

Aus dem Institut für Neurophysiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Synaptische Plastizität im Subikulum  
und ihre Modulation durch Serotonin**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Matthias Wawra  
aus Neubrandenburg

Datum der Promotion: 4. September 2015  
.....

Für meine Eltern und Lea

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Methodik</b>	<b>6</b>
4.1	Präparation der Hirschnitte . . . . .	6
4.2	Elektrophysiologie . . . . .	7
4.2.1	Feldpotential- und Einzelzellmessungen . . . . .	7
4.2.2	Patch-Clamp Messungen . . . . .	8
4.3	Stimulationsprotokolle . . . . .	8
4.4	Datenanalyse . . . . .	9
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>9</b>
5.1	Studie 1 (Fidzinski et al. 2011) . . . . .	9
5.2	Studie 2 (Fidzinski et al. 2012) . . . . .	10
5.3	Studie 3 (Wawra et al. 2014) . . . . .	11
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>11</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>14</b>
<b>8</b>	<b>Ausgewählte Publikationen mit Anteilserklärung</b>	<b>18</b>
8.1	Fidzinski et al. (2011) <i>Hippocampus</i> . . . . .	19
8.2	Fidzinski et al. (2012) <i>Brain Research</i> . . . . .	30
8.3	Wawra et al. (2014) <i>PLOS ONE</i> . . . . .	37
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>44</b>
<b>10</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>45</b>
10.1	Originalarbeiten . . . . .	45
10.2	Kongressbeiträge . . . . .	45
<b>11</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>46</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b>	<b>47</b>

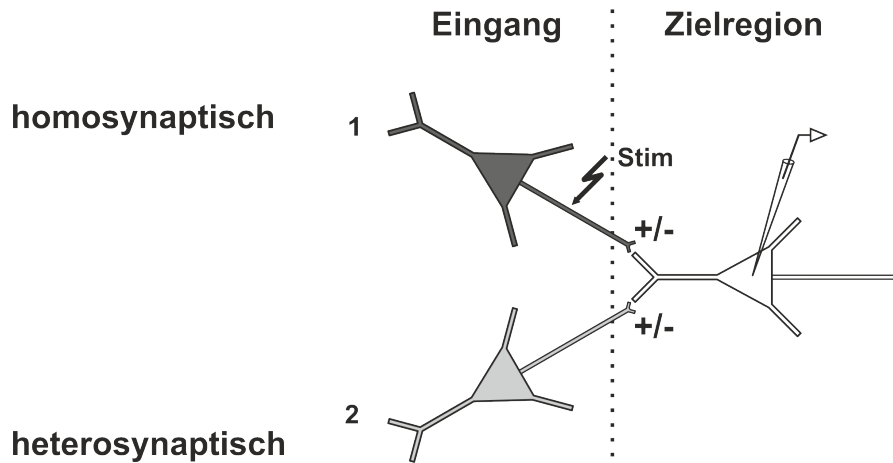
# 1 Abstract

Der im Temporallappen gelegene Hippokampus spielt für das deklarative Gedächtnis eine entscheidende Rolle. Er wird innerviert und projiziert zu zahlreichen kortikalen und subkortikalen Regionen. Seine Hauptausgangsstruktur bildet das Subikulum. Das Subikulum erhält sowohl einen direkten Eingang aus dem entorhinalen Kortex, als auch ein indirekten kortikalen Eingang von CA1. Die Synapsen dieser Eingänge zeigen Plastizität in Form von Langzeitpotenzierung (LTP) und -depression (LTD). Unter experimentellen Bedingungen wird LTP durch hohe und LTD durch niedrige Stimulationsfrequenzen induziert. In tierexperimentellen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass niedrigfrequente Stimulation des direkten Eingangs eine LTD am direkten Eingang (homosynaptisch) und gleichzeitig eine LTP am indirekten Eingang (heterosynaptisch) induziert. Diese heterosynaptische Plastizität wird durch eine LTD an GABAergen Interneuronen vermittelt. Niedrigfrequente Stimulation des indirekten Eingangs und hochfrequente Stimulation induzieren hingegen ausschließlich homosynaptische Plastizität. Wir konnten außerdem zeigen, dass der an ein G-Protein ( $G_s$ ) gekoppelte 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor in akuten Rattenhirnschnitten eine basale Aktivität aufweist und essentiell für die Induktion einer homosynaptischen LTD am indirekten kortikalen Eingang ist. Darüber hinaus verstärkt sich die LTD bei einer Aktivierung des Rezeptors. Unsere Ergebnisse ermöglichen einen neuen Einblick in die Funktionsweise des Subikulums. Die heterosynaptische Plastizität könnte zur Integration von sensorischen und räumlichen Informationen aus dem Kortex und dem Hippokampus beitragen. Der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor wiederum könnte mit seiner gegensätzlichen Modulation der LTD im Subikulum und der Area CA1 an der sich ergänzenden Verarbeitung von Gedächtnisinhalten in beiden Regionen beteiligt sein.

[The hippocampus is part of the temporal lobe and plays a crucial role in declarative memory. It receives input and projects to numerous cortical and subcortical regions. The subiculum serves as the final relay for the outgoing information of the hippocampus. It receives direct cortical input from the entorhinal cortex and indirect cortical input from CA1. At the synapses of these inputs either a strengthening or a weakening of synaptic coupling can occur, which is referred to as long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD), respectively. Under experimental conditions, LTP can be induced by high-frequency and LTD by low-frequency stimulation. We show that low-frequency stimulation of the direct cortical input induces homosynaptic LTD and heterosynaptic LTP at synapses of the indirect cortical input. This heterosynaptic plasticity is mediated by an LTD of GABAergic interneurons. Low-frequency stimulation of the indirect cortical input and high-frequency stimulation, however, only induce homosynaptic plasticity. We show that activation of the 5-HT<sub>4</sub> receptor facilitates homosynaptic LTD of the indirect cortical input. Furthermore, since LTD is blocked in the presence of 5-HT<sub>4</sub> receptor antagonists, our data are consistent with basal receptor activity. Our findings provide new insights into the function of the subiculum. Heterosynaptic plasticity might contribute to the integration of sensory and spatial information from the entorhinal cortex and the hippocampus. The 5-HT<sub>4</sub> receptor in turn might play a role in the different but complementary information processing of the subiculum and CA1.]

## 2 Einleitung

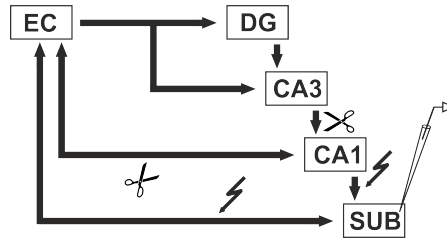
Lernen ist der bewusste oder unbewusste Erwerb neuen Wissens oder neuer Fertigkeiten. Die Fähigkeit, Erlerntes dauerhaft zu behalten und später abzurufen, wird als Gedächtnis bezeichnet. Das menschliche Gedächtnis kann grob in Langzeit- und Arbeits-/Kurzzeitgedächtnis eingeteilt werden. An der Übertragung ins Langzeitgedächtnis sind je nach Gedächtnisinhalt, deklarativ/explicit (episodisches und semantisches Wissen) oder prozedural/implizit (motorische und kognitive Fertigkeiten), unterschiedliche Hirnareale beteiligt (für eine Übersicht siehe 1, 2). Bereits in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts zeigte die Studie an dem Patienten Henry Gustav Molaison („H. M.“, 1926–2008), dass für die Übertragung in das deklarative Gedächtnis der mediale Temporallappen mit der hippocampalen Formation eine entscheidende Rolle spielt (3). Auch an der Verarbeitung und Konsolidierung räumlicher Informationen ist die hippocampale Formation wesentlich beteiligt (4–6). Zur hippocampalen Formation gehören der entorhinale Kortex (EC), das Prä- und Parasubikulum, das Subikulum (Sub) und der Hippokampus, bestehend aus dem Gyrus dentatus und dem Ammonshorn (Cornu ammonis, CA) (7, 8). Das Subikulum erhält Informationen aus zwei wesentlichen Eingängen. Der indirekte kortikale Eingang (CA1-Sub-Synapse) erfolgt vom entorhinalen Kortex aus über die sogenannte hippocampale Schleife (bestehend aus Gyrus dentatus, Area CA3 und Area CA1) ((8), siehe auch Abb. 2). Der direkte kortikale Eingang (EC-Sub-Synapse) erfolgt aus der Lamina II und III des entorhinalen Kortex (9, 10). Das Subikulum ist die Hauptausgangsstruktur für Informationen aus dem Hippokampus und leitet diese an nachgeschaltete kortikale und subkortikale Regionen weiter (8). Studien haben gezeigt, dass die Interaktion zwischen dem Hippokampus und dem Kortex essentiell für die Gedächtniskonsolidierung ist (5, 11–13). Das Subikulum nimmt damit als anatomisch-funktionelle Schnittstelle eine strategische Schlüsselposition ein. Forschungsarbeiten der letzten Jahre zum Subikulum haben sich vor allem mit dem indirekten Eingang über CA1 beschäftigt und stellten hierbei die synaptische Plastizität in den Vordergrund (für eine Zusammenfassung siehe 14). Unter synaptischer Plastizität verstehen wir die aktivitätsabhängige Modulation synaptischer Transmission. Diese ist ein entscheidender zellulärer Prozess für die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses (15, 16). In Abhängigkeit von dem Aktivierungsgrad und dem Rezeptorbesatz der Synapse sowie der Art und Geschwindigkeit ihrer Aktivierung, kann sowohl eine dauerhafte Verstärkung, Langzeitpotenzierung (*long-term potentiation*, LTP), als auch eine Abschwächung, Langzeitdepression (*long-term depression*, LTD), der synaptischen Transmission auftreten (7). Im Subikulum werden zwei Arten von Pyramidenzellen unterschieden. Abhängig von ihrem Entladungsverhalten sprechen wir von sogenannten *burst-spiking* Neuronen, welche initial eine schnelle Folge von Aktionspotentialen (AP; >100 Hz) gefolgt von einzelnen AP (<10 Hz) zeigen, und regulär feuernenden Neuronen, welche nur einzelne AP (<10 Hz) zeigen. Wozny et al. (17, 18) konnten zeigen, dass die LTP an der CA1-Sub-Synapse in *burst-spiking* Neuronen präsynaptisch vermittelt wird und abhängig von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), einem *second messenger*, ist, während die postsynaptisch vermittelte LTP in regulär feuernenden Neuronen unabhängig von cAMP ist. Fidzinski et al. (19) zeigten darüber hinaus, dass niedrigfrequente Stimulation (siehe auch S. 8, Kapitel 4.3) in *burst-spiking* Neuronen eine LTD und in regu-



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der homo- und heterosynaptischen Plastizität. Wird durch eine Stimulation (z.B. elektrisch, hier durch den Pfeil symbolisiert) der Axone von Eingang 1 die synaptische Transmission an diesem Eingang moduliert, so sprechen wir von homosynaptischer Plastizität. Wird nach Stimulation von Eingang 1 die synaptische Transmission am Eingang 2 verändert, so nennen wir dies heterosynaptische Plastizität. Stim, Stimulation; +/-, veränderte synaptische Transmission.

lär feuernden Neuronen eine LTP induziert. Wird nur die Transmission der Synapsen des aktivierten Eingangs moduliert, so sprechen wir von homosynaptischer Plastizität. Wird neben der homosynaptischen Plastizität gleichzeitig auch die Transmission der Synapsen eines zweiten, nicht aktivierten Eingangs moduliert, so nennen wir dies heterosynaptische Plastizität (siehe auch Abb. 1). In CA1 ist heterosynaptische Plastizität sowohl für die homosynaptische LTP als auch für die homosynaptische LTD beschrieben (siehe zum Beispiel 20, 21). Im Subikulum wurde heterosynaptische Plastizität bislang für die zwei oben beschriebenen Eingänge (direkt/indirekt) noch nicht untersucht.

Studien zeigen, dass für die Entstehung von Gedächtnisinhalten die Beteiligung und Interaktion mehrerer Transmittersysteme benötigt wird. Hierzu zählen neben den klassischen glutamatergen, acetylcholinergen und GABAergen Systemen auch neuromodulatorische wie das dopaminerge, das noradrenerge und das serotonerge System (22–25). Für das dopaminerge und das noradrenerge System konnte bereits ein Einfluss auf die synaptische Plastizität im Subikulum gezeigt werden. Eine kurzzeitige Aktivierung des positiv an eine Adenylylzyklase gekoppelten Dopamin-Rezeptors D1/D5 senkt die Induktionsschwelle für die LTP in *burst-spiking* und regulär feuernden Neuronen (26, 27). Wójtowicz et al. (28) zeigen, dass die Aktivierung des  $\beta$ -Adrenozeptors, ein ebenfalls positiv an eine Adenylylzyklase gekoppelter Rezeptor, eine chemische LTP in *burst-spiking* Neuronen induziert, welche die gleichen Eigenschaften wie die elektrische LTP besitzt. Der Hippokampus erhält aus den Raphé-Kernen ebenfalls eine serotonerge Innervation (29–31). Es werden sieben Hauptgruppen von Serotoninrezeptoren (5-HT-Rezeptoren) unterschieden. Bis auf den Typ 3, ein liganden-gesteuerter Kationenkanal, sind diese Rezeptoren über G-Proteine je nach Typ an zwei unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden gekoppelt



**Abb. 2:** Diagramm der hippocampalen Formation. Die großen Pfeile demonstrieren die Verschaltung der einzelnen Regionen untereinander. Die kleinen Pfeile zeigen die Stimulationsorte an. Die Scheren markieren die Stellen an denen Verbindungen durchtrennt wurden, um die in den Studien verwendeten CA1-Sub-EC-Minischritte zu erhalten (siehe auch S. 6). Hippokampale Regionen: CA3, CA1; Sub, Subikulum; EC, entorhinaler Kortex; DG, Gyrus dentatus (nach 8).

(für eine Übersicht siehe 32, 33). Die Subtypen des 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptors führen zu einer Aktivierung der Phospholipase C. Alle anderen 5-HT-Rezeptoren (1,4,5,6,7) verändern den intrazellulären Gehalt an cAMP. Der 5-HT-Rezeptor vom Typ 4 (5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor), welcher im gesamten Hippokampus exprimiert wird, ist positiv über das G-Protein G<sub>s</sub> an die Adenylylzyklase 1 (AC1) gekoppelt und erhöht nach Aktivierung hierüber den Anteil des intrazellulären cAMP. cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche Ionenkanäle und den Transkriptionsfaktor *cAMP-responsive element-binding proteins* (CREB) phosphoryliert (34). Mlinar et al. (35) konnten zeigen, dass in Area CA1 die kurzzeitige Aktivierung des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors die Exzitabilität in Feldpotentialmessungen langanhaltend erhöht. *In vivo* Experimente in Ratten belegen darüber hinaus, dass die durch Erkundung einer neuen Umgebung induzierte Depotenzierung (Rückführung auf das Ausgangsniveau) einer elektrisch induzierten LTP in der Area CA1 durch Aktivierung des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors geblockt wird. Gleichzeitig wird hierdurch die Induktionsschwelle für eine LTP gesenkt. Eine Blockade des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors führt hingegen zur einer Reduktion der Induktionsschwelle für eine LTD (36). Auch im Gyrus dentatus führt eine Aktivierung des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors zu einer Blockade der Depotenzierung (37). Bislang liegen keine Studien zum Einfluss des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors auf die synaptische Plastizität im Subikulum vor.

### 3 Fragestellung

In den in Fidzinski et al. (38) und Fidzinski et al. (39) veröffentlichten Studien 1 und 2 (siehe S. 19 und S. 30) wurde die heterosynaptische Plastizität im Subikulum untersucht. In der dritten Studie ((40), siehe S. 37) untersuchten wir den Einfluss des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors auf die synaptische Plastizität an CA1-Sub-Synapsen von *burst-spiking* Neuronen. Es wurden folgende Hypothesen und Fragestellungen überprüft:

1. An den zwei wesentlichen Eingängen (direkt/indirekt) im Subikulum gibt es heterosynaptische Plastizität.

2. Welche zellulären Mechanismen und Rezeptoren sind an dieser heterosynaptischen Plastizität beteiligt?
3. Aktivierung und Blockade des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors moduliert homosynaptische Plastizität im Subikulum und zwar insbesondere die LTP, wie bei anderen positiv an eine Adenylylzyklase gekoppelten Rezeptoren auch.
  - a) Die Modulation der synaptischen Plastizität wird über die Adenylylzyklase 1-cAMP-PKA-Kaskade vermittelt.

## 4 Methodik

Alle Experimente wurden nach den nationalen und internationalen Richtlinien der Tierschutzbeauftragten der Charité – Universitätsmedizin Berlin, des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin und der Europäischen Union (Richtlinie 2010/63/EU) durchgeführt. Für die drei Studien wurden *in vitro* Einzelzelleableitungen (*sharp microelectrode*, Patch-Clamp (nur in Studie 1 und 2)) von subikulären Pyramidenzellen und Interneuronen sowie Feldpotentialmessungen (nur Studie 1) durchgeführt. Hierfür wurden Wistar-Ratten beider Geschlechter (Studie 3: nur männlich) im Alter von 4-6 Wochen verwendet.

### 4.1 Präparation der Hirnschnitte

Die Ratten wurden unter tiefer Ether- oder Isoflurannarkose dekapitiert. Daraufhin wurde das Gehirn zügig freipräpariert und für die weitere Verwendung auf einem Objektträger fixiert. Mit einem Mikrotom mit vibrierender Klinge (Leica VT1200S, Leica Microsystems GmbH, Deutschland) wurden horizontale Hirnschnitte (300 - 400  $\mu\text{m}$ ), welche die hippocampale Formation und den entorhinalen Kortex enthielten, angefertigt. Hierbei wurden unterschiedliche Lösungen verwendet, um optimale Präparate für die unterschiedlichen Messmethoden zu erhalten. Hirnschnitte, in denen *sharp microelectrode*- und Feldpotentialmessungen durchgeführt wurden, wurden in eisgekühlter und oxygenierter (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) artifizieller zerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF) mit einem pH-Wert von 7,4 präpariert bestehend aus (in mM): NaCl 129, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25, NaHCO<sub>3</sub> 26, KCl 3, CaCl<sub>2</sub> 1,6, MgSO<sub>4</sub> 1,8 und Glukose 10. Nach der Präparation wurden die Hirnschnitte bei 34 °C in einer Interface-Kammer auf einem Flüssigkeitsfilm gelagert und gemessen.

Die Hirnschnitte für die Patch-Clamp-Messungen wurden in einer eisgekühlten und oxygenierten ACSF mit hohem Saccharose-Anteil und einem pH-Wert von 7,4 gelagert. So bleiben insbesondere die oberflächlichen Zellschichten, welche für die Patch-Clamp-Messungen besonders wichtig sind, besser erhalten. Die Lösung bestand aus (in mM): NaCl 87, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,25, NaHCO<sub>3</sub> 26, KCl 2,5, CaCl<sub>2</sub> 0,5, MgCl<sub>2</sub> 7, Saccharose 75, und Glucose 25. Nach der Präparation wurden diese Schnitte noch für 15 Minuten bei 34 °C in Saccharose-ACSF und anschließend bei Zimmertemperatur in normaler ACSF unter submerged-Bedingungen, das heißt vollständig von oxygenierter ACSF umgeben, aufbewahrt und gemessen. Um die Wahrscheinlichkeit zu minimieren, unspezifische Fasern zu stimulieren, wurden für die Messungen CA1-Sub-EC-Minischritte verwendet, siehe hierzu auch Studie 1 (S. 19) und Abbildung 3.



## 4.2 Elektrophysiologie

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedenen elektrophysiologische Messtechniken verwendet (Feldpotentialmessungen, Einzelzelleitungen und die Patch-Clamp Technik). Für alle Messungen wurde ein 3 kHz-Tiefpassfilter eingesetzt und das Signal mit einer Frequenz von 10 kHz registriert. Es wurde keine Kompensation des Serienwiderstands durchgeführt.

Für die Charakterisierung zellulärer Entladungen und zur Einschätzung der Membraneigenschaften wurden abgestufte hyper- und depolarisierende Strompulse (200 ms, -0,1 bis 0,6 nA für Pyramidenzellen; 200 – 1000 ms, -0,1 bis 0,4 nA für Interneuronen) appliziert. Exzitatorische postsynaptische Potentiale/Ströme (EPSPs/EPSCs) wurden mit einer Frequenz von 0,1 Hz durch die Stimulation von entweder CA1-Efferenzen des indirekten Eingangs oder EC-Efferenzen des direkten Eingangs (sog. „temporoammonic pathway“, Studien 1 und 2) mit ACSF-gefüllten Patch-Pipetten für 100  $\mu$ s evoziert. In allen Studien wurden Doppelpulse (paired-pulse) mit einem Interstimulus-Intervall von 50 ms verwendet.

Inhibitorische postsynaptische Potentiale/Ströme (IPSPs/IPSCs) wurden durch eine Stimulation nahe der Ableitelektrode (<0,2 mm von der Spitze der Ableitelektrode entfernt) im *Stratum moleculare* im Subikulum evoziert (Studie 1). Hierbei wurden AMPA-Rezeptoren mittels CNQX (30  $\mu$ M) und in einigen Experimenten auch NMDA-Rezeptoren mit Hilfe von D-APV (50  $\mu$ M) blockiert, um exzitatorische Antworten zu unterdrücken. Ableitungen von evozierten und mini-IPSCs (eIPSCs, mIPSCs) wurden bei einer Klemmspannung von -70 mV durchgeführt. Die Lösung in den Patch-Clamp-Pipetten enthielt hier zusätzlich MK-801 (1 mM), um NMDA-Rezeptoren zu blocken. In allen mIPSCs-Experimenten wurden spannungsaktivierte Natriumkanäle mit Tetrodotoxin (TTX, 1  $\mu$ M) geblockt.

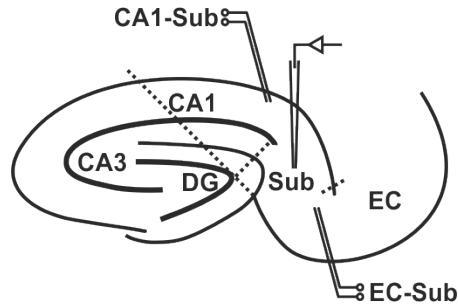
Die Amplitude der EPSP/Cs und IPSP/Cs wurde vor Applikation des Stimulationsprotokolls zur Aufzeichnung der Kontrollantworten in LTP-Experimenten auf 30-50 % und in LTD-Experimenten auf 50-80 % der Maximalantwort eingestellt.

### 4.2.1 Feldpotential- und Einzelzellmessungen

Die Einzelzelleitungen mit *sharp microelectrodes* wurden im *current-clamp bridge*-Modus mit einem SEC10LX-Verstärker (NPI Electronic, Tamm, Deutschland) durchgeführt. Das Signal wurde mit einem ITC-16 Interface (Instrutech Corp., Great Neck, New York, USA) und der Software TIDA (HEKA GmbH, Lambrecht, Deutschland) aufgezeichnet. Es wurden Mikroelektroden aus Borosilikatglas, gefüllt mit 2,5 M Kaliumacetat, mit einem Widerstand von 40-100 M $\Omega$  verwendet.

Die Stimulationselektrode wurde an der Grenze zum Subikulum im *Stratum oriens* von CA1 und die Ableitelektrode im mittleren Drittel der Pyramidenzellschicht des Subikulums positioniert (Abb. 3).

In einem Teil der Messungen (Studie 1) wurde gleichzeitig mit einer weiteren ACSF-gefüllten Elektrode (2-4 M $\Omega$ ) das Feldpotential im Subikulum im Bereich der Einzelzelleitung gemessen.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung eines hippocampalen Hirnschnittes mit der Anordnung der Ableit- und Stimulationselektroden (EC-Sub nur in den Studien 1 und 2). Die gestrichelten Linien zeigen die Schnittführung bei CA1-Sub-EC-Minischritten.

#### 4.2.2 Patch-Clamp Messungen

Die Patch-Clamp Messungen wurden mit einem Multiclamp 700B Verstärker (Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA) bei einer Klemmspannung von  $-70$  mV durchgeführt. Das Signal wurde mit einem Digidata 1440A Interface (Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA) und der Software pClamp (Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA) aufgezeichnet. Es wurde keine Kompensation des Serienwiderstands durchgeführt.

Die Patch-Clamp-Elektroden hatten einen Widerstand von  $4-6$  M $\Omega$  und wurden mit einer artifiziellen intrazellulären Flüssigkeit gefüllt. Es kamen zwei verschiedenen Intrazellulärlösungen zum Einsatz. Zur Aufzeichnung von inhibitorischen Strömen (in mM): CsCl 130, MgCl<sub>2</sub> 2, Na<sub>2</sub>ATP 2, NaGTP 0,3, HEPES 10 und EGTA 2 bei einem pH von 7,3 (pH korrigiert mit CsOH). Bei allen anderen Messungen (in mM): K-Glukonat 135, KCl 20, HEPES 10, Phosphokreatin 7, MgATP 2, NaGTP 0,3 und EGTA 0,2 mit KOH auf einen pH-Wert von 7,2 titriert.

Wenn Interneurone gemessen wurden, ist der intrazellulären Flüssigkeit zusätzlich 0,5 % Biocytin hinzugesetzt worden, um die Zellen für eine Visualisierung zu markieren. Nach der elektrophysiologischen Messung wurden die Zellen mit positiven Strompulsen (2 Hz, 0,2-1,0 nA) für mindestens 20 Minuten mit Biocytin gefüllt und anschließend mit Paraformaldehyd fixiert (siehe auch 41).

#### 4.3 Stimulationsprotokolle

Für die Induktion von synaptischer Plastizität wurden vier unterschiedliche Stimulationsprotokolle verwendet. Zur Induktion einer LTP wurde ein Stimulationsprotokoll verwendet, bei dem in vier Durchgängen 100 Pulse mit 100 Hz mit jeweils einer Pause von 10 Sekunden appliziert wurden (*high frequency stimulation*, HFS) (17). Für eine unerschwellige LTP-Induktion wurden einmalig 10 Pulse mit 40 Hz oder einmalig 25 Pulse mit 50 Hz appliziert, während für die LTD 900 Pulse mit 1 Hz verwendet wurden (*low frequency stimulation*, LFS; 19).

## 4.4 Datenanalyse

Je nach Erfordernissen der Daten wurde der Student's t-Test (für gepaarte oder unabhängige Stichproben) oder eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) mit dem TukeyHSD-post-hoc-Test (42) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgesetzt. Um die Lokalisation der synaptischen Veränderungen (prä- oder postsynaptisch) feststellen zu können, wurde das Verhältnis der Doppelpulse (*paired-pulse ratio*, PPR) und zusätzlich der Varianzkoeffizient ( $CV^2$ ) ausgewertet (43, 44). Die PPR wurde als der Quotient der Amplitude des zweiten EPSPs dividiert durch die Amplitude des ersten EPSPs definiert. Der Varianzkoeffizient wurde berechnet als Quotient aus der Standardabweichung der EPSP-Amplitude geteilt durch den Mittelwert der EPSP-Amplitude zum Quadrat.

Die Anstiegs- und Abfallszeit ( $T_{\text{rise}}$  und  $T_{\text{decay}}$ ) wurde als die Zeit zwischen 20 und 80 % der Anstiegsphase, bzw. zwischen 100 und 38 % der Abfallsphase der EPSPs definiert. Die Zeit bis zum Amplitudenmaximum ( $T_{\text{peak}}$ ) wurde definiert als die Zeit zwischen Stimulation und Amplitudenmaximum. Veränderungen der postsynaptischen Potentiale/Ströme wurden mindestens für 30 Minuten nach dem Ende des Stimulationsprotokolls aufgezeichnet. Die Veränderungen wurden entweder als Prozentsatz der normalisierten *baseline*-Amplitude oder als Steigung der EPSP-Amplitude (*slope*) 20-25 Minuten nach dem Stimulationsprotokoll angegeben. Dabei wurde die Steigung definiert als die Amplitudendifferenz zwischen 20 und 80 % der Maximalamplitude dividiert durch die Zeit.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Studie 1 (Fidzinski et al. 2011)

In Studie 1 wurde die heterosynaptische Plastizität von subikulären *burst-spiking* Pyramidenzellen mit dem Stimulationsprotokoll für LTD (LFS) untersucht. Hierbei zeigten wir erstmals, dass die Stimulation von EC-Efferenzen (*temporoammonic pathway*) mit LFS eine LTD am direkten kortikalen Eingang induziert (EC-Sub:  $74,2\% \pm 10,4\%$  des Ausgangswertes,  $n=9$ ,  $p < 0,05$ ). Gleichzeitig wurde hierdurch eine Steigerung der Amplituden am indirekten Eingang im Sinne einer heterosynaptischen LTP ausgelöst ( $135,0\% \pm 13,5\%$  des Ausgangswertes,  $n=9$ ,  $p < 0,05$ ). Um zu prüfen, ob der gezeigte heterosynaptische Effekt spezifisch für die EC-Sub-Synapse ist, wurde LFS auch über den indirekten Eingang appliziert. Hierbei zeigte sich keine Veränderung in der EC-Sub-Synapse. Um die Rolle der GABAergen Inhibition für die heterosynaptische LTP der CA1-Sub-Synapse zu überprüfen, wurde LFS über den direkten Eingang unter Blockade von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Bicucullin) und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren (CGP55845) appliziert. Während unter diesen Bedingungen die homosynaptische LTD unverändert blieb, wurde die heterosynaptische LTP komplett unterdrückt. Die Blockade des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors mit Bicucullin führte darüber hinaus zur einer signifikant größeren Zunahme der EPSPs und zu einer relevanten Abnahme von  $T_{\text{rise}}$  und  $T_{\text{decay}}$  dieser EPSPs bei Stimulation der CA1-Sub-Synapse im Vergleich zur EC-Sub-Synapse. Zusammen spricht dies für eine stärkere *feed-forward*-Inhibition am indirekten Eingang (CA1-Sub-Synapse) im Vergleich zum direkten kortikalen Eingang vom entorhinalen Kortex (45, 46, aber siehe auch 47).

Um die Funktion GABAerger Interneurone bei der heterosynaptischen LTP besser zu verstehen, wurde der Einfluss von LFS auf monosynaptische IPSPs untersucht. Hierfür wurden AMPA-Rezeptoren mit CNQX blockiert. Es zeigten sich zwei Komponenten der IPSPs, welche in eine frühe Antwort, vermittelt durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, und eine späte Antwort, vermittelt durch GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren, unterschieden werden konnten. Beide Komponenten zeigten nach LFS eine vergleichbare LTD. Sowohl die heterosynaptische LTP der EPSPs, als auch die LTD der IPSPs konnten durch den NMDA-Rezeptor-Antagonisten D-APV blockiert werden und sind somit NMDA-Rezeptor abhängig.

Um die Lokalisation der an der heterosynaptischen Plastizität beteiligten NMDA-Rezeptoren zu bestimmen, wurden Patch-Clamp-Messungen durchgeführt. Hierbei wurde bei gleicher intra- und extrazellulär Cl<sup>-</sup>-Konzentration eine Klemmspannung von -70 mV verwendet und die Postsynapse zusätzlich über die Patch-Clamp-Elektrode mit dem Ca<sup>2+</sup>-Chelator BAPTA geladen. Beide Maßnahmen zeigten keine Wirkung auf die durch LFS vermittelte LTD der IPSCs, die somit nicht von postsynaptischem Ca<sup>2+</sup> abhängig ist. Dies und auch die Analyse des Varianzkoeffizienten legen einen präsynaptischen Mechanismus der heterosynaptischen LTP nahe.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass die heterosynaptische LTP an der CA1-Sub-Synapse nach LFS an der EC-Sub-Synapse über präsynaptische NMDA-Rezeptoren auf GABAergen Interneuronen vermittelt wird.

## 5.2 Studie 2 (Fidzinski et al. 2012)

In Studie 2 wurde der Einfluss von hochfrequenter Stimulation auf die heterosynaptische Plastizität subikulärer *burst-spiking* Pyramidenzellen untersucht. Wie bereits Wozny et al. (17) demonstrierten, zeigte sich nach tetanischer Stimulation (4x100 Hz, HFS) des indirekten Eingangs eine signifikante und robuste LTP an der CA1-Sub-Synapse. Heterosynaptische Effekte an der EC-Sub-Synapse wurden dabei nicht beobachtet. Am direkten kortikalen Eingang löste HFS lediglich eine post-tetanische Potenzierung an der EC-Sub-Synapse aus. Diese Potenzierung sank allerdings nach 25 Minuten auf den Ausgangswert zurück und hatte keinen Einfluss auf die CA1-Sub-Synapse.

Erst nach Blockierung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit Bicucullin, welches die Induktion einer LTP erleichtert (48), konnte auch am direkten kortikalen Eingang eine signifikante, jedoch im Vergleich zum indirekten Eingang wesentlich geringere LTP induziert werden, die jedoch keinen Einfluss auf den anderen Eingang hatte. Auch an der EC-Sub-Synapse des direkten kortikalen Eingangs war die LTP NMDA-Rezeptor-abhängig. Da sich allerdings nach LTP-Induktion das Verhältnis der Doppelpulse (PPR) nicht änderte und sich nach postsynaptischer Ca<sup>2+</sup>-Pufferung mit dem Chelator BAPTA die LTP vollständig blockieren ließ, ist zusammenfassend von einer postsynaptischen, NMDA-Rezeptor-abhängigen LTP an der EC-Sub-Synapse auszugehen. Ein Einfluss auf die heterosynaptische Plastizität konnte für hochfrequente Stimulation, im Gegensatz zu niedrigfrequenter, nicht gezeigt werden.

### 5.3 Studie 3 (Wawra et al. 2014)

In der dritten Studie wurde der Einfluss des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors auf homosynaptische Plastizität am CA1-Eingang subikulärer *burst-spiking* Pyramidenzellen untersucht. Die Aktivierung des Rezeptors mit dem Agonisten RS 67333 oder eine Blockierung mit dem Antagonisten RS 39604 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Membraneigenschaften oder EPSPs.

HFS induzierte wie vorbeschrieben (17) eine robuste, signifikante LTP. Hierauf hatte der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor keinen signifikanten Einfluss, ebenso wenig wurde die LTP-Induktionsschwelle beeinflusst.

Wie bereits in Fidzinski et al. (19) gezeigt, induzierte LFS eine signifikante LTD, die postsynaptisch exprimiert wurde. Wurde gleichzeitig der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor mit RS 67333 aktiviert, so war die LTD signifikant verstärkt. Im Gegensatz dazu war die LTD vollständig unterdrückt, wenn der Rezeptor mit RS 39604 oder GR 113808 blockiert wurde. Die Auswertung der EPSPs während der LFS ergab außerdem, dass der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor den gleichen Einfluss auf die Kurzzeitplastizität hat.

5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren sind positiv an die AC1 gekoppelt und erhöhen hierüber bei Aktivierung die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Darum wurde untersucht, ob die Inhibition der cAMP-abhängigen PKA einen Einfluss auf die LTD hat. Es zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen keine signifikante LTD mehr induzierbar war. Hierauf hatte auch die zusätzliche Aktivierung von 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren keinen Einfluss.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass die postsynaptische LTD an der CA1-Sub-Synapse abhängig von 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren ist. Des Weiteren deuten die Daten darauf hin, dass die 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren im Subikulum eine basale Aktivität aufweisen. Ein Einfluss auf die LTP an der CA1-Sub-Synapse von *burst-spiking* Neuronen konnte nicht nachgewiesen werden.

## 6 Diskussion

Die vorliegende Arbeit umfasst drei neurophysiologische, tierexperimentelle Studien. In ihnen wurde die synaptische Plastizität am direkten (EC-Sub) und indirekten (CA1-Sub) Eingang subikulärer *burst-spiking* Pyramidenzellen unter Berücksichtigung heterosynaptischer Effekte und mit Fokus auf die Rolle des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors untersucht. Wir zeigten erstmals, dass niedrigfrequente Stimulation über EC-Efferenzen eine homosynaptische LTD an der EC-Sub-Synapse induziert. Darüber hinaus konnten wir eine heterosynaptische LTP an der CA1-Sub-Synapse subikulärer *burst-spiking* Pyramidenzellen nachweisen. Im Gegensatz hierzu induzierte LFS über den CA1-Eingang lediglich eine homosynaptische LTD ohne Modulation der EC-Sub-Synapse. Auch bei der Induktion einer homosynaptischen LTP an beiden Eingängen mittels HFS zeigten sich keine heterosynaptischen Effekte. Eine durch EC-Efferenzen vermittelte heterosynaptische Plastizität wurde zuvor bereits in CA1 beschrieben (21). Auch hier induzierte niedrigfrequente Stimulation der EC-Efferenzen eine homosynaptische LTD in Pyramidenzellen der Area CA1 und gleichzeitig eine heterosynaptische LTP am zweiten Eingang von der Area CA3 (Schaffer-Kollaterale). Allerdings blieben hier die Mechanismen der heterosynaptischen Potenzierung unklar.

Unsere Daten zeigen, dass am indirekten kortikalen Eingang (CA1-Sub-Synapse) eine starke *feed-forward*-Inhibition existiert. Eine LTD der IPSPs inhibitorischer Interneurone kann zu einer reduzierten *feed-forward*-Hemmung und hierüber zu einer exzitatorischen Disinhibition führen (49). In Fidzinski et al. (38) zeigten wir erstmals, dass die heterosynaptische Plastizität subikulärer Pyramidenzellen im Säugetier über eine präsynaptische und NMDA-Rezeptor abhängige LTD an GABAergen Interneuronen vermittelt wird. Der gleiche Mechanismus ist interessanterweise zuvor bereits von Lien et al. (50) in Kaulquappen gezeigt worden. Unklar bleibt allerdings, wie genau exzitatorische Efferenzen aus dem entorhinalen Kortex inhibitorische GABAerge Interneuronen im Subikulum beeinflussen können. Neuroanatomische Studien bezüglich der Zielregion der Axone des entorhinalen Kortex kamen zu unterschiedliche Ergebnissen. Einige Quellen berichten, dass EC-Efferenzen im *Stratum moleculare* im Subikulum enden (9, 51). Neuere Studien fanden dagegen Axonterminalen in allen Schichten (10, 46). Letzteres ließe eine direkte Interaktion zwischen EC-Axonen und inhibitorischen Neuronen vermuten. Hieraus ergeben sich drei mögliche Mechanismen, wie exzitatorische Neuronen aus dem entorhinalen Kortex GABAerge Interneurone modulieren könnten. Zum einen könnte Glutamat aus den Axonterminalen direkt an präsynaptische NMDA-Rezeptoren diffundieren. Zum anderen könnten die Axone aus dem entorhinalen Kortex auch direkt an den Präsynapsen terminieren und so einen direkten Einfluss auf deren Aktivität ausüben. Drittens könnten die Terminalen auch auf den Dendriten der Interneuronen enden und hier über eine elektrotone Ausbreitung axonale  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aktivieren. Studien haben gezeigt, dass der entorhinale Kortex eine Repräsentation der räumlichen Umgebung (*spatial map*) enthält und dass seine Interaktion mit dem Hippokampus wichtig für die Orientierung ist (4, 52, 53). Die heterosynaptische Plastizität der *burst-spiking* Neurone zeigt einen neuen und interessanten Mechanismus der Signalverarbeitung im Subikulum und könnte für eine Integration sensorischer Informationen aus der hippocampalen Schleife und Positionsinformationen aus dem entorhinalen Kortex sorgen (54).

Wir konnten zudem erstmals zeigen, dass der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor *in vitro* ausschließlich die LTD subikulärer *burst-spiking* Neurone moduliert. Eine Blockierung des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors führt zu einer vollständigen Suppression der LTD, während eine Aktivierung zu einer Verstärkung führt. Da keine LTD unter einer 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Blockade induziert werden kann, gehen wir davon aus, dass diese Rezeptoren eine basale Aktivität aufweisen. Der Mechanismus, über den diese Aktivität vermittelt wird, bleibt jedoch unklar. Denkbar wäre zum einen, dass die 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren im Subikulum eine intrinsische Aktivität aufweisen, wie dies für einige Subtypen des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors gezeigt wurde (55, 56). Diese intrinsische Aktivität kann durch bestimmte Antagonisten, welche auf Grund dieser Eigenschaft auch inverse Agonisten genannt werden, blockiert werden. Zum anderen könnte freies oder durch Aktivität freigesetztes, endogenes Serotonin die Rezeptoren aktivieren. Da für den Antagonisten RS 39604 keine Aktivität im Sinne eines inversen Agonisten in der Literatur beschrieben ist, halten wir die zweite Variante für wahrscheinlicher. Interessanterweise konnten Kemp und Manahan-Vaughan (36) zeigen, dass der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor auch in CA1 *in vivo*, wie im Subikulum, ausschließlich die LTD moduliert. Im Unterschied zum Subikulum führt eine Aktivierung hier jedoch zu einer Suppression der LTD, während die Blockade zu einer verringerten Induktionsschwelle führte. Unsere

Daten deuten darauf hin, dass die Modulation der LTD durch 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren über die Adenylylcyclase 1-cAMP-PKA-Kaskade vermittelt wird. Im Gegensatz zu den ebenfalls über ein G-Protein positiv an eine Adenylylcyclase gekoppelten  $\beta$ -Adrenozeptoren (28) und D1/D5-Dopaminrezeptoren (26) konnten wir keinen Einfluss des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors auf die LTP nachweisen. Welche Mechanismen dieser grundlegend verschiedenen Modulation der synaptischen Plastizität zugrunde liegen, ist bislang nicht bekannt. Denkbar wäre zum einen eine unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation der beteiligten Proteine. Möglich wäre auch, dass verschiedene Subtypen der PKA von den Rezeptoren aktiviert werden, die ihrerseits andere Zielproteine phosphorylieren. Einschränkend muss erwähnt werden, dass die verwendeten Substanzen nicht vollkommen spezifisch für die jeweils angegebenen Zielstrukturen sind und so durchaus auch weitere Rezeptoren, Kinasen oder Signalkaskaden an den hier beschriebenen Effekten beteiligt sein könnten. In Deadwyler und Hampson (5) wurde gezeigt, dass das Subikulum und die Area CA1 *in vivo* in Ratten komplementäre sich jedoch ergänzende Funktionen bei der Verarbeitung von räumlichen und zeitlichen Gedächtnisinhalten haben. Der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor zeigt mit seiner gegensätzlichen Wirkung auf die LTD im Subikulum und der Area CA1 einen interessanten Mechanismus für die unterschiedliche Signalverarbeitung in beiden Regionen. *In vivo* Studien haben gezeigt, dass die LTD in der Area CA1 an der Ausbildung von räumlichen Gedächtnisinhalten beteiligt ist und eine entscheidende Rolle bei der Unterscheidung von bekannten und neuen räumlichen Gedächtnisinhalten spielt (57–60). Welche Informationen die LTD im Subikulum repräsentiert, ist bislang jedoch weitestgehend unbekannt und bleibt damit eine interessante Fragestellung für neue Studienansätze.

## 7 Literatur

- 1 Dienes, Z. und Perner, J. A theory of implicit and explicit knowledge. *Behav. Brain Sci.* 1999;22:735–755.
- 2 Squire, L. R. und Zola, S. M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996;93:13515–13522.
- 3 Scoville, W. B. und Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1957;20:11–21.
- 4 Brun, V. H., Leutgeb, S., Wu, H.-Q., Schwarcz, R., Witter, M. P., Moser, E. I. und Moser, M.-B. Impaired spatial representation in CA1 after lesion of direct input from entorhinal cortex. *Neuron* 2008;57:290–302.
- 5 Deadwyler, S. A. und Hampson, R. E. Differential but complementary mnemonic functions of the hippocampus and subiculum. *Neuron* 2004;42:465–476.
- 6 Lever, C., Burton, S., Jeewajee, A., O’Keefe, J. und Burgess, N. Boundary vector cells in the subiculum of the hippocampal formation. *J. Neurosci.* 2009;29:9771–9777.
- 7 Malenka, R. C. und Bear, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 2004;44:5–21.
- 8 Amaral, D. G. und Witter, M. P. Hippocampal Formation. *The Rat Nervous System*. Hrsg. von G. Paxinos. 3rd. Elsevier Academic Press, 2004;21:635–704.
- 9 Witter, M. P., Groenewegen, H. J., Lopes da Silva, F. H. und Lohman, A. H. M. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog. Neurobiol.* 1989;33:161–253.
- 10 Tamamaki, N. und Nojyo, Y. Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus* 1993;3:471–480.
- 11 Menendez de la Prida, L., Totterdell, S., Gigg, J. und Miles, R. The subiculum comes of age. *Hippocampus* 2006;16:916–923.
- 12 Zeineh, M. M., Engel, S. A., Thompson, P. M. und Bookheimer, S. Y. Dynamics of the hippocampus during encoding and retrieval of face-name pairs. *Science* 2003;299:577–580.
- 13 Gabrieli, J. D. E., Brewer, J. B., Desmond, J. E. und Glover, G. H. Separate neural bases of two fundamental memory processes in the human medial temporal lobe. *Science* 1997;276:264–266.
- 14 Behr, J., Wozny, C., Fidzinski, P. und Schmitz, D. Synaptic plasticity in the subiculum. *Prog. Neurobiol.* 2009;89:334–342.
- 15 Martin, S. J., Grimwood, P. D. und Morris, R. G. M. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu. Rev. Neurosci.* 2000;23:649–711.
- 16 Neves, G., Cooke, S. F. und Bliss, T. V. P. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat. Rev. Neurosci.* 2008;9:65–75.



- 17 Wozny, C., Maier, N., Schmitz, D. und Behr, J. Two different forms of long-term potentiation at CA1-subiculum synapses. *J. Physiol.* 2008;586:2725–2734.
- 18 Wozny, C., Maier, N., Fidzinski, P., Breustedt, J., Behr, J. und Schmitz, D. Differential cAMP signaling at hippocampal output synapses. *J. Neurosci.* 2008;28:14358–14362.
- 19 Fidzinski, P., Shor, O. und Behr, J. Target-cell-specific bidirectional synaptic plasticity at hippocampal output synapses. *Eur. J. Neurosci.* 2008;27:1111–1118.
- 20 Scanziani, M., Malenka, R. C. und Nicoll, R. A. Role of intercellular interactions in heterosynaptic long-term depression. *Nature* 1996;380:446–450.
- 21 Wöhrl, R., Haebler, D. von und Heinemann, U. Low-frequency stimulation of the direct cortical input to area CA1 induces homosynaptic LTD and heterosynaptic LTP in the rat hippocampal-entorhinal cortex slice preparation. *Eur. J. Neurosci.* 2007;25:251–258.
- 22 Lisman, J. E. und Grace, A. A. The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 2005;46:703–713.
- 23 McGaugh, J. L. Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. *Annu. Rev. Neurosci.* 1989;12:255–287.
- 24 Myhrer, T. Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res. Rev.* 2003;41:268–287.
- 25 Cahill, L., Prins, B., Weber, M. und McGaugh, J. L. Beta-adrenergic activation and memory for emotional events. *Nature* 1994;371:702–704.
- 26 Roggenhofer, E., Fidzinski, P., Bartsch, J., Kurz, F., Shor, O. und Behr, J. Activation of dopamine D1/D5 receptors facilitates the induction of presynaptic long-term potentiation at hippocampal output synapses. *Eur. J. Neurosci.* 2010;32:598–605.
- 27 Roggenhofer, E., Fidzinski, P., Shor, O. und Behr, J. Reduced threshold for induction of LTP by activation of dopamine D1/D5 receptors at hippocampal CA1-subiculum synapses. *PLoS One* 2013;8:e62520.
- 28 Wójtowicz, A. M., Fidzinski, P., Heinemann, U. und Behr, J. Beta-adrenergic receptor activation induces long-lasting potentiation in burst-spiking but not regular-spiking cells at CA1-subiculum synapses. *Neuroscience* 2010;171:367–372.
- 29 Descarries, L., Audet, M. A., Doucet, G., Garcia, S., Oleskevich, S., Séguéla, P. et al. Morphology of Central Serotonin Neurons. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1990;600:81–92.
- 30 Pazos, A. und Palacios, J. M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res.* 1985;346:205–230.
- 31 Zilles, K., Schleicher, A., Glaser, T., Traber, J. und Rath, M. The ontogenetic development of serotonin (5-HT<sub>1</sub>) receptors in various cortical regions of the rat brain. *Anat. Embryol. (Berl)*. 1985;172:255–264.
- 32 Nichols, D. E. und Nichols, C. D. Serotonin receptors. *Chem. Rev.* 2008;108:1614–1641.

- 33 Hannon, J. und Hoyer, D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav. Brain Res.* 2008;195:198–213.
- 34 Shemarova, I. V. cAMP-dependent signal pathways in unicellular eukaryotes. *Crit. Rev. Microbiol.* 2009;35:23–42.
- 35 Mlinar, B., Mascalchi, S., Mannaioni, G., Morini, R. und Corradetti, R. 5-HT4 receptor activation induces long-lasting EPSP-spike potentiation in CA1 pyramidal neurons. *Eur. J. Neurosci.* 2006;24:719–731.
- 36 Kemp, A. und Manahan-Vaughan, D. The 5-hydroxytryptamine4 receptor exhibits frequency-dependent properties in synaptic plasticity and behavioural metaplasticity in the hippocampal CA1 region in vivo. *Cereb. Cortex* 2005;15:1037–1043.
- 37 Kulla, A. und Manahan-Vaughan, D. Modulation by serotonin 5-HT(4) receptors of long-term potentiation and depotentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Cereb. Cortex* 2002;12:150–162.
- 38 Fidzinski, P., Wawra, M., Dugladze, T., Gloveli, T., Heinemann, U. und Behr, J. Low-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces heterosynaptic disinhibition in the subiculum. *Hippocampus* 2011;21:733–743.
- 39 Fidzinski, P., Wawra, M., Bartsch, J., Heinemann, U. und Behr, J. High-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces input-specific long-term potentiation in subicular bursting cells. *Brain Res.* 2012;1430:1–7.
- 40 Wawra, M., Fidzinski, P., Heinemann, U., Mody, I. und Behr, J. 5-HT4-Receptors modulate induction of long-term depression but not potentiation at hippocampal output synapses in acute rat brain slices. *PLoS One* 2014;9:e88085.
- 41 Gloveli, T., Schmitz, D., Empson, R. M., Dugladze, T. und Heinemann, U. Morphological and electrophysiological characterization of layer III cells of the medial entorhinal cortex of the rat. *Neuroscience* 1997;77:629–648.
- 42 The R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing.* 2012.
- 43 Faber, D. S. und Korn, H. Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *Biophys. J.* 1991;60:1288–1294.
- 44 Zucker, R. S. und Regehr, W. G. Short-term synaptic plasticity. *Annu. Rev. Physiol.* 2002;64:355–405.
- 45 Behr, J., Gloveli, T. und 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;10:1011–1018.
- 46 Baks-Te Bulte, L., Wouterlood, F. G., Vinkenoog, M. und Witter, M. P. Entorhinal projections terminate onto principal neurons and interneurons in the subiculum: a quantitative electron microscopical analysis in the rat. *Neuroscience* 2005;136:729–739.
- 47 Gigg, J., Finch, D. M. und O’Mara, S. M. Responses of rat subicular neurons to convergent stimulation of lateral entorhinal cortex and CA1 in vivo. *Brain Res.* 2000;884:35–50.

- 48 Wigström, H. und Gustafsson, B. Facilitated induction of hippocampal long-lasting potentiation during blockade of inhibition. *Nature* 1983;301:603–604.
- 49 Buzsáki, G. Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog. Neurobiol.* 1984;22:131–153.
- 50 Lien, C.-C., Mu, Y., Vargas-Caballero, M. und Poo, M.-m. Visual stimuli-induced LTD of GABAergic synapses mediated by presynaptic NMDA receptors. *Nat. Neurosci.* 2006;9:372–380.
- 51 Steward, O. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.* 1976;167:285–314.
- 52 Fyhn, M., Molden, S., Witter, M. P., Moser, E. I. und Moser, M.-B. Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 2004;305:1258–1264.
- 53 Hafting, T., Fyhn, M., Molden, S., Moser, M.-B. und Moser, E. I. Microstructure of a spatial map in the entorhinal cortex. *Nature* 2005;436:801–806.
- 54 Naber, P. A., Witter, M. P. und Lopes da Silva, F. H. Networks of the hippocampal memory system of the rat: the pivotal role of the subiculum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000;911:392–403.
- 55 Claeysen, S., Sebben, M., Becamel, C., Bockaert, J. und Dumuis, A. Novel brain-specific 5-HT<sub>4</sub> receptor splice variants show marked constitutive activity: role of the C-terminal intracellular domain. *Mol. Pharmacol.* 1999;55:910–920.
- 56 Mialet, J., Berque-Bestel, I., Eftekhari, P., Gastineau, M., Giner, M., Dahmoune, Y. et al. Isolation of the serotonergic 5-HT<sub>4</sub>(e) receptor from human heart and comparative analysis of its pharmacological profile in C6-glia and CHO cell lines. *Br. J. Pharmacol.* 2000;129:771–781.
- 57 Kemp, A. und Manahan-Vaughan, D. Hippocampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101:8192–8197.
- 58 Kemp, A. und Manahan-Vaughan, D. Hippocampal long-term depression: master or minion in declarative memory processes? *Trends Neurosci.* 2007;30:111–118.
- 59 Kemp, A. und Manahan-Vaughan, D. The hippocampal CA1 region and dentate gyrus differentiate between environmental and spatial feature encoding through long-term depression. *Cereb. Cortex* 2008;18:968–977.
- 60 Goh, J. J. und Manahan-Vaughan, D. Spatial object recognition enables endogenous LTD that curtails LTP in the mouse hippocampus. *Cereb. Cortex* 2013;23:1118–1125.

## 8 Ausgewählte Publikationen mit Anteilserklärung

Der Promovend hat folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

1. Fidzinski, P., **Wawra, M.**, Dugladze, T., Gloveli, T., Heinemann, U., Behr, J. (2011). Low-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces heterosynaptic disinhibition in the Subiculum. *Hippocampus* 21(7), 733–743.
  - Impact Factor 2011: 5,176.
  - Anteil: 10 %.
  - Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Messungen, Auswertung elektrophysiologischer Daten, Erstellung von Abbildungen.
2. Fidzinski, P., **Wawra, M.**, Bartsch, J., Heinemann, U., Behr, J. (2012). High-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces input-specific long-term potentiation in subicular bursting cells. *Brain Research* 1430(1), 1–7.
  - Impact Factor 2012: 2,879.
  - Anteil: 20 %.
  - Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit am Studiendesign, Durchführung von Messungen, Auswertung elektrophysiologischer Daten, Erstellung von Abbildungen.
3. **Wawra, M.**, Fidzinski, P., Heinemann, U., Mody, I., Behr, J. (2014). 5-HT4-receptors modulate induction of long-term depression but not potentiation at hippocampal output synapses in acute rat brain slices. *PLOS ONE* 9(2), e88085.
  - Impact Factor 2013: 3,534.
  - Anteil: 70 %.
  - Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit am Studiendesign, Durchführung der Messungen, Auswertung elektrophysiologischer Daten, Erstellung der Abbildungen, Mitarbeit bei der Erstellung des Manuskripts.

Berlin	15. September 2014	.....
.....	.....	.....
Ort	Datum	Matthias Wawra

### 8.1 Fidzinski et al. (2011) *Hippocampus*

Publikation 1 wird in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht, da keine Genehmigung des Verlages hierfür vorliegt.

Fidzinski, P., Wawra, M., Dugladze, T., Gloveli, T., Heinemann, U. und Behr, J. Low-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces heterosynaptic disinhibition in the subiculum. *Hippocampus* 2011;21:733–743.

<http://dx.doi.org/10.1002/hipo.20791>

## 8.2 Fidzinski et al. (2012) *Brain Research*

Publikation 2 wird in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht, da keine Genehmigung des Verlages hierfür vorliegt.

Fidzinski, P., Wawra, M., Bartsch, J., Heinemann, U. und Behr, J. High-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces input-specific long-term potentiation in subicular bursting cells. *Brain Res.* 2012;1430:1–7.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.10.040>

# 5-HT<sub>4</sub>-Receptors Modulate Induction of Long-Term Depression but Not Potentiation at Hippocampal Output Synapses in Acute Rat Brain Slices

Matthias Wawra<sup>1,2,3</sup>, Pawel Fidzinski<sup>4</sup>, Uwe Heinemann<sup>2,3</sup>, Istvan Mody<sup>3,5</sup>, Joachim Behr<sup>1,2,6\*</sup>

**1** Department of Psychiatry and Psychotherapy, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Berlin, Germany, **2** Institute of Neurophysiology, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Berlin, Germany, **3** Exzellenzcluster NeuroCure, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Berlin, Germany, **4** Department of Neurology, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Berlin, Germany, **5** Department of Neurology, David Geffen School of Medicine, University of California Los Angeles, Los Angeles, California, United States of America, **6** Department of Psychiatry, Psychotherapy and Psychosomatics, Ruppiner Kliniken, Neuruppin, Brandenburg, Germany

## Abstract

The subiculum is the principal target of CA1 pyramidal cells and mediates hippocampal output to various cortical and subcortical regions of the brain. The majority of subicular pyramidal cells are burst-spiking neurons. Previous studies indicated that high frequency stimulation in subicular burst-spiking cells causes presynaptic NMDA-receptor dependent long-term potentiation (LTP) whereas low frequency stimulation induces postsynaptic NMDA-receptor-dependent long-term depression (LTD). In the present study, we investigate the effect of 5-hydroxytryptamine type 4 (5-HT<sub>4</sub>) receptor activation and blockade on both forms of synaptic plasticity in burst-spiking cells. We demonstrate that neither activation nor block of 5-HT<sub>4</sub> receptors modulate the induction or expression of LTP. In contrast, activation of 5-HT<sub>4</sub> receptors facilitates expression of LTD, and block of the 5-HT<sub>4</sub> receptor prevents induction of short-term depression and LTD. As 5-HT<sub>4</sub> receptors are positively coupled to adenylate cyclase 1 (AC1), 5-HT<sub>4</sub> receptors might modulate PKA activity through AC1. Since LTD is blocked in the presence of 5-HT<sub>4</sub> receptor antagonists, our data are consistent with 5-HT<sub>4</sub> receptor activation by ambient serotonin or intrinsically active 5-HT<sub>4</sub> receptors. Our findings provide new insight into aminergic modulation of hippocampal output.

**Citation:** Wawra M, Fidzinski P, Heinemann U, Mody I, Behr J (2014) 5-HT<sub>4</sub>-Receptors Modulate Induction of Long-Term Depression but Not Potentiation at Hippocampal Output Synapses in Acute Rat Brain Slices. PLoS ONE 9(2): e88085. doi:10.1371/journal.pone.0088085

**Editor:** Thierry Amédée, Centre national de la recherche scientifique, University of Bordeaux, France

**Received:** July 18, 2013; **Accepted:** January 6, 2014; **Published:** February 5, 2014

**Copyright:** © 2014 Wawra et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by German Research Foundation (DFG, www.dfg.de) grants to JB. (BE 2011/6-1) and MW. (GRK 1123, NeuroCure, www.neurocure.de). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: joachim.behr@charite.de

## Introduction

Activity-dependent changes in synaptic strength are thought to be one of the cellular mechanisms underlying learning and memory [1–3]. Two different forms of long-lasting synaptic plasticity have been characterized, long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) [4]. Both forms of synaptic plasticity have been intensively studied in the CA1 and CA3 areas of the hippocampus, based on their established role in formation of spatial memory [4].

The subiculum (Sub) is the principal target of CA1 pyramidal cells and the major hippocampal output structure [5], as subicular pyramidal cells project to numerous cortical and subcortical structures [5,6]. Pyramidal cells in the subiculum have been characterized according to their firing properties as regular-spiking (RS) and burst-spiking (BS) cells. In response to depolarizing current injection, BS cells fire a burst of action potentials (AP) followed by single APs whereas RS neurons fire a train of single action potentials [7,8]. In most studies, BS cells outnumber RS cells in rodents by approximately two to one [6,8] (but see [9]). *In vivo* and *in vitro* studies failed to induce LTD in field potential recordings [10,11]. Intracellular recordings, however, showed that low frequency stimulation (LFS) induces LTD in BS cells but LTP in RS cells [12]. This finding indicates that in field potential

recordings, LTD in BS cells seems to be masked by a simultaneous LTP in RS cells.

The subiculum receives a strong serotonergic input from the raphe nuclei [13–15]. *In vivo* experiments have shown that different serotonergic receptor subtypes have a distinct impact on learning and memory performance under various experimental conditions (for reviews, see [16–18]). The 5-hydroxytryptamine type 4 (5-HT<sub>4</sub>) receptor is ubiquitously expressed in the hippocampus and positively coupled to intracellular adenylate cyclase 1 (AC1) [19–23]. Although it has been shown that activation of 5-HT<sub>4</sub> receptors modulates network plasticity in the CA1 and the dentate gyrus of the hippocampus *in vitro* [24] and *in vivo* [25,26], little is known about the effect of this receptor on synaptic plasticity at hippocampal output synapses. In the present study we demonstrate that 5-HT<sub>4</sub> receptor activation enhances LTD whereas blockade of this receptor prevents induction of LTD in subicular BS cells.

## Materials and Methods

All procedures were performed in accordance with national and international guidelines (EC Directive 86/609/EEC for animal experiments) and were approved by the local health authority (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin). Male Wistar rats

(4–6 weeks) were decapitated under deep ether anesthesia and the brains were quickly removed. Horizontal slices (400  $\mu\text{m}$ ) containing the hippocampal formation and the entorhinal cortex (EC) were prepared using a VT1200S vibroslicer (Leica Microsystems GmbH, Germany). The tissue was prepared in ice-cold, oxygenated (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) composed of (in mM): NaCl 129, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, NaHCO<sub>3</sub> 26, KCl 3, CaCl<sub>2</sub> 1.6, MgSO<sub>4</sub> 1.8, glucose 10 at a pH of 7.4, and stored for later use in an interface chamber at 34°C. As in all experiments GABA<sub>A</sub> receptor-mediated transmission was blocked by bicuculline (5–10  $\mu\text{M}$ ), the concentration of MgSO<sub>4</sub> and CaCl<sub>2</sub> was elevated to 4 mM each in the recording medium in order to prevent epileptiform discharges [27–29]. In previous work we showed that increased Mg<sup>2+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-levels as well as blockade of inhibition are not related to bursting [30,31].

Single cell recordings in the pyramidal cell layer (middle-to-distal portion) of the subiculum were performed at 32°–34°C with sharp microelectrodes (50–80 M $\Omega$ ) filled with 2.5 M potassium acetate.

Recordings were performed in current-clamp bridge mode using a SEC10LX amplifier (NPI Electronic, Tamm, Germany), an ITC-16 interface (Instrutech Corp., Great Neck, NY, USA) and TIDA software (Version 5.050, HEKA GmbH, Lambrecht, Germany). Signals were low-pass filtered at 3 kHz, sampled and processed at 10 kHz.

For characterization of cellular discharge and membrane properties, hyper- and depolarizing current steps (200 ms, -0.1 to 1.2 nA) were applied. Excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) were evoked by constant voltage stimulation (100  $\mu\text{s}$  stimulus, 1 to 10 V) of CA1 efferents with an ACSF-filled patch pipette in stratum oriens of CA1. To avoid activation of the trisynaptic hippocampal loop, CA1-Sub-EC minislices were used. The amplitudes of evoked EPSPs were set to 30–50% of the maximum response for LTP experiments and to 50–80% for LTD experiments.  $T_{\text{rise}}$  and  $T_{\text{decay}}$  were defined as the time between 20 and 80% of the rising phase and the time between 100 and 37% of the decaying phase of the EPSP, respectively. Analyses for  $T_{\text{rise}}$  and  $T_{\text{decay}}$  were performed with R software (version 2.15.2) and the minpack.lm library (version 1.1–6) [32,33].

For activation of the 5-HT<sub>4</sub> receptor we used the potent and highly selective partial agonist RS 67333 (5–10  $\mu\text{M}$ ) [34–36]. For block of the 5-HT<sub>4</sub> receptor we used the potent and selective antagonists RS 39604 [36,37] and GR 113808 [36,38].

Recordings of isolated NMDA receptor-mediated EPSPs were performed in the presence of the AMPA receptor antagonist CNQX (30  $\mu\text{M}$ ) and the GABA<sub>B</sub> receptor antagonist CGP55845 (20  $\mu\text{M}$ ). For inhibiting the cAMP dependent protein kinase (PKA), slices were pre-incubated with H 89 (10  $\mu\text{M}$ ) for a minimum of 60 minutes.

Synaptic responses were evoked every 10 s. For induction of synaptic plasticity, three different stimulation protocols were used: low-frequency stimulation (LFS) consisting of 900 paired pulses (50 ms inter-stimulus interval) applied at 1 Hz, subthreshold high-frequency stimulation (stHFS) consisting of one train of 10 pulses applied at 40 Hz, and high-frequency stimulation (HFS) consisting of four trains of 100 pulses at 100 Hz with an inter-train interval of 9 seconds. Changes in synaptic strength were measured for at least 30 min after termination of the stimulation protocol and were expressed either as a percentage of the normalized baseline amplitudes at 20–25 min after the stimulation protocol or as the difference in the initial EPSP slope which was defined as the amplitude between 20% and 80% of the EPSP divided by the time. Unless otherwise stated, Student's t-test (paired and non-paired) or analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Tu-

keyHSD-test [32] were used where appropriate. Statistical significance level was set to  $p < 0.05$  and is marked in figures by asterisks (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Analysis of the paired-pulse ratio (PPR) was applied to obtain evidence for presynaptic or postsynaptic modifications of synaptic transmission [39]. The PPR was defined as the response ratio (second EPSP amplitude/first EPSP amplitude) to a pair of stimuli given at an interstimulus interval of 50 ms.

Except for CNQX (Ascent Scientific, UK) all substances were obtained from Tokris (UK) and dissolved and stored as stock solutions at 1000 times the end concentration in distilled water, with the exception of RS 39604 and CGP 55845 which were dissolved in DMSO and GR 113808 which was dissolved in 1 eq. HCl. Except for RS 67333 and RS 39604 (see Results), all drugs were applied throughout the entire course of the experiment and for at least 5 min prior to recording.

## Results

### Effects of 5-HT<sub>4</sub> receptors on synaptic and intrinsic properties of subicular pyramidal neurons

Subicular pyramidal cells are divided in two main groups, burst spiking (BS) and regular spiking (RS) non-bursting cells [7,8,40–42]. BS neurons are predominant in the subiculum [6] and upon depolarizing current injections generate a burst of action potentials followed by single action potentials (Fig. 1A), whereas RS neurons generate a series of single action potentials (Fig. 1B). We obtained and analyzed sharp microelectrode recordings from 105 burst-spiking neurons. The mean resting membrane potential was  $-65.0 \pm 0.4$  mV and the mean input resistance  $31.1 \pm 0.7$  M $\Omega$ . Neither the 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist RS 67333 nor the 5-HT blocker RS 39604 altered intrinsic properties (Table 1). There was also no detectable effect on CA1 stimulus-induced excitatory postsynaptic potentials in CA1-Sub minislices (Fig. 1C/D).

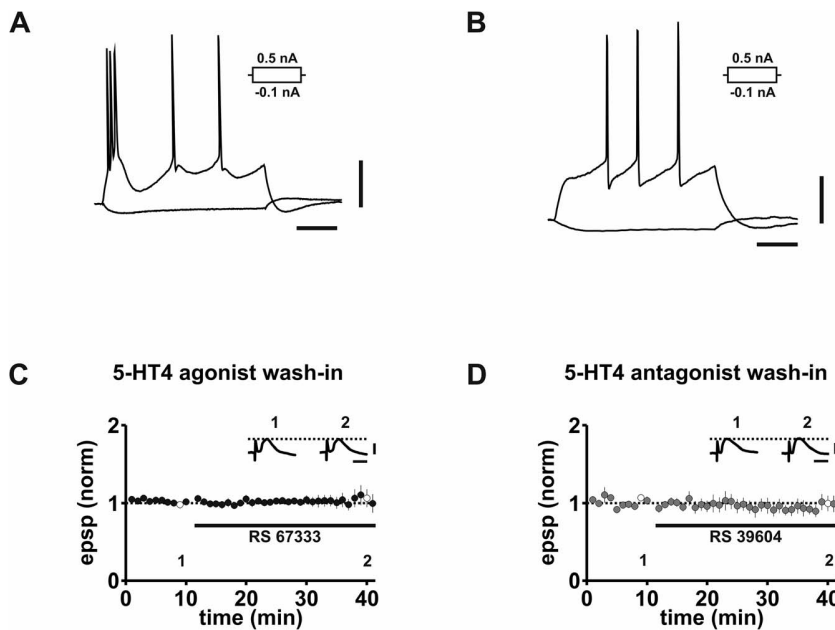
Regular spiking neurons had a mean resting potential of  $-69.3 \pm 1.0$  mV and a mean input resistance of  $34.0 \pm 2.2$  M $\Omega$  ( $n = 12$ ). Like in BS cells, activation or blockade of the 5-HT<sub>4</sub> receptors had no effect on synaptic or intrinsic properties (Table S1, Fig. S1A/B). In the present study, we subsequently focused on the effect of 5-HT<sub>4</sub> receptor-activation on synaptic plasticity in BS cells.

### Effect of 5-HT<sub>4</sub> receptors on LTP

In control experiments, HFS of CA1 fibers in stratum oriens in area CA1 induced a cellular LTP of  $245.4 \pm 41.4\%$  of baseline response ( $n = 7$ ,  $p < 0.01$ , Fig. 2A1). Application of the 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist RS 67333 ( $266.4 \pm 42.9\%$  of baseline response,  $n = 8$ ,  $p < 0.01$ , Fig. 2A2), or of the receptor antagonist RS 39604 ( $251.2 \pm 44.0\%$  of baseline response,  $n = 8$ ,  $p < 0.01$ , Fig. 2A3) had no significant effects either on the induction or on the expression of LTP in BS cells (ANOVA, one-way,  $F(2,20) = 0.055$ ,  $p = 0.95$ ; see also Table S2). In the presence of the 5-HT<sub>4</sub> receptor agonist RS 67333, we observed a more stabilized LTP during its initial phase in comparison to control experiments. The amount of LTP 30 min after HFS, however, was not significantly different.

To determine whether activation of 5-HT<sub>4</sub> receptors has a facilitating effect on synaptic potentiation, we applied a subthreshold conditioning high-frequency stimulation protocol (stHFS) that failed to induce LTP in control experiments ( $112.7 \pm 12.7\%$  of baseline response,  $n = 7$ ,  $p = 0.39$ , Fig. 2B1) [43]. LTP could still not be induced by stHFS in the presence of the 5-HT<sub>4</sub> agonist RS 67333 ( $103.8 \pm 5.1\%$  of baseline response,  $n = 8$ ,  $p = 0.55$ , Fig. 2B2), or in the presence of the receptor antagonist RS 39604 ( $107.6 \pm 11.4\%$  of baseline,  $n = 6$ ,  $p = 0.49$ , Fig. 2B3).





**Figure 1. Effect of 5-HT4 receptors on synaptic and intrinsic properties of subicular BS neurons.** A: Voltage responses of a burst-spiking subicular neuron upon depolarizing and hyperpolarizing current pulses. B: Voltage responses of a regular-spiking subicular neuron to depolarizing and hyperpolarizing current pulse. C: The 5-HT4 receptor agonist RS 67333 does not modulate EPSP responses during 30 minutes of wash-in. D: The 5-HT4 receptor antagonist RS 39604 does not alter EPSP responses during 30 minutes of wash-in. Scale bars: 20 mV and 50 ms (B); 2 mV and 20 ms (C1, D1).

doi:10.1371/journal.pone.0088085.g001

Comparison of all three groups showed no statistically significant differences (ANOVA, one-way,  $F(2,18) = 0.187$ ,  $p = 0.83$ ).

### 5-HT4 receptors modulate LTD

As in our previous study [12], LFS caused LTD of synaptic potentials to  $67.8 \pm 7.4\%$  of the baseline response ( $n = 7$ ,  $p < 0.01$ , Fig. 3A1). In presence of the 5-HT4 receptor agonist RS 67333, LTD was significantly enhanced to  $40.5 \pm 4.8\%$  of the baseline response ( $n = 7$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 3A2). In contrast, LTD was blocked in the presence of two different 5-HT4 receptor antagonists (RS 39604:  $99.8 \pm 7.2\%$  of the baseline response,  $n = 8$ ,  $p = 0.95$ ,

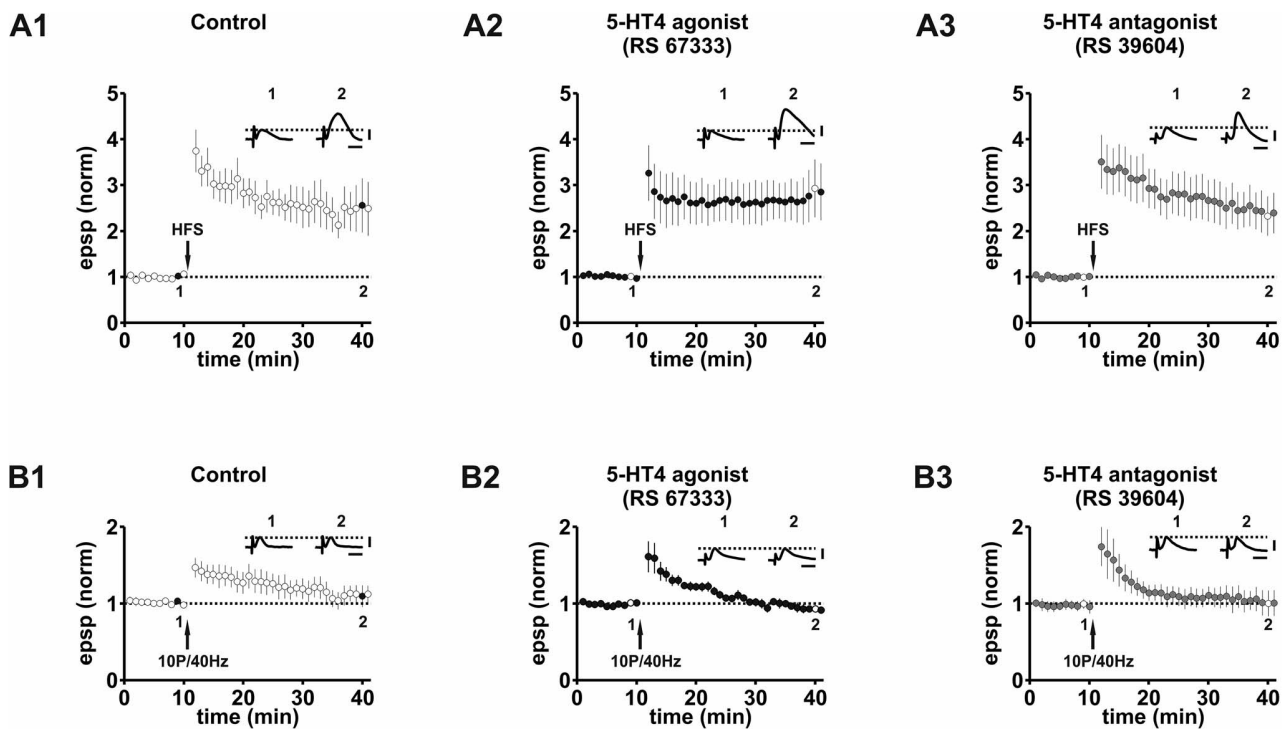
Fig. 3A3; GR 113808:  $100.6 \pm 24.3\%$  of the baseline response,  $n = 6$ ,  $p = 0.98$ , Fig. 3A4). Differences in LTD between control, and in the presence of the 5-HT4 agonist RS 67333 and the 5-HT4 antagonist RS 39604 were significant (ANOVA, one-way,  $F(2,19) = 17.572$ ,  $p < 0.001$ ; post-hoc: control vs. RS 67333:  $p < 0.05$ , control vs. RS 39604:  $p < 0.05$ , RS 67333 vs. RS 39604:  $p < 0.001$ , Fig. 3B). Comparable results were obtained when analyzing the initial slope of EPSPs instead of EPSP amplitudes (Table S2).

The induction of LTD in subicular BS neurons depends on NMDA receptor activation and the increase of postsynaptic  $Ca^{2+}$  concentration [12]. To determine whether 5-HT4 receptor activation alters NMDA receptor mediated potentials, we investigated the effect of 5-HT4 receptor activation on isolated NMDA receptor-mediated EPSPs at resting membrane potential. The 5-HT4 receptor agonist RS 67333 did not alter the amplitudes ( $108.4 \pm 7.9\%$  of baseline,  $n = 5$ ,  $p = 0.32$ , Fig. 3E), and rise or decay times ( $T_{rise} = 11.0 \pm 1.1$  ms vs.  $12.0 \pm 1.1$  ms after wash-in,  $n = 5$ ,  $p = 0.12$ ;  $T_{decay} = 28.4 \pm 3.1$  ms vs.  $30.4 \pm 2.9$  ms after wash-in,  $n = 6$ ,  $p = 0.22$ ) of isolated NMDA receptor EPSPs. To study the effect of 5-HT4 receptors on the induction phase of LTD, we analyzed EPSP amplitudes during LFS. Comparison of the three groups (control, RS 67333, RS 39604) showed significant differences (ANOVA, one-way,  $F(2,19) = 9.811$ ,  $p < 0.01$ ). Under control condition and in experiments with the 5-HT4 agonist RS 67333, we observed a significant decline of EPSP amplitudes during the course of LFS which was not statistically different between the two groups (control:  $46.5 \pm 9.4\%$  of baseline response,  $n = 7$ ,  $p < 0.01$ ; RS 67333:  $23.6 \pm 3.2\%$  of baseline response,  $n = 7$ ,  $p < 0.001$ ; control vs. RS 67333  $p = 0.35$ ; Fig. 3C). In contrast, there was no significant depression if the 5-HT4 receptor was blocked by the antagonist RS 39604 ( $90.7 \pm 13.8\%$  of baseline response,  $n = 8$ ,  $p = 0.55$ ; RS 39604 vs. RS 67333:  $p < 0.01$ ; RS

**Table 1.** Synaptic and membrane properties of BS-cells in the subiculum before and after application of 5-HT4 receptor ligands.

	RS 67333 (10 $\mu$ M)		RS 39604 (25 $\mu$ M)	
	Baseline	Wash-in	Baseline	Wash-in
<b>EPSP (% of Baseline)</b>	$102.0 \pm 8.3$ ( $n = 7$ , $p = 0.85$ )	$93.1 \pm 8.0$ ( $n = 6$ , $p = 0.48$ )		
<b>Rise-time (ms)</b>	$3.4 \pm 0.4$ ( $n = 6$ , $p = 0.54$ )	$3.3 \pm 0.4$	$3.8 \pm 0.6$ ( $n = 4$ , $p = 0.26$ )	$3.5 \pm 0.5$
<b>Decay-time (ms)</b>	$10.9 \pm 1.3$ ( $n = 6$ , $p = 0.79$ )	$11.0 \pm 1.4$	$14.5 \pm 1.6$ ( $n = 5$ , $p = 0.42$ )	$14.1 \pm 1.4$
<b>RMP (mV)</b>	$-73.0 \pm 3.1$ ( $n = 5$ , $p = 0.83$ )	$-73.4 \pm 3.7$	$-64.6 \pm 1.6$ ( $n = 6$ , $p = 0.12$ )	$-65.6 \pm 2.0$
<b>R<sub>in</sub> (M<math>\Omega</math>)</b>	$29.7 \pm 6.4$ ( $n = 5$ , $p = 0.67$ )	$30.6 \pm 7.6$	$40.6 \pm 2.5$ ( $n = 6$ , $p = 0.44$ )	$39.2 \pm 3.5$

Data given as means  $\pm$  SEM.  
doi:10.1371/journal.pone.0088085.t001



**Figure 2. Effect of 5-HT4 receptors on LTP.** A1: HFS induces LTP under control conditions. A2: The 5-HT4 receptor agonist RS 67333 does not alter LTP. A3: The 5-HT4 receptor antagonists RS 39604 does not modulate LTP. B1: stHFS induces PTP but not LTP under control conditions. B2: The 5-HT4 receptor agonist RS 67333 failed to prime LTP after stHFS. B3: The 5-HT4 receptor antagonist RS 39604 failed to facilitate the induction of LTP after stHFS. Scale bars: 2 mV and 20 ms. doi:10.1371/journal.pone.0088085.g002

39604 vs. control:  $p < 0.03$ ; Fig. 3C). When the 5-HT4 receptor was blocked by GR 113808 we recorded a small but not significant depression of EPSP amplitudes during LFS ( $75.2 \pm 12.1\%$  of baseline response,  $n = 5$ ,  $p = 0.14$ , Fig. 3C, not included in the ANOVA). These data support the notion, that 5-HT4 receptor-activation affects synaptic plasticity at the short term scale. Consistent with our previous study [12], the analysis of the paired-pulse ratio before and after induction of LTD showed no difference and provided no evidence for a presynaptic expression of LTD (control: PPR  $1.25 \pm 0.27$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.26$ ; RS67333: PPR  $1.17 \pm 0.8$ ,  $n = 7$ ,  $p = 0.55$ ; RS39604: PPR  $1.11 \pm 0.07$ ,  $n = 8$ ,  $p = 0.17$ ).

5-HT4 receptors are positively coupled to AC1 and therefore, their activation elevates intracellular cAMP levels. We studied the effect of inhibition of cAMP dependent PKA on LTD induction and found that LTD was strongly reduced in the presence of the PKA inhibitor H 89 ( $89.2 \pm 5.2\%$  of baseline,  $n = 6$ ,  $p = 0.12$ , Fig. 3D1). In addition, the facilitated LTD in the presence of the 5-HT4 receptor agonist RS 67333 was likewise prevented when the PKA inhibitor H 89 was applied ( $97.1 \pm 9.5\%$  of baseline,  $n = 7$ ,  $p = 0.80$ , Fig. 3D2).

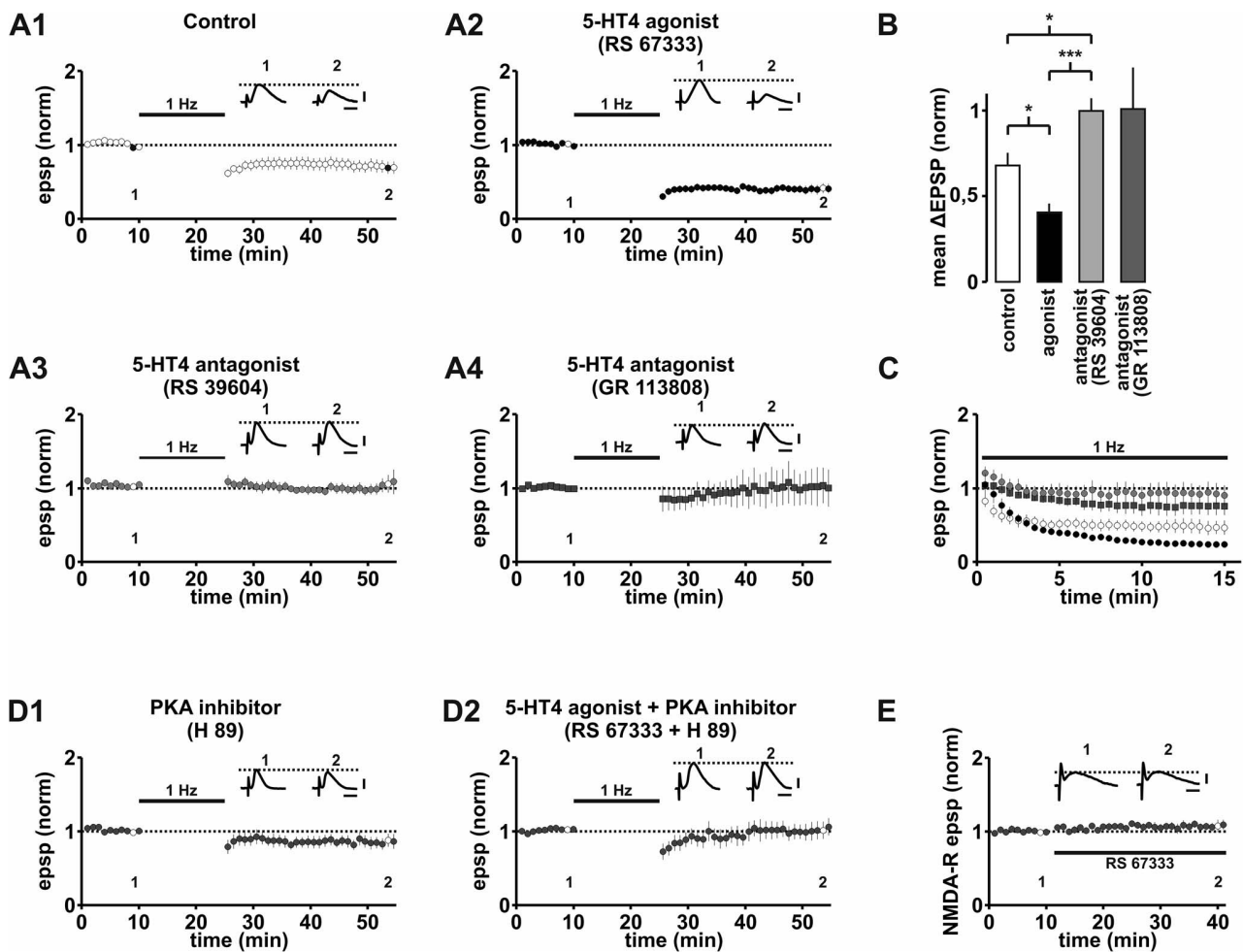
## Discussion

In the present study, we show that 5-HT4 receptors modulate activity-dependent LTD but not LTP in subicular BS cells. We demonstrate that activation of 5-HT4 receptors by the agonist RS 67333 increases LTD, while blockade of the receptor by the antagonists RS 39604 or GR 113808 prevents LTD. Our data indicate that 5-HT4 receptor activation facilitates postsynaptic LTD. The paired-pulse ratios did not change after LTD induction,

providing no evidence for a presynaptic expression of LTD. Analyses of EPSP amplitudes during the course of LFS demonstrate that 5-HT4 receptors have also an effect on short term depression (STD). Since STD is a known presynaptic effect due to depletion of presynaptic vesicles in the course of the stimulation [39], our results indicate that 5-HT4 receptors have independent effects on the presynaptic (STD) and postsynaptic (LTD) function. Application of 5-HT4 agonists or antagonists has no effect on BS cells' resting membrane potential, input resistance, EPSP amplitude or EPSP kinetics.

In our experiments, we did not observe a clear-cut effect of 5-HT4 modulating agents on suprathreshold or subthreshold LTP induction. Though we observed a slight difference in the initial time course of EPSP amplitudes between the 5-HT4 agonist and the two other experimental conditions (control, 5-HT4 antagonist), the amount of LTP was not significantly different 30 minutes after induction.

We have to consider, that RS 67333 like other 5-HT4 agonist may interact with other receptors as well. Hence, the observed effect might not be mediated solely by an action on 5-HT4 receptors. Since LTD was blocked in the presence of 5-HT4 receptor antagonists, however, our data suggest that 5-HT4 receptors are active, possibly due to the presence of ambient serotonin [24] or to its activity-dependent release. Alternatively, brain specific splice variants of the 5-HT4 receptor with high intrinsic activity might be affected by application of 5-HT4 antagonists with inverse agonist activity like GR 113808 [44,45]. Since inverse agonist activity is not shown for RS 39604 [45], 5-HT4 receptor activation by ambient serotonin seems to be more likely.



**Figure 3. 5-HT4 receptors modulate LTD.** A1: LFS induces LTD under control conditions. A2: Activation of 5-HT4-receptors significantly facilitates LTD. A3/4: Blockade of 5-HT4-receptors through RS 39604 or GR 113808 prevented LTD. B: Summary of changes in synaptic strength illustrated in A1-4. The antagonist GR 13808 is not included in the ANOVA. C: Averaged time courses of normalized EPSP responses during LFS. Control: white circles, RS 67333: black circles, RS 39604: gray circles, GR 113808: dark gray squares. D1: The PKA inhibitor H 89 prevented LTD under control conditions. D2: H 89 prevented LTD even in the presence of the 5-HT4 receptor agonist RS 67333. E: A 5-HT4 receptor agonist failed to modulate NMDA receptor mediated EPSPs during 30 minutes wash-in. Scale bars: 2 mV and 20 ms (A,D), 1 mV and 20 ms (E). doi:10.1371/journal.pone.0088085.g003

Our data indicate that 5-HT4 receptor activation modulates LTD which is blocked by the PKA-inhibitor H 89. 5-HT4 receptors are positively coupled to AC1 through a G protein ( $G_s$ ). Though H 89 is known to block various kinases, and other signaling cascades cannot entirely be excluded, it is feasible that the modulation of LTD by 5-HT4 receptors is mediated by the AC1-cAMP-PKA-cascade [19–23,46]. Previous reports showed that LTD in subicular BS cells depends on NMDA receptors and requires the increase of postsynaptic  $Ca^{2+}$  [12]. Although PKA can potentiate NMDA receptor mediated currents by phosphorylation [47], our results provide no evidence that 5-HT4 receptor activation modulates the kinetic of NMDA receptor-mediated EPSPs in BS cells.

In various experimental tasks including the Morris water maze, the social olfactory recognition task, the olfactory associative discrimination task or the two-trial recognition task, *in vivo* application of 5-HT4 agonists improves the performance of the animals [34,48–52] supporting an important role of 5-HT4 receptors in learning and memory. There is also growing evidence that 5-HT4 receptors may play a role in Alzheimer's disease and

might be a promising target for treatment of memory impairments [53–56]. Interestingly, Kemp and Manahan-Vaughan demonstrated that blockade or activation of 5-HT4 receptors modulates LTD in the CA1 *in vivo* [26] suggesting that the modulatory effect is not restricted to the subiculum. As in the present study, activation of 5-HT4 receptors did not modulate LTP [26], but in sharp contrast to our findings, activation of the receptor blocked LTD and blockade of the receptor lowered the threshold for LTD induction. Notably, the same group showed that exposure to a novel object-place configuration lowered the threshold for the induction of LTD in CA1 [57]. This facilitation could be blocked by *in vivo* administration of a 5-HT4 receptor agonist before exposure to the novel object-place configuration [57].

A major difference between CA1 and subicular pyramidal neurons resides in their discharge behavior. Whereas most CA1 pyramidal neurons exhibit regular-spiking behavior [58], the majority of subicular pyramidal neurons fire high-frequency bursts of action potentials in response to current injection. As burst-spiking has been shown to be important for neuronal signaling and plasticity [59,60], the abundance of burst-spiking neurons in the

subiculum suggests that they may be critical to the encoding and processing of hippocampal output information. *In vivo* experiments indicate that the subiculum operates earlier than the hippocampus in a limited time frame of 10–15 s to encode and maintain new information in a highly accurate and specific manner [61]. This process is followed by an increasing participation of CA1 in the encoding and retrieval of this information. These data support the hypothesis that the subiculum occupies a pivotal position in the hippocampal memory system, where it receives raw information directly from peri- and postrhinal cortices and processes information via the entorhinal–hippocampal polysynaptic circuit [62]. The subiculum may thus act as a detector and distributor of sensory information that takes into account the novelty and relevance of signals arriving from CA1 [62,63]. The contrasting effect of 5-HT4 receptor activation on LTD in the CA1 and subiculum supports the hypothesis of different but complementary information processing of these two hippocampal output regions [61].

## Supporting Information

**Figure S1 Effect of 5-HT4 receptors on synaptic and intrinsic properties of subicular RS neurons.** A1, A2: The 5-HT4 receptor agonist RS 67333 does not modulate EPSP responses, input resistance ( $R_{in}$ ) or resting membrane potential

(RMP) during 30 minutes of wash-in. B1, B2: The 5-HT4 receptor antagonist RS 39604 does not alter EPSP responses, input resistance ( $R_{in}$ ) or resting membrane potential (RMP) during 30 minutes of wash-in. Scale bars: 2 mV and 20 ms. (PDF)

**Table S1 Synaptic and membrane properties of RS-cells in the subiculum before and after application of 5-HT4 receptor ligands.**

(PDF)

**Table S2 Normalized mean delta of the initial slope of EPSPs of BS-cells in the subiculum after HFS or LFS in control condition and after application of 5-HT4 receptor ligands.**

(PDF)

## Acknowledgments

We thank Kate Gilling for critical reading of the manuscript and O. Maassen and K. Berlin for excellent technical assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JB IM UH PF MW. Performed the experiments: MW. Analyzed the data: PF MW. Contributed reagents/materials/analysis tools: JB PF UH MW. Wrote the paper: JB MW.

## References

- Martin SJ, Grimwood PD, Morris RGM (2000) Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23: 649–711.
- Malenka RC, Nicoll RA (1999) Long-Term Potentiation—A Decade of Progress? *Science* (80- ) 285: 1870–1874.
- Neves G, Cooke SF, Bliss TVP (2008) Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci* 9: 65–75.
- Malenka RC, Bear MF (2004) LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44: 5–21.
- Amaral DG, Witter MP (2004) Hippocampal Formation. In: Paxinos G, editor. *The Rat Nervous System*. Elsevier Academic Press. pp. 635–704.
- O'Mara SM, Commins S, Anderson M, Gigg J (2001) The subiculum: a review of form, physiology and function. *Prog Neurobiol* 64: 129–155.
- Stewart M, Wong RKS (1993) Intrinsic Properties and Evoked Responses of Guinea Pig Subicular Neurons In Vitro. *J Neurophysiol* 70: 232–245.
- Staff NP, Jung H-Y, Thiagarajan T, Yao M, Spruston N (2000) Resting and active properties of pyramidal neurons in subiculum and CA1 of rat hippocampus. *J Neurophysiol* 84: 2398–2408.
- Menendez de la Prida L, Suarez F, Pozo MA (2003) Electrophysiological and morphological diversity of neurons from the rat subicular complex in vitro. *Hippocampus* 13: 728–744.
- Huang Y-Y, Kandel ER (2005)  $\theta$  frequency stimulation up-regulates the synaptic strength of the pathway from CA1 to subiculum region of hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 232–237.
- Anderson M, Commins S, O'Mara SM (2000) The effects of low frequency and two-pulse stimulation protocols on synaptic transmission in the CA1-subiculum pathway in the anaesthetized rat. *Neurosci Lett* 279: 181–184.
- Fidzinski P, Shor O, Behr J (2008) Target-cell-specific bidirectional synaptic plasticity at hippocampal output synapses. *Eur J Neurosci* 27: 1111–1118.
- Descarries L, Audet MA, Doucet G, Garcia S, Oleskevich S, et al. (1990) Morphology of Central Serotonin Neurons. *Ann N Y Acad Sci* 600: 81–92.
- Pazos A, Palacios JM (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 346: 205–230.
- Zilles K, Schleicher A, Glaser T, Traber J, Rath M (1985) The ontogenetic development of serotonin (5-HT<sub>1</sub>) receptors in various cortical regions of the rat brain. *Anat Embryol (Berl)* 172: 255–264.
- Hannon J, Hoyer D (2008) Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 195: 198–213.
- Perez-Garcia G, Meneses A (2008) Memory formation, amnesia, improved memory and reversed amnesia: 5-HT role. *Behav Brain Res* 195: 17–29.
- Myhrer T (2003) Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Rev* 41: 268–287.
- Grossman CJ, Kilpatrick GJ, Bunce KT (1993) Development of a radioligand binding assay for 5-HT4 receptors in guinea-pig and rat brain. *Br J Pharmacol* 109: 618–624.
- Mengod G, Vilaró MT, Raurich A, López-Giménez JF, Cortés R, et al. (1996) 5-HT receptors in mammalian brain: receptor autoradiography and in situ hybridization studies of new ligands and newly identified receptors. *Histochem J* 28: 747–758.
- Waeber C, Sebben M, Bockaert J, Dumuis A (1996) Regional distribution and ontogeny of 5-HT4 binding sites in rat brain. *Behav Brain Res* 73: 259–262.
- Jakeman LB, To ZP, Eglen RM, Wong EH, Bonhaus DW (1994) Quantitative autoradiography of 5-HT4 receptors in brains of three species using two structurally distinct radioligands, [3H]GR113808 and [3H]BIMU-1. *Neuropharmacology* 33: 1027–1038.
- Markstein R, Matsumoto M, Kohler C, Togashi H, Yoshioka M, et al. (1999) Pharmacological characterisation of 5-HT receptors positively coupled to adenylyl cyclase in the rat hippocampus. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 359: 454–459.
- Mlinar B, Mascacchi S, Mannaioni G, Morini R, Corradetti R (2006) 5-HT4 receptor activation induces long-lasting EPSP-spike potentiation in CA1 pyramidal neurons. *Eur J Neurosci* 24: 719–731.
- Kulla A, Manahan-Vaughan D (2002) Modulation by serotonin 5-HT(4) receptors of long-term potentiation and depotentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Cereb Cortex* 12: 150–162.
- Kemp A, Manahan-Vaughan D (2005) The 5-hydroxytryptamine4 receptor exhibits frequency-dependent properties in synaptic plasticity and behavioural metaplasticity in the hippocampal CA1 region in vivo. *Cereb Cortex* 15: 1037–1043.
- Berry M, Pentreath V (1976) Criteria for distinguishing between monosynaptic and polysynaptic transmission. *Brain Res* 105: 1–20.
- Miles R, Wong RKS (1987) Inhibitory control of local excitatory circuits in the guinea-pig hippocampus. *J Physiol* 388: 611–629.
- Nicholls JG, Purves D (1970) Monosynaptic chemical and electrical connexions between sensory and motor cells in the central nervous system of the leech. *J Physiol* 209: 647–667.
- Wozny C, Maier N, Schmitz D, Behr J (2008) Two different forms of long-term potentiation at CA1-subiculum synapses. *J Physiol* 586: 2725–2734.
- Fidzinski P, Wawra M, Dugladze T, Gloveli T, Heinemann U, et al. (2011) Low-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces heterosynaptic disinhibition in the subiculum. *Hippocampus* 21: 733–743.
- The R Core Team (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Project for Statistical Computing, R version 2.15.2.
- Elzhov T V., Mullen KM, Spiess A-N, Bolker B (2012) minpack.lm: R interface to the Levenberg-Marquardt nonlinear least-squares algorithm found in MINPACK, plus support for bounds. R Project for Statistical Computing, R package version 1.1-6.
- Fontana DJ, Daniels SE, Wong EHF, Eglen RM (1997) The Effects of Novel, Selective 5-Hydroxytryptamine (5-HT) 4 Receptor Ligands in Rat Spatial Navigation. *Neuropharmacology* 36: 689–696.
- Eglen RM, Bonhaus DW, Johnson LG, Leung E, Clark RD (1995) Pharmacological characterization of two novel and potent 5-HT4 receptor

- agonists, RS 67333 and RS 67506, in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 115: 1387–1392.
36. Eglén RM, Wong EHF, Dumuis A, Bockaert J (1995) Central 5-HT<sub>4</sub> receptors. *TIPS* 16: 1043–1050.
  37. Hegde SS, Bonhaus DW, Johnson LG, Leung E, Clark RD, et al. (1995) RS 39604: a potent, selective and orally active 5-HT<sub>4</sub> receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 115: 1087–1095.
  38. Gale JD, Grossman CJ, Whitehead JWF, Oxford A W, Bunce KT, et al. (1994) GR113808: a novel, selective antagonist with high affinity at the 5-HT<sub>4</sub> receptor. *Br J Pharmacol* 111: 332–338.
  39. Zucker RS, Regehr WG (2002) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64: 355–405.
  40. Behr J, Empson R, Schmitz D, Gloveli T, Heinemann U (1996) Electrophysiological properties of rat subicular neurons in vitro. *Neurosci Lett* 220: 41–44.
  41. Greene JRT, Mason A (1996) Neuronal Diversity in the Subiculum: Correlations With the Effects of Somatostatin on Intrinsic Properties and on GABA-Mediated IPSPs In Vitro. *J Neurophysiol* 76: 1657–1666.
  42. Taube J (1993) Electrophysiological properties of neurons in the rat subiculum in vitro. *Exp Brain Res* 96: 304–318.
  43. Roggenhofer E, Fidzinski P, Bartsch J, Kurz F, Shor O, et al. (2010) Activation of dopamine D1/D5 receptors facilitates the induction of presynaptic long-term potentiation at hippocampal output synapses. *Eur J Neurosci* 32: 598–605.
  44. Claeysen S, Sebben M, Becamel C, Bockaert J, Dumuis A (1999) Novel brain-specific 5-HT<sub>4</sub> receptor splice variants show marked constitutive activity: role of the C-terminal intracellular domain. *Mol Pharmacol* 55: 910–920.
  45. Mialet J, Berque-Bestel I, Eftekhari P, Gastineau M, Giner M, et al. (2000) Isolation of the serotonergic 5-HT<sub>4</sub>(c) receptor from human heart and comparative analysis of its pharmacological profile in C6-gial and CHO cell lines. *Br J Pharmacol* 129: 771–781.
  46. Svenningsson P, Tzavara ET, Liu F, Fienberg A a, Nomikos GG, et al. (2002) DARPP-32 mediates serotonergic neurotransmission in the forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3188–3193.
  47. Blank T, Nijholt I, Teichert U, Kügler H, Behrsing H, et al. (1997) The phosphoprotein DARPP-32 mediates cAMP-dependent potentiation of striatal N-methyl-D-aspartate responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14859–14864.
  48. Letty S, Child R, Dumuis A, Pantaloni A, Bockaert J, et al. (1997) 5-HT<sub>4</sub> receptors improve social olfactory memory in the rat. *Neuropharmacology* 36: 681–687.
  49. Marchetti E, Dumuis A, Bockaert J, Soumireu-Mourat B, Roman FS (2000) Differential modulation of the 5-HT<sub>4</sub> receptor agonists and antagonist on rat learning and memory. *Neuropharmacology* 39: 2017–2027.
  50. Marchetti-Gauthier E, Roman FS, Dumuis A, Bockaert J, Soumireu-Mourat B (1997) BIMU1 increases associative memory in rats by activating 5-HT<sub>4</sub> receptors. *Neuropharmacology* 36: 697–706.
  51. Lamirault L, Simon H (2001) Enhancement of place and object recognition memory in young adult and old rats by RS 67333, a partial agonist of 5-HT<sub>4</sub> receptors. *Neuropharmacology* 41: 844–853.
  52. Lelong V, Dauphin F, Boulouard M (2001) RS 67333 and D-cycloserine accelerate learning acquisition in the rat. *Neuropharmacology* 41: 517–522.
  53. Brodney MA, Johnson DE, Sawant-basak A, Coffman KJ, Drummond EM, et al. (2012) Identification of Multiple 5-HT<sub>4</sub> Partial Agonist Clinical Candidates for the Treatment of Alzheimer's Disease. *J Med Chem* 55: 9240–9254.
  54. Cho S, Hu Y (2007) Activation of 5-HT<sub>4</sub> receptors inhibits secretion of beta-amyloid peptides and increases neuronal survival. *Exp Neurol* 203: 274–278.
  55. Madsen K, Neumann W-J, Holst K, Marner L, Haahr MT, et al. (2011) Cerebral serotonin 4 receptors and amyloid- $\beta$  in early Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 26: 457–466.
  56. Russo O, Cachard-Chastel M, Rivière C, Giner M, Soulier J-L, et al. (2009) Design, synthesis, and biological evaluation of new 5-HT<sub>4</sub> receptor agonists: application as amyloid cascade modulators and potential therapeutic utility in Alzheimer's disease. *J Med Chem* 52: 2214–2225.
  57. Kemp A, Manahan-Vaughan D (2004) Hippocampal long-term depression and long-term potentiation encode different aspects of novelty acquisition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8192–8197.
  58. Jarsky T, Mady R, Kennedy B, Spruston N (2008) Distribution of bursting neurons in the CA1 region and the subiculum of the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 506: 535–547.
  59. Cooper DC (2002) The significance of action potential bursting in the brain reward circuit. *Neurochem Int* 41: 333–340.
  60. Krahe R, Gabbiani F (2004) Burst firing in sensory systems. *Nat Rev Neurosci* 5: 13–23.
  61. Deadwyler SA, Hampson RE (2004) Differential but complementary mnemonic functions of the hippocampus and subiculum. *Neuron* 42: 465–476.
  62. Naber PA, Witter MP, Lopes da Silva FH (2000) Networks of the Hippocampal Memory System of the Rat: The Pivotal Role of the Subiculum. *Ann N Y Acad Sci* 903: 392–403.
  63. Burwell RD (2000) The Parahippocampal Region: Corticocortical Connectivity. *Ann N Y Acad Sci*: 25–42.

## **9 Lebenslauf**

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

## 10 Publikationsliste

### 10.1 Originalarbeiten

- 1 Fidzinski, P., Wawra, M., Dugladze, T., Gloveli, T., Heinemann, U. und Behr, J. Low-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces heterosynaptic disinhibition in the subiculum. *Hippocampus* 2011;21:733–743.
- 2 Fidzinski, P., Wawra, M., Bartsch, J., Heinemann, U. und Behr, J. High-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces input-specific long-term potentiation in subicular bursting cells. *Brain Res.* 2012;1430:1–7.
- 3 Wawra, M., Fidzinski, P., Heinemann, U., Mody, I. und Behr, J. 5-HT4-Receptors modulate induction of long-term depression but not potentiation at hippocampal output synapses in acute rat brain slices. *PLoS One* 2014;9:e88085.

### 10.2 Kongressbeiträge

- 1 Fidzinski, P., Wawra, M., Heinemann, U. und Behr, J. Low-frequency stimulation of the temporoammonic pathway induces heterosynaptic disinhibition in the subiculum. *Jahrestagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft*. Göttingen: Neurowissenschaftliche Gesellschaft, 2009.
- 2 Wawra, M., Fidzinski, P. und Behr, J. Activation of 5-HT4 receptors modulates synaptic plasticity induced by low-frequency-stimulation at CA1-Subiculum synapses. *8th FENS Forum Neurosci*. Barcelona: Federation of European Neurosciences, 2012.

## 11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Matthias Wawra, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Synaptische Plastizität im Subikulum und ihre Modulation durch Serotonin“ 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Berlin

15. September 2014

.....

.....

.....

Ort

Datum

Matthias Wawra



## 12 Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Joachim Behr danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung während aller Phasen dieser Dissertation.

Besonders danke ich der Arbeitsgruppe und insbesondere Pawel Fidzinski, Julia Bartsch, Kate Gilling und Carl Witt. Ihre freundschaftliche Unterstützung, ihre Anregungen, konstruktive Kritik und Hilfestellungen haben die wunderbare Arbeitsumgebung geschaffen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Uwe Heinemann, Herrn Prof. Dr. Istvan Mody und allen anderen Mitautoren, die durch ihre hilfreichen Kommentare und Anregungen zu den Manuskripten der Veröffentlichungen an deren Verbesserung Anteil hatten.

Mein ganz besonderer Dank gilt schließlich meinen Eltern. Sie haben mich während des Studiums begleitet und unterstützt, mich in der Entscheidung für eine Promotion bestärkt und mir von Anfang an auch in allen schwierigen Phasen stets uneingeschränkt Rückhalt gegeben.