excitability. *J Neurobiol* 2005;64:100-15.
 121. Zhang W, Linden DJ. The other side of the engram: experience-driven changes in neuronal intrinsic excitability. *Nature Reviews Neuroscience* 2003;4:885-900.
 122. Turrigiano G. Homeostatic synaptic plasticity: local and global mechanisms for stabilizing neuronal function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a005736-a.
 123. Abraham WC, Bear MF. Metaplasticity: the plasticity of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 1996;19:126-30.
 124. Zucker RS, Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 2002;64:355-405.
 125. Fioravante D, Regehr WG. Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2011;21:269-74.
 126. Katz B, Miledi R. The role of calcium in neuromuscular facilitation. *J Physiol* 1968;195:481-92.
 127. Debanne D, Guérineau NC, Gähwiler BH, Thompson SM. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *The Journal of Physiology* 1996;491:163-76.
 128. Catterall WA, Few AP. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron* 2008;59:882-901.
 129. Neher E, Sakaba T. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 2008;59:861-72.
 130. Brager DH, Cai X, Thompson SM. Activity-dependent activation of presynaptic protein kinase C mediates post-tetanic potentiation. *Nat Neurosci* 2003;6:551-2.
 131. Abbott LF, Regehr WG. Synaptic computation. *Nature* 2004;431:796-803.
 132. Murthy VN, Sejnowski TJ, Stevens CF. Heterogeneous release properties of visualized individual hippocampal synapses. *Neuron* 1997;18:599-612.
 133. Atwood HL, Karunanithi S. Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat Rev Neurosci* 2002;3:497-516.
 134. Jones MV, Westbrook GL. The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci* 1996;19:96-101.
 135. Schmitz D, Mellor J, Nicoll RA. Presynaptic Kainate Receptor Mediation of Frequency Facilitation at Hippocampal Mossy Fiber Synapses. *Science* 2001;291:1972-6.
 136. Manzoni O, Bockaert J. Metabotropic glutamate receptors inhibiting excitatory synapses in the CA1 area of rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 1995;7:2518-23.

137. Thomson AM. Presynaptic frequency- and pattern-dependent filtering. *J Comput Neurosci* 2003;15:159-202.
138. Hebb DO. *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. Oxford, England: Wiley; 1949.
139. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973;232:331-56.
140. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1993;361:31-9.
141. Sutton MA, Schuman EM. Dendritic protein synthesis, synaptic plasticity, and memory. *Cell* 2006;127:49-58.
142. Zhou Y, Wu H, Li S, Chen Q, Cheng X-W, Zheng J, Takemori H, Xiong Z-Q. Requirement of TORC1 for Late-Phase Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *PLoS One* 2006;1:e16.
143. Yuste R, Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 2001;24:1071-89.
144. Nikonenko I, Jourdain P, Alberi S, Toni N, Muller D. Activity-induced changes of spine morphology. *Hippocampus* 2002;12:585-91.
145. Abraham WC, Williams JM. Properties and mechanisms of LTP maintenance. *Neuroscientist* 2003;9:463-74.
146. Collingridge GL, Kehl SJ, McLennan H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J Physiol* 1983;334:33-46.
147. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 1984;309:261-3.
148. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984;307:462-5.
149. Nicoll RA, Roche KW. Long-term potentiation: peeling the onion. *Neuropharmacology* 2013;74:18-22.
150. Nicoll RA, Malenka RC. Expression mechanisms underlying NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *Ann N Y Acad Sci* 1999;868:515-25.
151. Nicoll RA. Expression mechanisms underlying long-term potentiation: a postsynaptic view. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358:721-6.
152. Soderling TR, Derkach VA. Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci* 2000;23:75-80.
153. Dan Y, Poo MM. Spike timing-dependent plasticity: from synapse to perception. *Physiol Rev* 2006;86:1033-48.
154. Wigstrom H, Gustafsson B. Postsynaptic control of hippocampal long-term potentiation. *J Physiol (Paris)* 1986;81:228-36.
155. Carlson G, Wang Y, Alger BE. Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat Neurosci* 2002;5:723-4.
156. O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1991;88:11285-9.

157. Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:24-32.
158. Regehr WG, Carey MR, Best AR. Activity-dependent regulation of synapses by retrograde messengers. *Neuron* 2009;63:154-70.
159. Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* 2003;69:341-74.
160. Castillo PE. Presynaptic LTP and LTD of excitatory and inhibitory synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4.
161. Corlew R, Brasier DJ, Feldman DE, Philpot BD. Presynaptic NMDA receptors: newly appreciated roles in cortical synaptic function and plasticity. *Neuroscientist* 2008;14:609-25.
162. Humeau Y, Shaban H, Bissiere S, Luthi A. Presynaptic induction of heterosynaptic associative plasticity in the mammalian brain. *Nature* 2003;426:841-5.
163. Zalutsky RA, Nicoll RA. Mossy fiber long-term potentiation shows specificity but no apparent cooperativity. *Neurosci Lett* 1992;138:193-7.
164. Nicoll RA, Malenka RC. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1995;377:115-8.
165. Nicoll RA, Schmitz D. Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:863-76.
166. Castillo PE, Schoch S, Schmitz F, Sudhof TC, Malenka RC. RIM1alpha is required for presynaptic long-term potentiation. *Nature* 2002;415:327-30.
167. Castillo PE, Janz R, Sdhof TC, Tzounopoulos T, Malenka RC, Nicoll RA. Rab3A is essential for mossy fibre long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 1997;388:590-3.
168. Lonart G, Janz R, Johnson KM, Sudhof TC. Mechanism of action of rab3A in mossy fiber LTP. *Neuron* 1998;21:1141-50.
169. Powell CM, Schoch S, Monteggia L, Barrot M, Matos MF, Feldmann N, Sudhof TC, Nestler EJ. The presynaptic active zone protein RIM1alpha is critical for normal learning and memory. *Neuron* 2004;42:143-53.
170. Dudek SM, Bear MF. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:4363-7.
171. Mulkey RM, Malenka RC. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 1992;9:967-75.
172. Behr J, Gloveli T, Heinemann U. The perforant path projection from the medial entorhinal cortex layer III to the subiculum in the rat combined hippocampal-entorhinal cortex slice. *Eur J Neurosci* 1998;10:1011-8.
173. Kintscher M, Breustedt J, Miceli S, Schmitz D, Wozny C. Group II metabotropic glutamate receptors depress synaptic transmission onto subicular burst firing neurons. *PLoS One* 2012;7:e45039.
174. Boeijinga PH, Boddeke HW. Activation of 5-HT1B receptors suppresses low but not high frequency synaptic transmission in the rat subicular cortex in vitro. *Brain Res* 1996;721:59-65.
175. Commins S, Gigg J, Anderson M, O'Mara SM. The projection from hippocampal area CA1 to the subiculum sustains long-term potentiation. *Neuroreport* 1998;9:847-50.
176. Roberts L, Greene JR. Post-weaning social isolation of rats leads to a diminution of LTP in the CA1 to subiculum pathway. *Brain Res* 2003;991:271-3.

177. Kokaia M. Long-term potentiation of single subicular neurons in mice. *Hippocampus* 2000;10:684-92.
178. Aoto J, Martinelli DC, Malenka RC, Tabuchi K, Sudhof TC. Presynaptic neurexin-3 alternative splicing trans-synaptically controls postsynaptic AMPA receptor trafficking. *Cell* 2013;154:75-88.
179. Wozny C, Maier N, Fidzinski P, Breustedt J, Behr J, Schmitz D. Differential cAMP signaling at hippocampal output synapses. *J Neurosci* 2008;28:14358-62.
180. Shih PY, Savtchenko LP, Kamasawa N, Dembitskaya Y, McHugh TJ, Rusakov DA, Shigemoto R, Semyanov A. Retrograde synaptic signaling mediated by K⁺ efflux through postsynaptic NMDA receptors. *Cell Rep* 2013;5:941-51.
181. Brasier DJ, Feldman DE. Synapse-specific expression of functional presynaptic NMDA receptors in rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 2008;28:2199-211.
182. Woodhall G, Evans DI, Cunningham MO, Jones RS. NR2B-containing NMDA autoreceptors at synapses on entorhinal cortical neurons. *J Neurophysiol* 2001;86:1644-51.
183. Sjostrom PJ, Turrigiano GG, Nelson SB. Neocortical LTD via coincident activation of presynaptic NMDA and cannabinoid receptors. *Neuron* 2003;39:641-54.
184. Feng B, Morley RM, Jane DE, Monaghan DT. The effect of competitive antagonist chain length on NMDA receptor subunit selectivity. *Neuropharmacology* 2005;48:354-9.
185. Li H, Zhang J, Xiong W, Xu T, Cao J, Xu L. Long-term depression in rat CA1-subicular synapses depends on the G-protein coupled mACh receptors. *Neurosci Res* 2005;52:287-94.
186. Fidzinski P, Shor O, Behr J. Target-cell-specific bidirectional synaptic plasticity at hippocampal output synapses. *Eur J Neurosci* 2008;27:1111-8.
187. Shor OL, Fidzinski P, Behr J. Muscarinic acetylcholine receptors and voltage-gated calcium channels contribute to bidirectional synaptic plasticity at CA1-subiculum synapses. *Neurosci Lett* 2009;449:220-3.
188. Pandey A, Sikdar SK. Depression biased non-Hebbian spike-timing-dependent synaptic plasticity in the rat subiculum. *J Physiol* 2014;592:3537-57.
189. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976;260:799-802.
190. B Sakmann a, Neher E. Patch Clamp Techniques for Studying Ionic Channels in Excitable Membranes. *Annu Rev Physiol* 1984;46:455-72.
191. Ferster D, Jagadeesh B. EPSP-IPSP interactions in cat visual cortex studied with in vivo whole-cell patch recording. *The Journal of Neuroscience* 1992;12:1262-74.
192. Hamill O, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth F. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from Cells and Cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv : European Journal of Physiology*, v391, 85-100 (1981) 1981;391.
193. Numberger M, Draguhn A. Patch-Clamp-Technik: Spektrum Akademischer Verlag; 1996.
194. Lindau M, Fernandez JM. IgE-mediated degranulation of mast cells does not require opening of ion channels. *Nature* 1986;319:150-3.
195. Rice ME. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. *Trends Neurosci* 2000;23:209-16.
196. Harrison FE, May JM. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic Biol Med* 2009;46:719-30.

197. Guzman SJ, Schlogl A, Schmidt-Hieber C. Stimfit: Quantifying electrophysiological data with Python. *Front Neuroinform* 2014;8:16.
198. Johnston D, Wu SM. Extracellular field recording. *Foundations of Cellular Neurophysiology*: MIT Press; 1995:432–5.
199. Feng L, Zhao T, Kim J. neuTube 1.0: A New Design for Efficient Neuron Reconstruction Software Based on the SWC Format. *eNeuro* 2015;2.
200. Sholl DA. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 1953;87:387-406.
201. Milošević NT, Ristanović D. The Sholl analysis of neuronal cell images: Semi-log or log–log method? *J Theor Biol* 2007;245:130-40.
202. Freedman D, Diaconis P. On the histogram as a density estimator:L2 theory. *Zeitschrift für Wahrscheinlichkeitstheorie und Verwandte Gebiete* 1981;57:453-76.
203. Cohen J. CHAPTER 3 - The Significance of a Product Moment rs. In: Cohen J, ed. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*: Academic Press; 1977:75-107.
204. Rand WM. Objective Criteria for the Evaluation of Clustering Methods. *Journal of the American Statistical Association* 1971;66:846-50.
205. Hubert L, Arabie P. Comparing partitions. *Journal of Classification* 1985;2:193-218.
206. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, DeZonia BE, Walter AE, Arena ET, Eliceiri KW. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 2017;18:529.
207. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;9:676-82.
208. Scorcioni R, Polavaram S, Ascoli GA. L-Measure: a web-accessible tool for the analysis, comparison and search of digital reconstructions of neuronal morphologies. *Nat Protoc* 2008;3:866-76.
209. Rothman JS, Silver RA. NeuroMatic: An Integrated Open-Source Software Toolkit for Acquisition, Analysis and Simulation of Electrophysiological Data. *Front Neuroinform* 2018;12:14.
210. Pinheiro PS, Mulle C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci* 2008;9:423-36.
211. Häusser M, Spruston N, Stuart GJ. Diversity and Dynamics of Dendritic Signaling. *Science* 2000;290:739-44.
212. Mel BW. Information Processing in Dendritic Trees. *Neural Comput* 1994;6:1031-85.
213. Cuntz H, Forstner F, Borst A, Häusser M. One rule to grow them all: a general theory of neuronal branching and its practical application. *PLoS Comput Biol* 2010;6.
214. Mainen ZF, Sejnowski TJ. Influence of dendritic structure on firing pattern in model neocortical neurons. *Nature* 1996;382:363-6.
215. Cooper DC. The significance of action potential bursting in the brain reward circuit. *Neurochem Int* 2002;41:333-40.
216. Huettner JE, Bean BP. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:1307-11.

217. Davies J, Francis AA, Jones AW, Watkins JC. 2-Amino-5-phosphonovalerate (2APV), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation. *Neurosci Lett* 1981;21:77-81.
218. Williams K. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 1993;44:851-9.
219. Acker TM, Yuan H, Hansen KB, Vance KM, Ogden KK, Jensen HS, Burger PB, Mullasseril P, Snyder JP, Liotta DC, Traynelis SF. Mechanism for noncompetitive inhibition by novel GluN2C/D N-methyl-D-aspartate receptor subunit-selective modulators. *Mol Pharmacol* 2011;80:782-95.
220. Gigg J, Finch D, o Mara S. Responses of rat subicular neurons to convergent stimulation of lateral entorhinal cortex and CA1 in vivo. *Brain Res* 2000;884:35-50.
221. Panuccio G, Vicini S, Avoli M. Cell type-specific properties of subicular GABAergic currents shape hippocampal output firing mode. *PLoS One* 2012;7:e50241.
222. Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* 2003;65:453-80.
223. Stevens CF. Presynaptic function. *Curr Opin Neurobiol* 2004;14:341-5.
224. Mihaljević B, Larrañaga P, Bielza C. Comparing the Electrophysiology and Morphology of Human and Mouse Layer 2/3 Pyramidal Neurons With Bayesian Networks. *Front Neuroinform* 2021;15.
225. Gilman JP, Medalla M, Luebke JI. Area-Specific Features of Pyramidal Neurons-a Comparative Study in Mouse and Rhesus Monkey. *Cereb Cortex* 2017;27:2078-94.
226. Williams SR, Stuart GJ. Site independence of EPSP time course is mediated by dendritic I(h) in neocortical pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 2000;83:3177-82.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Yona Petra Antonia Pößnecker, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Elektrophysiologische und morphologische Charakterisierung subikulärer Pyramidenzellen und Untersuchungen zur Rolle des NMDA-Rezeptors bei der Kurzzeitplastizität an der CA1-Subikulum-Synapse der Maus“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Wozny C, Beed P, Nitzan N, **Pößnecker Y**, Rost BR, Schmitz D. VGLUT2 Functions as a Differential Marker for Hippocampal Output Neurons. *Front Cell Neurosci* 2018;12:337.

Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. Dietmar Schmitz, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe und seinem Labor durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christian Wozny und PD Dr. Jörg Breustedt für die hervorragende Betreuung bei der Planung und Durchführung der Experimente, für ihre grenzenlose Geduld sowie für die lebhaften Diskussionen über die theoretischen Hintergründe.

Meinen Laborkollegen danke ich ebenfalls herzlich für die angenehme Zusammenarbeit, die immer freundliche Atmosphäre und die schönen Begegnungen auch außerhalb des Labors.

Sehr dankbar bin ich weiterhin Susanne Rieckmann, Anke Schönherr und Lisa Züchner für ihre großartige Hilfe bei der Bewältigung des Laboralltags.

Meinen Eltern und Max danke ich zutiefst für die immerwährende Unterstützung und ihren liebevollen Rückhalt in allen Lebenssituationen.