

Aus dem Physiologischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. med. M. Bleich)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**NETZWERKKORRELATE DER  
MUSTERDIFFERENZIERUNG IN DER  
HIPPOCAMPUSFORMATION**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**LARS-PATRICK ANDREAS SCHMILL**  
aus Kiel

Kiel 2023

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peer Wulff,  
Physiologisches Institut
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Ralph Lucius,  
Anatomisches Institut
3. Berichterstatter: Prof. Dr. sc. nat. habil. Oliver Stork,  
Fakultät für Naturwissenschaften (FNW),  
Institut für Biologie (IBIO), Magdeburg

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2025

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 03.04.2025

gez.: Prof. Dr. med. Peer Wulff  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis .....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Hippocampusformation .....	1
1.1.1 Allgemeiner Aufbau .....	1
1.1.2 Histologischer Aufbau .....	2
1.1.2.1 Die trisynaptische Schleife .....	3
1.1.2.2 Der Entorhinale Kortex .....	4
1.1.2.3 Der Gyrus dentatus .....	4
1.1.2.4 Das Cornu ammonis .....	6
1.1.2.4.1 Das CA3 .....	8
1.1.2.4.2 Das CA2 und CA1 .....	9
1.1.2.5 Der Hilus des Gyrus dentatus .....	10
1.1.3 Funktionelle Einbindung der Hippocampusformation .....	11
1.2 Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung .....	12
1.2.1 Musterdifferenzierung .....	12
1.2.2 Musterkomplettierung .....	14
1.2.3 Läsionsstudien zur funktionellen Charakterisierung der hippocampalen Subregionen... ..	15
1.2.3.1 Läsionen des Gyrus dentatus .....	15
1.2.3.2 Läsionen des CA3.....	16
1.2.3.3 Läsionen der ventralen im Vergleich zur dorsalen Hippocampusformation .....	17
1.2.3.4 Resümee der Läsionsstudien .....	17
1.2.4 Knockout-Studien zur Charakterisierung der hippocampalen Subregionen.....	18
1.2.5 Elektrophysiologische Charakterisierung.....	19

1.2.5.1	Elektrophysiologische Eigenschaften des Gyrus dentatus .....	19
1.2.5.2	Elektrophysiologische Eigenschaften des CA3.....	21
1.2.5.3	Resümee elektrophysiologischer Studien.....	21
1.2.6	Charakterisierung auf Neuronenpopulationsebene.....	22
1.2.6.1	Was sind IEGs? .....	22
1.2.6.2	Die Methode der catFISH.....	23
1.2.6.3	Rekrutierung von Neuronensembles im DG.....	24
1.2.6.4	Rekrutierung von Neuronensembles im CA3.....	26
1.2.7	Aktueller Stand zur Abgrenzung zwischen Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung .....	27
1.3	Zielsetzung der Doktorarbeit.....	30
2	Material und Methoden.....	31
2.1	Material .....	31
2.1.1	Geräte .....	31
2.1.2	Laborausstattung und Gefäße .....	32
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	33
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien .....	33
2.1.5	Lösungen .....	34
2.1.6	Nukleinsäuren, Antikörper und Tyramide.....	36
2.1.7	Software.....	38
2.2	Versuchstiere .....	39
2.3	Methoden.....	40
2.3.1	Versuchsaufbau zur Exposition der Versuchstiere .....	40
2.3.1.1	Aufbau der Kontexte .....	40
2.3.1.2	Gewöhnung der Versuchstiere .....	41
2.3.1.3	Versuchsgruppen .....	41
2.3.1.4	Exposition der Versuchstiere.....	42
2.3.1.5	Dekapitation der Versuchstiere .....	43
2.3.2	Anfertigung der histologischen Schnitte .....	44

2.3.2.1	Präparation des Gehirns.....	44
2.3.2.2	Anfertigung der Kryoschnitte.....	44
2.3.3	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	45
2.3.3.1	Tag 1.....	45
2.3.3.2	Tag 2.....	47
2.3.3.3	Tag 3.....	48
2.3.3.4	Tag 4.....	48
2.3.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	49
2.3.5	Auswertung.....	50
2.3.5.1	Verhaltensanalysen.....	50
2.3.5.2	Histologische Auswertung.....	52
2.3.5.3	Bestimmung der Gesamtzellzahl.....	52
2.3.5.4	Bestimmung der Anzahl aktivierter Neurone.....	52
2.3.6	Statistik.....	55
2.3.6.1	Statistische Aufarbeitung und verwendete Testverfahren.....	55
2.3.6.2	Ähnlichkeits-Score (Similarity Score).....	56
3	Ergebnisse.....	58
3.1	Ein- und Ausschluss von Versuchstieren.....	58
3.2	Verhaltensanalysen.....	58
3.2.1	Analyse der Laufstrecke.....	58
3.2.2	Schlussfolgerungen der Verhaltensanalyse für die Verwertbarkeit der Daten für die weitere Auswertung.....	61
3.3	Analyse der Bildauswertung.....	62
3.3.1	Vergleich der Maximumintensitätsprojektion mit der dreidimensionalen Rekonstruktion der mikroskopischen Aufnahmen.....	62
3.3.2	Kontrolle der automatischen Zellzählung.....	62
3.4	Kontrolle der Methode der catFISH.....	64
3.4.1	Nukleäre Signallokalisation.....	64
3.4.2	Zytoplasmatische Signallokalisation.....	65

3.4.3	Schlussfolgerungen aus der Kontrolle der Methode für die weiteren Ergebnisse .....	66
3.5	Verhältnisse der neuronalen Aktivität im Vergleich zweier konstanter oder differenten Kontexte.....	68
3.5.1	Einfluss der wiederholten Erkundung einer Umgebung auf die Rekrutierung von Neuronen .....	68
3.5.2	Einfluss der Erkundung von unterschiedlichen Umgebungen auf die Rekrutierung von Neuronen .....	68
3.6	Anteile aktivierter Neurone im Vergleich zwischen Gruppe AA und Gruppe AB..	71
3.6.1	Rekrutierung von Neuronen bei erster Erkundung von Kontext A .....	71
3.6.2	Rekrutierung von Neuronen in der zweiten Expositionsphase .....	71
3.6.3	Einfluss der Reexploration eines Kontextes und der Erkundung zweier verschiedener Kontexte auf die wiederholte Aktivierung von Neuronen.....	73
3.6.4	Einfluss der Reexploration eines Kontextes und der Erkundung zweier verschiedener Kontexte auf den Ähnlichkeits-Score und die Reaktivierungsraten.....	75
3.7	Vergleich der neuronalen Aktivität zwischen dem DG und dem CA3 .....	77
3.8	Vergleich der neuronalen Aktivität zwischen dem spDG und dem ipDG .....	79
3.9	Vergleich der neuronalen Aktivität zwischen den Subregionen des CA3 .....	81
3.10	Seitendifferenzen zwischen rechtshemisphäraler und linkshemisphäraler Hippocampusformation .....	84
3.10.1	Allgemeine neuronale Aktivität .....	84
3.10.2	Rechtsseitig führende Reaktivierung hippocampaler Neurone .....	86
3.11	Rostrokaudaler Gradient neuronaler Aktivität .....	87
3.11.1	Allgemeine neuronale Aktivität .....	87
3.11.2	Rostral führende Reaktivierung hippocampaler Neurone .....	89
4	Diskussion.....	90
4.1	Diskussion der Methodik .....	91
4.1.1	Nutzbarkeit des IEG zif268/egr-1 für den DG und das CA3 im Rahmen der catFISH...	91
4.2	Die Zellaktivität bei der Erkundung gleicher oder verschiedener Kontexte .....	94
4.2.1	Einheitliche Aktivierung von Neuronensembles unabhängig von der Bekanntheit einer Umgebung .....	94

4.2.2	Die Zellaktivität innerhalb des DG.....	94
4.2.3	Die Zellaktivität innerhalb des CA3.....	98
4.2.4	Die Zellaktivität im Vergleich zwischen dem DG und dem CA3 .....	102
4.3	Seitendifferenzen in Bezug auf die Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung .....	108
4.4	Rostrokaudale Unterschiede der Zellaktivität und Zellreaktivierung .....	112
4.5	Limitationen .....	114
4.6	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	117
5	Zusammenfassung.....	120
6	Literaturverzeichnis .....	122
7	Anhang.....	131
	Tierversuchsantrag .....	135
	Eidesstattliche Erklärung.....	136
	Publikationsliste .....	137
	Danksagung.....	138

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Allgemeiner Aufbau der Hippocampusformation.....	2
Abbildung 2 Die trisynaptische Schleife.....	3
Abbildung 3 Der Aufbau des Gyrus dentatus .....	5
Abbildung 4 Der Aufbau des Cornu ammonis.....	7
Abbildung 5 Die Subregionen des CA3 .....	9
Abbildung 6 Beispiel einer Musterdifferenzierung.....	14
Abbildung 7 Lokalisation von IEGs bei der catFISH .....	24
Abbildung 8 Aufbau der Kontexte .....	41
Abbildung 9 Versuchsgruppen.....	42
Abbildung 10 Kontexte mit Zonen sowie exemplarische Laufstreckenaufzeichnungen .....	51
Abbildung 11 Beispiele nachgewiesener Signale .....	54
Abbildung 12 Verhaltensanalysen .....	60
Abbildung 13 Kontrolle der Methode der catFISH.....	65
Abbildung 14 Exemplarische Aufnahmen der Kontrollgruppen .....	67
Abbildung 15 Vergleich der Zellaktivierungen innerhalb von AA und AB .....	69
Abbildung 16 Exemplarische Aufnahmen der Versuchsgruppen AA und AB.....	70
Abbildung 17 Vergleich der rekrutierten Neurone im ersten und zweiten Kontext .....	72
Abbildung 18 Doppelt rekrutierte Neurone .....	74
Abbildung 19 Ähnlichkeits-Score .....	76
Abbildung 20 Vergleich der neuronalen Aktivität zwischen dem DG und dem CA3 .....	77
Abbildung 21 Vergleich des Ähnlichkeits-Scores zwischen dem DG und dem CA3 .....	78
Abbildung 22 Vergleich zwischen dem spDG und dem ipDG .....	80
Abbildung 23 Vergleich der Zellaktivität zwischen den Subregionen des CA3.....	81
Abbildung 24 Vergleich des Ähnlichkeits-Scores und der Reaktivierungsrate 2 zwischen den Subregionen des CA3 und dem DG .....	83
Abbildung 25 Seitenvergleich der allgemeinen neuronalen Aktivität .....	85
Abbildung 26 Seitenvergleich des Ähnlichkeits-Scores .....	86
Abbildung 27 Rostrokaudaler Vergleich der allgemeinen neuronalen Aktivität.....	88
Abbildung 28 Rostrokaudaler Vergleich des Ähnlichkeits-Scores.....	89
Abbildung 29 Kontrolle der Methode in den Subregionen des Gyrus dentatus.....	131
Abbildung 30 Reaktivierungsraten.....	132



Abbildung 31 Rostrokaudaler Vergleich der neuronalen Aktivität innerhalb des ersten Kontextes in allen Subregionen.....	133
Abbildung 32 Rostrokaudaler Vergleich der neuronalen Aktivität innerhalb des zweiten Kontextes in allen Subregionen.....	134

# **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Großgeräte .....	31
Tabelle 2 Kleingeräte .....	32
Tabelle 3 Laborausstattung und Gefäße .....	32
Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien .....	33
Tabelle 5 Chemikalien und Reagenzien .....	34
Tabelle 6 Lösungen .....	36
Tabelle 7 Markierte Nukleinsäuren .....	37
Tabelle 8 Antikörper .....	37
Tabelle 9 Tyramide .....	38
Tabelle 10 Software .....	38

# Abkürzungsverzeichnis

Arc:	Aktivitäts-reguliertes Zytoskelett-assoziiertes Protein (activity-regulated cytoskeleton-associated protein)
BC:	Korbzelle (basket cell)
CA:	Cornu ammonis
catFISH:	Zelluläre Kompartimentanalyse der zeitlichen Aktivität mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescent in-situ hybridisation)
DG:	Gyrus dentatus (dentate gyrus)
EC:	Entorhinaler Kortex (entorhinal cortex)
FISH:	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GABA:	Gamma-Aminobuttersäure
GC:	Körnerzelle (granule cell)
IEG:	unmittelbar exprimiertes Gen (immediate-early gene)
ipDG:	infrapyramidaler Schenkel des Gyrus dentatus
LEC:	lateral entorhinaler Kortex
MC:	Mossyzelle (mossy cell)
MEC:	medialer entorhinaler Kortex
MIP:	Maximumintensitätsprojektion (maximum intensity projection)
NMDA:	N-Methyl-D-Aspartat
ns:	nicht signifikant
Para:	Parasubiculum
PC:	Pyramidenzelle (pyramidal cell)
Pre:	Presubiculum
RR1:	Reaktivierungsrate 1
RR2:	Reaktivierungsrate 2
RTF:	regulatorische Transkriptionsfaktoren (regulatory transcription factors)
SD:	Standardabweichung (standard deviation)
SEM:	Standardfehler (standard error of the mean)
sg:	Stratum granulosum
sl:	Stratum lucidum
slm:	Stratum lacunosum-moleculare

smol:	Stratum moleculare
smult:	Stratum multiforme (polymorphe Schicht)
so:	Stratum oriens
sp:	Stratum pyramidale
spDG:	suprapyramidaler Schenkel des Gyrus dentatus
sr:	Stratum radiatum
Sub:	Subiculum

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Hippocampusformation

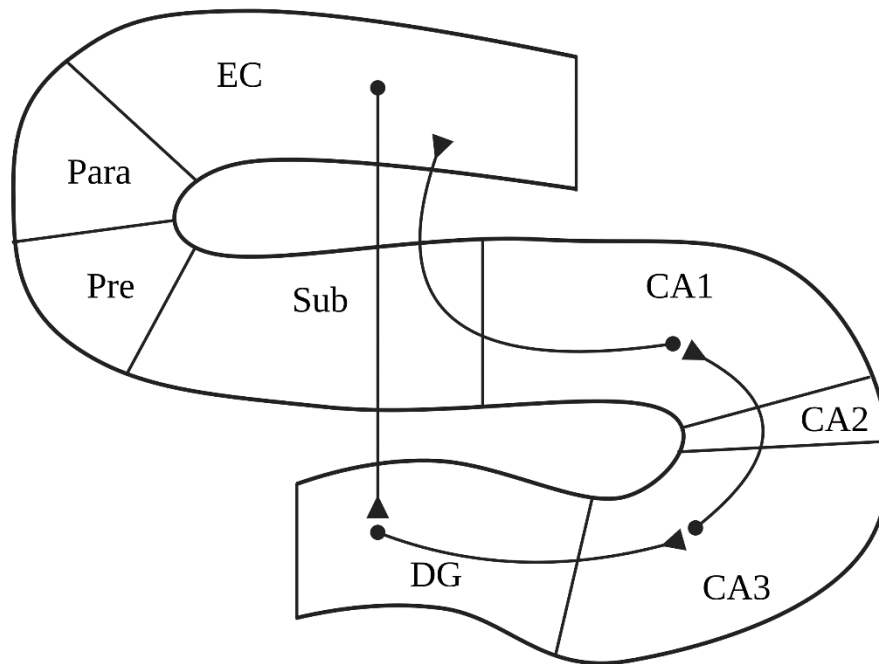
Die Hippocampusformation stellt das zentrale Element sowohl in der Gedächtnisbildung als auch beim Prozess des Erinnerns dar. Obwohl ihre Rolle bereits umfassend untersucht und mutmaßlich zu großen Anteilen aufgeklärt werden konnte, so bleibt ihre genaue Funktionsweise zum jetzigen Zeitpunkt weitgehend ungelöst. In dieser Arbeit wird nun ein spezifischer Aspekt ebendieser Funktionsweise, genauer die Musterdifferenzierung (*pattern separation*), näher untersucht. Um diese zu verstehen, ist es essenziell, sowohl den anatomischen und histologischen Aufbau zu kennen als auch zu wissen, auf welche Weise unser bisheriges Wissen über diesen Prozess erlangt wurde. Aus diesem Grund soll in den nachfolgenden Kapiteln ein grundlegender Überblick hierüber gegeben werden.

### 1.1.1 Allgemeiner Aufbau

Die Hippocampusformation ist ein paarig angelegter Verbund von Hirnregionen, welcher in jeder Großhirnhemisphäre einmal vorhanden ist und dem limbischen System zugeordnet wird. Sie umfasst neben ihrem häufig als Hauptteil bezeichneten Hippocampus, auch als das Cornu ammonis (CA) oder Ammonshorn bekannt, weitere Regionen, zu denen der entorhinale Kortex (*entorhinal cortex*, EC), der Gyrus dentatus (*dentate gyrus*, DG), das Subiculum, das Presubiculum und das Parasubiculum gehören (Andersen, 2007, S. 37) (Abbildung 1). Aufgrund der Verarbeitung und Integration von Informationen aller sensorischer Modalitäten besitzt die Hippocampusformation zahlreiche, vor allem neokortikale Afferenzen (Eingänge), welche vornehmlich über den EC verlaufen. Dieser kann daher als primäre Station der Reizverarbeitung innerhalb der Formation angesehen werden. Gleichzeitig verlaufen auch die Efferenzen (Ausgänge) zum Neokortex über den EC, wohingegen jene in subkortikale Regionen vor allem aus dem Subiculum stammen (Andersen, 2007, S. 42). Hervorzuheben ist ebenfalls die Verbindung der Hippocampusformationen beider Hemisphären über die Commissurae anterior et posterior, über welche eine gleichzeitige bilaterale Verarbeitung von Informationen ermöglicht wird.

Im Vergleich zwischen Mensch und Nagetier bestehen in Bezug auf den allgemeinen Aufbau viele Gemeinsamkeiten, auch wenn die humane Hippocampusformation etwa 100-fach größer als die der Ratte oder der Maus ist, sie deutlich mehr Subregionen in den einzelnen Bereichen umfasst und diese wiederum komplexere Verschaltungen aufweisen (Andersen, 2007, S. 39).

Dennoch besitzen sie so viele Gemeinsamkeiten, dass die Hippocampusformation der Ratte, ebenso wie die der Maus, sehr gut für neurophysiologische Testungen zur funktionellen Charakterisierung herangezogen werden kann. In der weiteren Dissertation wird nun vornehmlich Bezug auf die Hippocampusformation der Maus sowie auf die der Ratte genommen, da an diesen die grundlegenden Experimente zum Verständnis der hippocampalen Funktion durchgeführt wurden. Weiterhin wurden alle Versuche in dieser Arbeit an Mäusen durchgeführt, weshalb auf diesen der besondere Fokus liegen soll.



**Abbildung 1 Allgemeiner Aufbau der Hippocampusformation**

Schematisch gezeigt ist der Verbund von Hirnregionen, welche als Hippocampusformation zusammengefasst werden, sowie eine exemplarische, für diese Arbeit wichtige Verschaltung (trisynaptische Schleife). Diese beginnt mit einer Verbindung vom entorhinalen Kortex (EC) zum Gyrus dentatus (DG). Weiter führt sie vom DG zum Cornu ammonis 3 (CA3) und von dort zum Cornu ammonis 1 (CA1). Die abschließende Verbindung stellt jene vom CA1 zum EC dar. Neben diesen werden die weiteren Regionen des Cornu ammonis 2 (CA2), des Subiculum (Sub), des Presubiculum (Pre) und des Parasubiculum (Para) gezeigt. (basierende auf Andersen (2007), S. 38; erstellt mit BioRender.com)

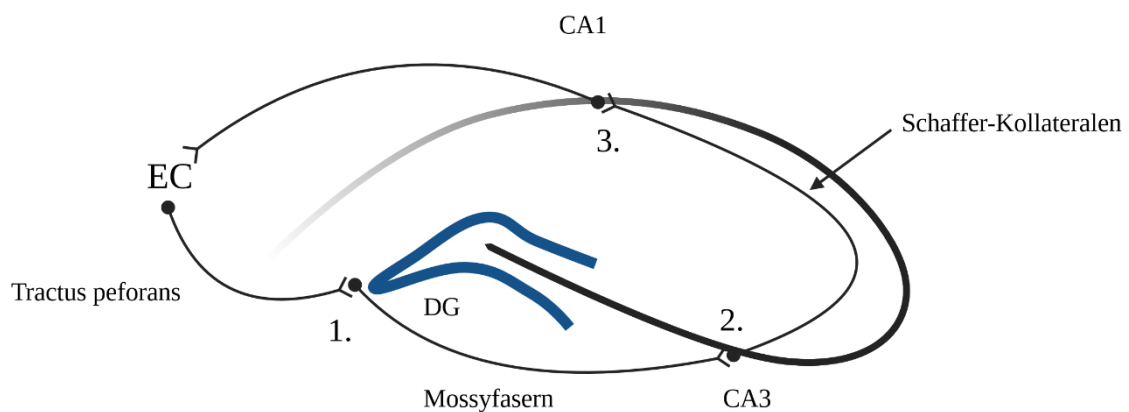
## 1.1.2 Histologischer Aufbau

Der histologische Aufbau der Hippocampusformation ist äußerst komplex, da jede Region eine Vielzahl an verschiedenen Neuronenarten in unterschiedlicher Zusammensetzung und unterschiedlicher Anordnung beherbergt. Der Übersicht halber, sowie um sich auf die für diese Arbeit relevanten Inhalte zu konzentrieren, werden nachfolgend nur die hierfür essenziellen Regionen der Formation sowie die wichtigsten Neuronenarten vorgestellt. Aufgrund des ähnlichen Aufbaus der Hippocampusformation von Mäusen und Ratten, wird in

den folgenden Kapiteln eine allgemeine Übersicht über diese geboten. Hierbei ist anzumerken, dass die meisten anatomischen Informationen von Untersuchungen der Hippocampusformation der Ratte stammen, welche bezogen auf die folgenden Kapitel jedoch auch auf die der Maus zutreffen (Andersen, 2007, S. 39ff).

### 1.1.2.1 Die trisynaptische Schleife

Bereits in den ersten neuroanatomischen Untersuchungen der Hippocampusformation sind Faserbahnen beschrieben worden, welche einen primär unidirektionalen Verlauf innerhalb dieser aufwiesen (Nó, 1934). Es wurde registriert, dass die kräftigsten unter diesen einen Kreislauf innerhalb der Formation bilden, woraus die anfängliche Hypothese einer trisynaptischen Schleife hervorgegangen ist (Amaral und Witter, 1989) (Abbildung 2). Ihren Beginn hat diese Schleife im EC, von dem aus die Axone als sogenannter Perforatortrakt (Tractus perforans) den DG innervieren (erste Synapse). Von hier erfolgt die Innervation des CA3 über Mossyfasern (zweite Synapse) und weiter über Schaffer-Kollateralen vom CA3 zum CA1 (dritte Synapse). Auf diesem Kreislauf basierend wurde postuliert, dass eine derartige Schleife der primären, zentralen Verarbeitung sensorischer Informationen dienen würde (Marr, 1971). Im Laufe der Jahrzehnte wurden schließlich mehr und mehr Details zu den genauen Verbindungen entdeckt, auf deren wichtigste in den folgenden Kapiteln näher eingegangen werden soll.



**Abbildung 2 Die trisynaptische Schleife**

Gezeigt ist eine schematische Darstellung eines koronaren Ausschnittes der Hippocampusformation mit Abbildung des entorhinalen Kortex (EC), des Gyrus dentatus (DG), des Cornu ammonis 3 (CA3) sowie des Cornu ammonis 1 (CA1). Eingezeichnet sind außerdem die wichtigsten Faserbahnen vom EC zum DG (Tractus perforans), vom DG zum CA3 (Mossyfasern), vom CA3 zum CA1 (Schaffer-Kollateralen sowie abschließend vom CA1 zurück zum EC. Die Nummerierung (1.; 2.; 3.) gibt die jeweilige synaptische Verschaltung innerhalb der trisynaptischen Schleife an. (erstellt mit BioRender.com)

### **1.1.2.2 Der Entorhinale Kortex**

Der EC nimmt im Aufbau der Hippocampusformation eine besondere Stellung ein. Auf der einen Seite stellt er den Eingang zur Hippocampusformation dar, über den der größte Teil der zu verarbeitenden sensorischen Informationen verläuft. Auf der anderen Seite ist der EC ebenfalls ein Endpunkt der Verarbeitungsschleife der Hippocampusformation und entsendet verarbeitete Informationen von hier an den Neokortex, von dem er bereits seine Afferenzen zu Beginn der hippocampalen Schleife erhalten hat. Doch auch in einem weiteren Punkt steht dem EC eine Sonderrolle zu. In ihren Verknüpfungen zwischen den einzelnen Regionen bildet die Hippocampusformation eine relativ lineare Verschaltung, in der Signale von einem Bereich an den nächsten weitergeleitet werden und anschließend dem weiteren Verlauf der Schleife folgen. Beim EC konnte jedoch nachgewiesen werden, dass er Verbindungen sowohl zum DG, der nächsten Station in der Schleife, hat als auch zu den Regionen des CA3, des CA1 und zum Subiculum (Amaral und Witter, 1989, Witter und Moser, 2006, Witter et al., 2017). Aus den letzten beiden erhält er gleichzeitig über direkte Verbindungen seine Afferenzen, so dass der EC ebenfalls direkte Rückkopplungen aus einzelnen Regionen erhält. Der EC stellt damit ebenso eine Ausnahme der hauptsächlich linearen Verschaltung der Hippocampusformation dar.

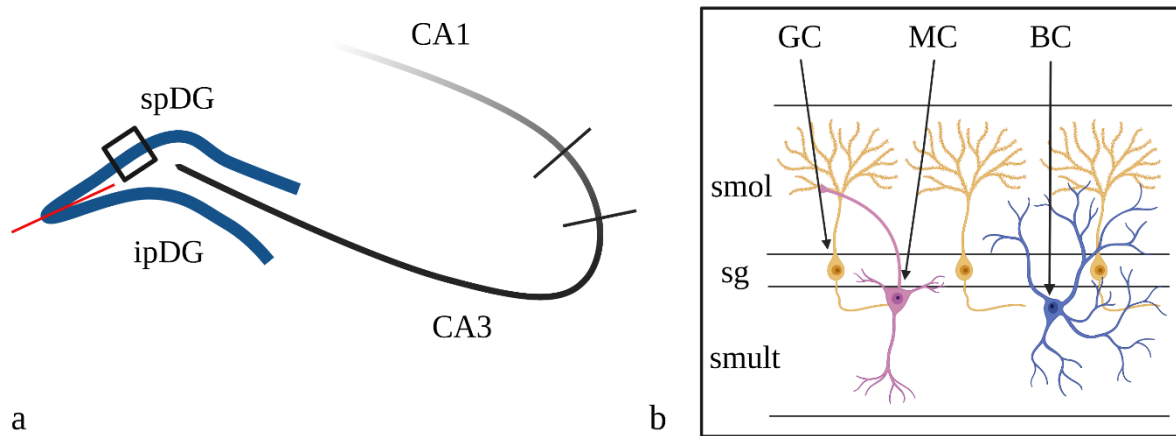
Betrachten wir seinen anatomischen Aufbau etwas näher, so kann der EC in einen lateralen (LEC) und einen medialen (MEC) Anteil eingeteilt werden. Beide besitzen sechs Schichten unterschiedlicher Zytoarchitektonik, von denen Neurone der Schicht II Axone zum DG entsenden (Andersen, 2007, S. 84-91). Aus der gleichen Schicht entspringen ebenfalls die Verbindungen zum CA3, wohingegen das CA1 und das Subiculum ihre Eingänge über Neurone der Schicht III des EC erhalten. Wie oben bereits beschrieben erhält der EC schließlich wieder Innervationen vom CA1 und dem Subiculum, welche in der Schicht V terminieren. An diesem Punkt ist anzumerken, dass Studien der letzten Jahrzehnte gezeigt haben, dass sowohl der MEC als auch der LEC den suprapyramidalen und infrapyramidalen Schenkel des DG gleichermaßen exzitatorisch innervieren, was für die Thematik dieser Doktorarbeit eine wichtige Rolle spielt (Lee et al., 2015).

### **1.1.2.3 Der Gyrus dentatus**

Der DG ist in seinem koronaren Anschnitt eine üblicherweise V- oder U-förmige Hirnregion mit vergleichbarem Erscheinungsbild auf jeder seiner rostrokaudalen Ebenen, was ihn bezogen auf seine Lokalisation zum CA3, in einen suprapyramidalen und einen



infrapyramidalen Schenkel unterteilen lässt (Abbildung 3a). Der suprapyramidale Schenkel (spDG) befindet sich entsprechend dorsal des CA3 und damit zu einem Anteil zwischen diesem und dem CA1. Der infrapyramidale Schenkel (ipDG) ist korrespondierend auf der ventralen Seite des CA3 gelegen (Andersen, 2007, S. 42f).



**Abbildung 3 Der Aufbau des Gyrus dentatus**

(a) Dargestellt ist der schematische koronare Aufbau des Gyrus dentatus (DG) sowie des Cornu ammonis mit seinen Subregionen des Cornu ammonis 3 (CA3) und des Cornu ammonis 1 (CA1). Gezeigt ist ebenso die Aufteilung des DG in einen suprapyramidalen (spDG) und einen infrapyramidalen Schenkel (ipDG) bezogen auf die Pyramidenzellschicht des CA3, welche hier durch die schwarze Linie repräsentiert wird. Die rote Linie stellt die Grenze zwischen dem spDG und dem ipDG an ihrem Übergang dar. Der schwarze Kasten, welcher den spDG überlagert, markiert den Bildausschnitt für (b). (b) Gezeigt ist der exemplarische, schematische Aufbau des spDG mit seinen einzelnen Schichten unterschiedlicher Zytoarchitektur. Die blaue Linie in (a) repräsentiert die Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*; sg), in der sich die Körnerzellen (GC) befinden. Über dieser befindet sich die molekulare Schicht (*Stratum moleculare*; smol), in der sich die Dendritenbäume der Körnerzellen ausdehnen. Unterhalb der Körnerzellschicht befindet sich die polymorphe Schicht (*Stratum multiforme*; smult), in der die Axone der Körnerzellen verlaufen und in der zahlreiche Interneurone wie Mossyzellen (MC) und Korbzellen (BC) lokalisiert sind. (basierend auf Andersen (2007), S. 55-57; erstellt mit BioRender.com)

Beide Subregionen des DG weisen einen trilaminären Aufbau auf (Abbildung 3b). Die äußere Schicht ist die molekulare Schicht (*Stratum moleculare*, smol), welche eher zellarm ist und in erster Linie die vollständigen Dendritenbäume der Körnerzellen (*granule cell*) sowie Axone als Afferenzen aus primär dem EC enthält. Hier sind nur wenige Interneurone lokalisiert, welche der Übersicht halber nicht näher klassifiziert werden sollen (Andersen, 2007, S. 55f). Die mittlere und in histologischen Schnitten markanteste Schicht ist die Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*, sg). Sie beherbergt die Körnerzellen als primäre Neuronenpopulation des DG und besitzt bei Nagetieren in den meisten Fällen eine Breite von vier bis acht Zellen (Andersen, 2007, S. 55f). Aufgrund ihrer Signaltransduktion mittels Glutamats können diese als exzitatorische Neuronenklasse charakterisiert werden. An diese Schicht anschließend

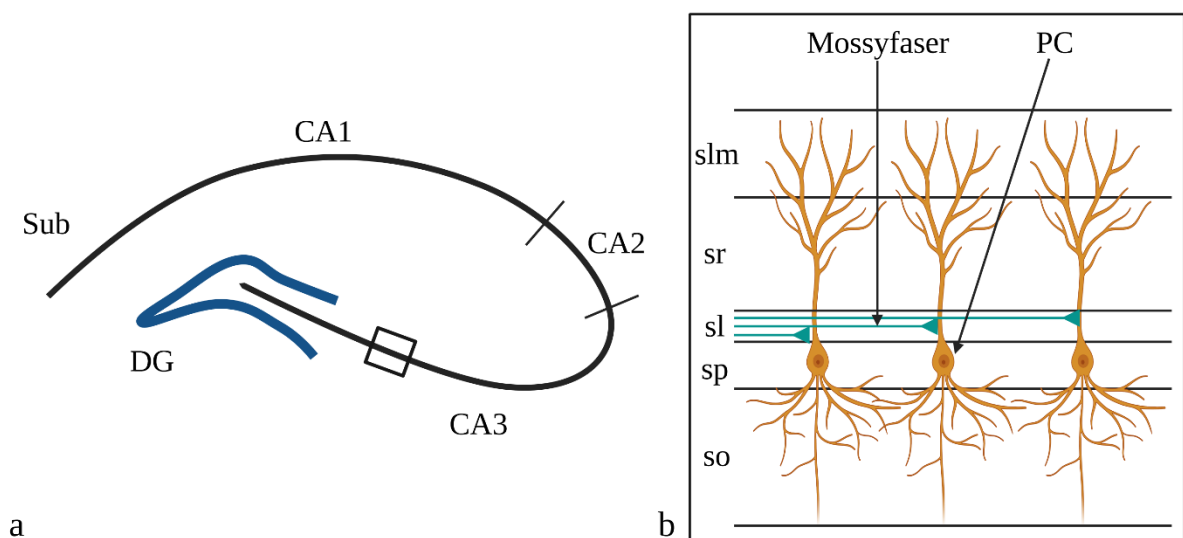
befindet sich in Richtung des CA3 die polymorphe Zellschicht (*Stratum multiforme*, smult), welche von den Körnerzellschichten des spDG und ipDG eingeschlossen wird und auch als Hilus des DG beschrieben wird (Amaral, 1978). Hier ist die größte Zahl an verschiedenen Interneuronen lokalisiert, unter denen sowohl exzitatorische als auch inhibitorische vorhanden sind. Sie verwenden exemplarisch Glutamat beziehungsweise Gamma-Aminobuttersäure (GABA) (Freund und Buzsaki, 1996). Letztere werden unter anderem durch Korbzellen (*basket cell*) repräsentiert, welche eine der primären Neuronenarten in der polymorphen Schicht darstellen und die Körnerzellen inhibitorisch innervieren. Gleichzeitig erhalten die Korbzellen GABAerge Afferenzen, über die wiederum eine Dysinhibition der Körnerzellen erfolgen kann. Neben ihnen existieren zahlreiche weitere Klassen von Interneuronen, welche hier der Übersicht halber jedoch nicht weiter genannt werden sollen (Amaral, 1978, Andersen, 2007, S. 56f). Eine andere Klasse an Neuronen dieser Schicht ist allerdings noch hervorzuheben: die Mossyzelle (*mossy cell*). Mossyzellen sind Neurone, deren Zellkörper in der polymorphen Zellschicht lokalisiert sind und deren Dendriten sich weitreichend ausdehnen, jedoch die Körnerzellschicht nicht durchdringen. Sie erhalten ihre Afferenzen damit nur innerhalb der polymorphen Schicht. Ihre Axone weisen die Besonderheit auf, dass sie nicht nur ipsilateral bis in die molekulare Schicht des DG reichen, sondern diese auch kontralateral innervieren (Andersen, 2007, S. 58, Blackstad, 1956). Dort bilden sie exzitatorische Synapsen mit den Dendriten der Körnerzellen oder der Korbzellen der Hippocampusformation der jeweils anderen Großhirnhemisphäre aus.

Seine Eingänge erhält der DG vornehmlich über den Tractus perforans aus dem EC. Die Axone der Körnerzellen, welche auch als Mossyfasern bezeichnet werden, führen entsprechend dem in Kapitel 1.1.2.1 beschriebenen linearen Verschaltungsmuster in die verschiedenen Subregionen des CA3, wo sie Pyramidenzellen (*pyramidal cell*) innervieren. Als Besonderheit besitzen Körnerzellaxone mehrere Kollateralen, welche innerhalb der polymorphen Zellschicht verlaufen und dort bevorzugt auch GABAerge Interneurone, wie Korbzellen, innervieren (Acsady et al., 1998). Es bestehen zusammengefasst also intrinsische Verschaltungen über zum Beispiel Korbzellen und extrinsische Verbindungen zum CA3 über die Mossyfasern.

#### **1.1.2.4 Das Cornu ammonis**

Das CA, welches in den gängigsten Terminologien auch als eigentlicher Hippocampus beschrieben wird, besitzt über seine Subregionen des CA3 (nahe dem DG), des CA1 (am

entferntesten vom DG) und des CA2 (zwischen dem CA3 und dem CA1) einen relativ homogenen Schichtaufbau (Abbildung 4). Die histologisch am besten abzugrenzende Schicht ist hierbei die Pyramidenzellschicht (*Stratum pyramidale*), welche ihre namensgebenden exzitatorischen Neurone, die Pyramidenzellen, enthält. Unterhalb (ventral) dieser befindet sich in CA3 das Stratum oriens. Oberhalb (dorsal) der Pyramidenzellschicht befindet sich das Stratum radiatum. Beide Schichten enthalten die Axone der Pyramidenzellen. Die oberste Schicht des CA ist das Stratum lacunosum-moleculare, in dem sich vor allem Afferenzen aus dem EC und einzelnen anderen Hirnregionen befinden, welche hier nicht näher betrachtet werden sollen. Sowohl die Dendriten der Pyramidenzellen als auch verschiedene Arten von Interneuronen sind über das Stratum oriens, radiatum und lacunosum-moleculare verteilt (Andersen, 2007, S. 67f).



**Abbildung 4 Der Aufbau des Cornu ammonis**

(a) Schematische koronare Darstellung der einzelnen Regionen des Cornu ammonis (CA) mit seiner Lagebeziehung zum Gyrus dentatus (DG) und dem Subiculum (Sub). Das CA lässt sich in die Regionen CA1 bis CA3 unterteilen. Der schwarze Kasten im CA3 markiert den Bildausschnitt für (b). (b) Gezeigt ist die exemplarische, schematische Darstellung der einzelnen Schichten des CA3. Die schwarze Linie in (a) repräsentiert die Pyramidenzellschicht (*Stratum pyramidale*; sp), in welcher die Zellkörper der Pyramidenzellen (PC) lokalisiert sind. Die Schicht oberhalb von dieser, das Stratum lucidum (sl), ist charakteristisch für das CA3 und enthält die Mossyfasern der Körnerzellen des DG, welche Synapsen mit den Pyramidenzellen bilden. Über dieser befindet sich wiederum das Stratum radiatum (sr) und das Stratum lacunosum-moleculare (slm). Unterhalb des sp befindet sich das Stratum oriens (so). Alle drei zuletzt genannten Schichten enthalten die Dendritenbäume der Pyramidenzellen sowie verschiedene Interneurone, welche hier der Übersicht halber nicht abgebildet sind. Ohne das sl entspricht dieser Aufbau ebenfalls dem des CA2 und CA1. (basierend auf Andersen (2007), S. 66; erstellt mit BioRender.com)

Eine klare Besonderheit des Hippocampus ist seine starke intrinsische Vernetzung. Innerhalb des CA unterscheidet man zwischen zwei Verbindungstypen. Auf der einen Seite sind dies die kommissuralen Verbindungen, welche die Vernetzung der gleichen Regionen zwischen den

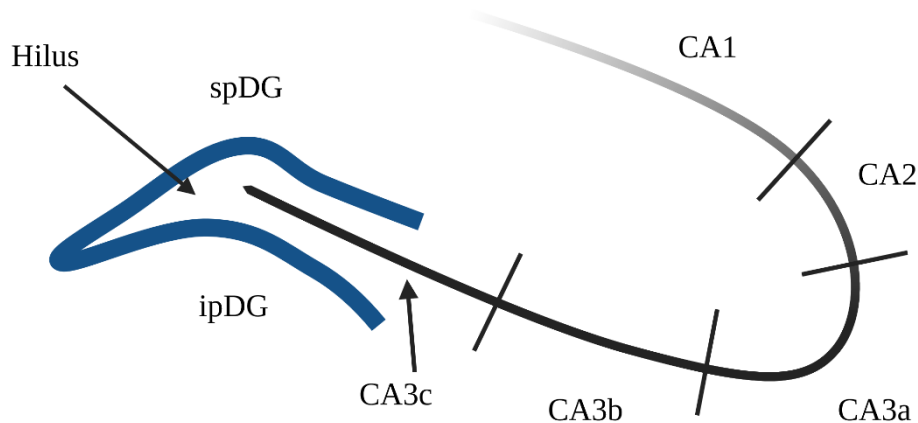
Hippocampi beider Hemisphären widerspiegeln. Auf der anderen Seite sind dies die Assoziationsverbindungen, welche die Projektionen der Pyramidenzellaxone innerhalb der Regionen des CA und zwischen diesen zusammenfassen. Anhand der Afferenzen des CA und anhand dieser Assoziationsverbindungen wird zwischen den einzelnen Regionen (CA1 – CA3) unterschieden, welche im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

#### **1.1.2.4.1 Das CA3**

Die Region des CA3 ist in Bezug auf den DG am weitesten proximal gelegen und reicht vom Hilus zwischen den Schenkeln des DG bis zum CA2. Charakteristisch für diesen Bereich ist die starke Innervation der Pyramidenzellen durch die Körnerzellen des DG über die Mossyfasern. Diese Innervation gibt auch die entsprechende Grenze zum CA2 vor, welche keine Eingänge mehr aus dem DG erhält. Charakteristisch für das CA3 ist weiterhin die besondere Rolle der pyramidalen Axone mit ihren ausgeprägten Kollateralen. Von diesen sind die Schaffer-Kollateralen die bekanntesten, welche die primäre Projektion vom CA3 zum CA1 darstellen. Neben diesen besitzen sie kräftige divergente Kollateralen, welche eine starke Vernetzung innerhalb des CA3 bewirken und dementsprechend ein ausgeprägtes Geflecht an Assoziationsverbindungen schaffen. Dies ist auch innerhalb der Hippocampusformation eine spezielle Eigenschaft, die zusammen mit den ausgeprägten kommissuralen Verbindungen für die besondere Rolle dieser Region spricht (Andersen, 2007, S. 71-75).

Innerhalb des CA3 lassen sich weitere Subregionen unterscheiden (Nó, 1934). Diese umfassen das CA3c (proximal in Bezug auf den DG), das CA3b (zwischen dem CA3c und CA3a) und das CA3a (distal in Bezug auf den DG und angrenzend an das CA2; Abbildung 5). Eine Aufteilung in diese Subregionen wurde ebenfalls aufgrund anatomischer und elektrophysiologischer Unterschiede vorgenommen, wie es schon bei der Aufteilung des Hippocampus an sich der Fall war (Ishizuka et al., 1990, Li et al., 1994, Meyer und Radulovic, 2021, Witter, 2007a). Der zentrale Faktor bei dieser Differenzierung ist der Charakter der Assoziationsverbindungen. So haben die Pyramidenzellen des CA3b und a ausgeprägte rekurrente Kollateralen, welche alle Subregionen des CA3 innervieren. Die Pyramidenzellen des CA3c hingegen haben nur wenige bis keine Kollateralen, welche im CA3 terminieren. Im Gegensatz zum CA3b und CA3a hat das CA3c jedoch rekurrente Kollateralen, welche zurück zum DG verlaufen und hier vor allem Mossyzellen, Körnerzellen und Interneurone der polymorphen Schicht innervieren. Über das CA3c besteht somit eine Rückkopplung zum DG, was für die weiteren Anteile der Hippocampusformation untypisch

ist (Andersen, 2007, S. 74). Zur Übersichtlichkeit soll auf die Differenzierung zwischen dem CA3b und CA3a in diesem Rahmen nicht weiter eingegangen werden, da sie für diese Doktorarbeit weniger relevant ist.



**Abbildung 5 Die Subregionen des CA3**

Schematische koronare Darstellung der Unterteilung des Cornu ammonis 3 (CA3) in seine Subregionen des CA3a bis c. In Bezug auf den Gyrus dentatus befindet sich das CA3c am nächsten zu diesem und wird anteilig von dem suprapyramidalen (spDG) und dem infrapyramidalen Schenkel des DG umgeben. An das CA3c schließt sich die Subregion des CA3b an. Am weitesten entfernt vom DG liegt das CA3a, welches an das Cornu ammonis 2 (CA2) angrenzt. Das Cornu ammonis 1 (CA1) ist nur anteilig mit abgebildet. (erstellt mit BioRender.com)

#### 1.1.2.4.2 Das CA2 und CA1

Das CA2 und das CA1 stellen in den Schaltkreisen der Hippocampusformation den nächsten Abschnitt dar (Andersen, 2007, S. 71-75). Wie im vorherigen Kapitel bereits beschrieben, erhält das CA2 keine Afferenzen vom DG. Daher bekommt das CA2 vor allem Eingänge aus dem CA3 und entsendet seine Axone und Kollateralen in alle Anteile des Hippocampus. Das CA2 ist insgesamt nur eine kleine und bisher die am wenigsten untersuchte Region des Hippocampus und soll an dieser Stelle aufgrund ihrer eher untergeordneten Rolle in dieser Arbeit nicht näher charakterisiert werden.

Die Region des CA1 ist hingegen ein gut erforschter Abschnitt des Hippocampus. Sie erhält primär Eingänge aus dem CA3, wobei zwischen den jeweiligen Lokalisationen der Zellen unterschieden werden muss. So erhalten die Zellen des CA1, welche sich näher am CA2 befinden mehr Eingänge aus den Bereichen des CA3, welche sich ebenfalls näher am CA2 befinden. Im Gegensatz hierzu erhalten die Neurone des CA1, welche näher am Subiculum gelegen sind, mehr Eingänge von Pyramidenzellen des CA3, welche näher am DG gelegen sind (vgl. Abbildung 4). Assoziationsverbindungen sind im CA1 im Gegensatz zum CA3

grundsätzlich kaum vorhanden und auch die kommissuralen Verbindungen zur kontralateralen Hemisphäre sind nur schwach ausgeprägt (Andersen, 2007, S. 71-75).

Die Pyramidenzellen aus dem CA1 entsenden ihre Axone einerseits an das Subiculum und andererseits zurück zum EC. Im Vergleich zum DG sowie zum CA3 und CA2 entsteht hier somit erstmals wieder eine Verbindung zurück zum EC, wodurch der Schaltkreis sich wieder schließt. Auch hier besteht jedoch eine topographische Organisation der Verbindungen, bei denen die proximalen Anteile des CA1 (nahe dem CA2) ausschließlich zum MEC verlaufen und distale Anteile vor allem zum LEC (Andersen, 2007, S. 91).

#### **1.1.2.5 Der Hilus des Gyrus dentatus**

Der Hilus des DG stellt in der Hippocampusformation einen speziellen Abschnitt dar, in dem es nicht nur kräftige Verbindungen im Sinne der Mossyfasern vom DG zum CA3 gibt, sondern in dem auch ausgeprägte Rückprojektionen von überwiegend dem CA3c zum DG vorhanden sind (Scharfman, 2007). Da die Rückprojektionen im Rahmen dieser Dissertation eine große Rolle spielen, soll an dieser Stelle noch einmal näher auf sie eingegangen werden.

Wie oben bereits beschrieben, wird der Hilus durch die polymorphe Schicht des spDG und ipDG gebildet, in der sich sowohl Mossyfasern befinden als auch Interneurone wie GABAerge Korbzellen oder glutamaterge Mossyzellen. Beide Klassen werden, wie die Pyramidenzellen im CA3, durch Mossyfasern innerviert. Diese innervieren wiederum die Körnerzellen des DG, wodurch entweder eine Exzitation oder eine Inhibition von letzteren hervorgerufen werden kann (Scharfman, 2007). Es bestehen also rekurrente Verbindungen variabler Funktion innerhalb des DG.

In weiteren Studien, in denen die Ausdehnung von Axonen einzelner Pyramidenzellen betrachtet wurde, wurde weiterhin festgestellt, dass vor allem die des CA3c zahlreiche rekurrente Kollateralen besitzen, die letztlich Synapsen mit den Körnerzellen innerhalb der Körnerzellschicht oder auch der molekularen Schicht bilden und aller Wahrscheinlichkeit nach auch verschiedene Klassen an Interneuronen innervieren (Ishizuka et al., 1990, Li et al., 1994). Damit bestehen ebenfalls charakteristische Rückprojektionen vom CA3c zum DG, die starken Einfluss auf die Zellaktivität des DG und damit auf die Eingänge im CA3 selbst haben können. Inwiefern dies die Funktion der einzelnen Bereiche beeinflusst, soll in späteren Kapiteln noch weiter diskutiert werden.

### **1.1.3 Funktionelle Einbindung der Hippocampusformation**

Im Rahmen erster Fallberichte wurde herausgefunden, dass Personen mit einer Schädigung der Hippocampusformation unter einer anterograden Amnesie leiden (Dossani et al., 2015, Scoville und Milner, 1957). Es können nur noch wenige Informationen in das Langzeitgedächtnis übertragen werden und aufgenommene Informationen bleiben meist nur wenige Minuten abrufbar. Entsprechend dieser Beobachtungen wurde schon früh entdeckt, dass die Hippocampusformation verantwortlich für die Bildung des deklarativen Langzeitgedächtnisses ist. Sie trägt damit zur Überführung von semantischen und episodischen Gedächtnisinhalten aus dem Kurzzeitgedächtnis in das Langzeitgedächtnis bei (Pape et al., 2014, S. 829f). Bereits vor einigen Jahrzehnten wurde zusätzlich die Theorie aufgestellt, dass die Hippocampusformation zwischen bereits gelernten Gedächtnisinhalten und neuen, beziehungsweise etwas veränderten Informationen unterscheiden können muss (Marr, 1971, Treves und Rolls, 1994). Entsprechend dieser Überlegungen wurde die Theorie der „pattern separation“ (Musterdifferenzierung) und der „pattern completion“ (Musterkomplettierung) aufgestellt. Die Musterdifferenzierung dient hierbei der Unterscheidung von Informationen wie beispielsweise ähnlichen Umgebungen, wenn auch nur geringe Unterschiede vorhanden sind. Die Musterkomplettierung hingegen dient dem Abrufen beziehungsweise der Erinnerung bereits gespeicherter Informationen, wenn diese nur unvollständig präsentiert werden (Rolls und Kesner, 2006). Beide Prozesse basieren auf funktionellen Eigenschaften verschiedener Subregionen der Hippocampusformation und sollen im Folgenden vorgestellt werden.

## 1.2 Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung

Die Musterdifferenzierung und die Musterkomplettierung sind Mechanismen, welche sich nur unvollständig voneinander abgrenzen lassen und teilweise einen fließenden Übergang zeigen. In den folgenden Kapiteln werden beide Prozesse definiert und die grundlegenden Studienarten, welche zur bisherigen Charakterisierung der Prozesse geführt haben, mit den für diese Arbeit bedeutendsten Erkenntnissen vorgestellt. Die Aufführung dieser Studien soll außerdem sowohl dem besseren Verständnis der funktionellen Zuordnung der Regionen als auch als Grundlage für die ausführliche Bezugnahme auf diese in der Diskussion dieser Arbeit dienen. Hierbei soll in erster Linie die Verarbeitung von räumlichen Informationen thematisiert werden, da ihre Prozessierung auch das zentrale Thema dieser Doktorarbeit darstellt.

### 1.2.1 Musterdifferenzierung

Die Musterdifferenzierung, welche im englischen Sprachgebrauch unter dem Begriff der „*pattern separation*“ bekannt ist, beschreibt einen Prozess, der zur Unterscheidung von Sinneseindrücken und hiermit verbunden von Erinnerungen dient (Marr, 1971, Treves und Rolls, 1994). Bezogen auf räumliche Umgebungen soll dieser Prozess einerseits die grundsätzliche Unterscheidung verschiedener Umgebungen ermöglichen, andererseits aber auch nur geringste Änderungen innerhalb eines bekannten Kontextes ausmachen und hervorheben können. Kommt man beispielsweise in einen bekannten Raum, in dem eine der Wände eine andere Farbe hat als zuvor, so führt die Musterdifferenzierung zu der Erkenntnis, dass die Farbe dieser Wand seit der vorherigen Betrachtung dieses Raumes geändert wurde.

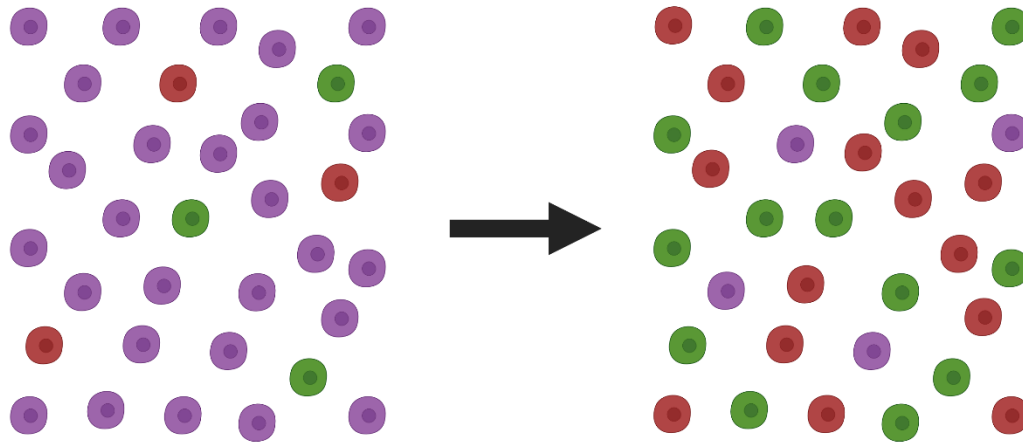
Wird dieser Mechanismus auf die Hippocampusformation übertragen, so wurde der Prozess der Musterdifferenzierung bereits früh dem DG zugeschrieben. Grundlage für diese Zuordnung war vor allem die hohe Zahl an Körnerzellen im Vergleich zu der an Pyramidenzellen im CA3 oder auch im CA1. So wurde damals und wird heute noch davon ausgegangen, dass dieselben Informationen auch von denselben Neuronen verarbeitet und gespeichert werden und dass zur Repräsentation einer Umgebung eine entsprechende Anzahl von Neuronen, folglich auch als Population oder Ensemble bezeichnet, aktiviert wird. Basierend auf einer hohen Zellzahl im DG und den zielgerichteten Verbindungen zum CA3 werden dem DG hervorragende Voraussetzungen für die Aktivierung möglichst verschiedener Neuronensembles bei verschiedenen Wahrnehmungen oder Umgebungen und damit für den



Prozess der Musterdifferenzierung zugeschrieben (Rolls, 2016). Setzt man diese Zahlen an Neuronen für Nagetiere auf einer Höhe entlang der rostrokaudalen Achse ins Verhältnis, so besteht der DG aus der bis zu zwölffachen Zahl an Körnerzellen, wie die Region des CA3 aus Pyramidenzellen besteht (Andersen, 2007S. 55f). Dieses Verhältnis existiert vor allem in den dorsalen Anteilen der Hippocampusformation und lässt nach ventral deutlich nach. Trotz dieser hohen Anzahl an Körnerzellen wird eine Pyramidenzelle im CA3 jedoch nur von ca. 46 Mossyfasern innerviert, was im Vergleich zu ungefähr 3.600 Eingängen aus dem EC und im Vergleich zu ca. 12.000 rekurrenten Kollateralen aus dem CA3 selbst auf eine einzelne Pyramidenzelle eine nur sehr geringe Zahl darstellt (Rolls, 2016). Die Effizienz der Innervation durch Mossyfasern ist aufgrund ihrer Soma-nahen Synapsenbildung jedoch unanfechtbar. Aus dieser hohen Effizienz der Signalübertragung bei gleichzeitig niedriger Anzahl an Eingängen einer Pyramidenzelle aus dem DG lässt sich bereits die hohe Relevanz jeder einzelnen Körnerzelle ableiten. Stark vereinfacht gesagt, entscheiden die Körnerzellen des DG damit, ob eine Pyramidenzelle des CA3 aktiviert wird oder nicht. Zusammen mit dem oben erwähnten niedrigen Übertragungsverhältnis vom DG auf das CA3 kann somit äußerst präzise selektiert werden, welche Pyramidenzellen des CA3 aktiviert werden und, vereinfacht gesagt, welche Erinnerung gespeichert, abgerufen oder nur teilweise abgerufen werden soll. Übertragen wir diese Theorie in ein Beispiel so ergibt sich das folgende Gedankenspiel. Befindet sich ein Lebewesen nacheinander in zwei verschiedenen Umgebungen, die sich zu einem gewissen Grad unterscheiden, so gelangen die Informationen aus beiden über den EC in die Hippocampusformation. Weiter werden die Informationen zu den Umgebungen an den DG gesendet, wo sie je nach Ähnlichkeit dieser beiden Kontexte nun durch sich mehr oder weniger überschneidende Neuronensembles repräsentiert werden. Die Muster an aktivierten Neuronen, welche die Umgebungen repräsentieren, werden also je nach Ähnlichkeit mehr oder weniger getrennt, bevor die Informationen an das CA3 weitergeleitet werden (Abbildung 6). Aufgrund dieser Mustertrennung wird durch den DG bestimmt, welche Neurone des CA3 aktiviert werden und ob die zweite Umgebung damit als bekannt und der ersten gleich oder leicht verändert empfunden wird. Exakt dieser Mechanismus beschreibt den Prozess der Musterdifferenzierung.

Der Prozess findet dabei sowohl für die Verarbeitung von räumlichen als auch von zeitlichen, geruchsbezogenen oder auch sozialen Informationen statt (Kesner und Rolls, 2015, Moser und Moser, 1998). In diesem Rahmen hat sich herausgestellt, dass räumliche Eindrücke vor allem durch die dorsale Hippocampusformation verarbeitet werden, während Gerüche und Emotionen wie Angst eher über ventrale Anteile prozessiert werden (Bannerman et al., 2002,

Hunsaker und Kesner, 2008, Moser und Moser, 1998). Im Weiteren wird das Hauptaugenmerk aufgrund des Fokus dieser Arbeit auf die räumlichen Aspekte auf der dorsalen Hippocampusformation liegen.



**Abbildung 6 Beispiel einer Musterdifferenzierung**

Schematische Darstellung von Neuronen in Reduktion auf ihren Zellkörper als Beispiel einer Musterdifferenzierung. Bezogen auf das oben genannte Beispiel stelle man sich vor, dass ein Individuum nacheinander zwei sich unterscheidende Umgebungen erkundet. Neurone, welche nur in Kontext 1 aktiviert werden, sind grün abgebildet. Neurone, welche nur in Kontext 2 aktiviert werden, sind rot abgebildet. Neurone, welche in beiden Kontexten aktiviert werden, sind violett dargestellt. Würden beispielsweise zwei sich halbwegs ähnliche Umgebungen betrachtet werden, ohne dass es den Mechanismus einer Musterdifferenzierung gäbe, so würde ein Großteil der Neurone in beiden Kontexten aktiviert werden. Hieraus würde eine Situation mit starker Überschneidung zweier aktivierter Neuronenpopulationen folgen, wie sie links dargestellt ist (viele violette Neurone). Wäre der Mechanismus einer Musterdifferenzierung vorhanden, so wäre diese Überschneidung der Neuronenpopulationen, die in den jeweiligen Kontexten aktiviert werden würden, geringer und es würde eine Situation wie rechts im Bild folgen. Nur weniger Neurone wären in beiden Situationen aktiv (wenige violette Neurone). (erstellt mit BioRender.com)

## 1.2.2 Musterkomplettierung

Die Musterkomplettierung, welche im englischen Sprachgebrauch unter dem Begriff der „*pattern completion*“ bekannt ist, wird häufig als Gegenspieler zur Musterdifferenzierung angesehen, da sie nicht der Unterscheidung von Informationen dient, sondern ihrer Vervollständigung (Marr, 1971, Treves und Rolls, 1994). Erneut bezogen auf räumliche Eindrücke soll dieser Mechanismus dazu dienen, dass in Bezug auf eine Erinnerung bei einer unvollständigen Umgebung die gesamte Erinnerung an diese abgerufen wird. Kommt man beispielsweise in einen bekannten Raum, aus dem ein Objekt entfernt wurde, so führt die Musterkomplettierung zu der Erinnerung, dass an der entsprechenden Stelle zuvor ein Objekt stand.

Auf anatomischer Ebene wird dieser Prozess dem CA3 zugeordnet, da bereits seit einigen Jahrzehnten den zahlreichen Assoziationsverbindungen innerhalb des CA3 ein sehr hohes Potenzial für die Speicherung und das Abrufen von Informationen zugeschrieben wird (Schmidt et al., 2012a). Erhält ein Individuum also Eindrücke aus einer bekannten Umgebung, die sich nur lückenhaft präsentiert, so soll im CA3 dieselbe Neuronenpopulation aktiviert werden, welche in dem vollständigen Kontext aktiviert wurde und die Erinnerung an diese damit abgerufen werden. Diese Aktivierung von Neuronen, welche eine vollständige Erinnerung hervorruft, obwohl die Eindrücke aus dieser Erinnerung nur anteilig vorliegen, beschreibt den Prozess der Musterkomplettierung (Kesner, 2007).

### **1.2.3 Läsionsstudien zur funktionellen Charakterisierung der hippocampalen Subregionen**

Läsionsstudien gehören mit zu den grundlegenden Experimenten, welche nach der anatomischen Deskription der Verschaltungen der Hippocampusformation durchgeführt wurden und so zur funktionellen Charakterisierung spezifischer Regionen beigetragen haben. Bei diesen Studien wurden bestimmte Abschnitte der Hippocampusformation mit Neurotoxinen wie Colchicin oder Ibotensäure geschädigt. Anschließend wurden Verhaltensauffälligkeiten und -defizite beobachtet und hierüber auf die Beeinflussung bestimmter Verarbeitungsprozesse innerhalb der Formation zurückgeschlossen (Gilbert et al., 2001, Hunsaker et al., 2008).

#### **1.2.3.1 Läsionen des Gyrus dentatus**

Entsprechend der vermuteten Funktion der Musterdifferenzierung des DG wurden vor allem Experimente zur Unterscheidung von Lokalisationen in bestimmten Umgebungen durchgeführt. So haben Gilbert et al. (2001) Ratten zu Trainingszwecken auf eine Ebene gesetzt, die bis zu 177 Vertiefungen aufwies, auf denen wiederum einzelne Objekte platziert waren. Hier wurden sie darauf konditioniert, immer an einer bestimmten Position Futter unter einem Objekt vorzufinden. In dem eigentlichen Experiment wurden einem Teil der Ratten nun entsprechende Läsionen des DG oder des CA1 gesetzt und die Aufgabe gestellt, zwischen zwei Objekten mit variierendem Abstand zu entscheiden, unter welchem sich das Futter befinden würde. Eine Kontrollgruppe erhielt nur Injektionen der Trägersubstanz der verwendeten Toxine und bekam die gleiche Aufgabe. Sowohl die Gruppe mit den Läsionen im DG als auch die Gruppe mit denen im CA1 konnte, wie die Kontrollgruppen, gut zwischen

Objekten unterscheiden, welche in großem Abstand aufgestellt wurden. Wurde der Abstand der beiden Objekte verringert, so hatten zunehmend diejenigen Tiere Probleme, das richtige Objekt auszuwählen, welche die Läsionen im DG erhalten haben. Dies entsprach einer gestörten Musterdifferenzierung bei Ausschaltung des DG (Gilbert et al., 2001).

Ähnliches wurde beobachtet, wenn untersucht wurde, wie viel Zeit Ratten bei der Erkundung von Objekten verbrachten, wenn diese am gleichen Ort blieben oder in unterschiedlichem Ausmaß verschoben wurden. In diesem Rahmen wurde gezeigt, dass Ratten nicht mehr zwischen neuen und bekannten Lokalisationen differenzieren konnten, wenn sie Läsionen im DG erhalten hatten (Goodrich-Hunsaker et al., 2008). Auch hier war die Musterdifferenzierung demzufolge unterbrochen.

### **1.2.3.2 Läsionen des CA3**

Entsprechende Verhaltensstudien wie im vorherigen Kapitel wurden ebenfalls bei Läsionen des CA3 in Ratten durchgeführt. Hier schienen derartige Beeinträchtigungen der Musterdifferenzierung nur in geringem Maße vorzuliegen, was so interpretiert wurde, dass der DG die eigentliche Musterdifferenzierung durchführt, diese vorverarbeiteten Informationen aber vom CA3 weiterführend prozessiert werden (Goodrich-Hunsaker et al., 2008).

In einer weiterführenden Studie wurden die Läsionen in dem von Goodrich-Hunsaker et al. (2008) durchgeführten Experiment spezifischer ausgewertet. Hierunter fiel auf, dass die Läsionen, welche im CA3 gesetzt wurden, nur die Subregionen des CA3b und a betraf, nicht jedoch des CA3c (Hunsaker et al., 2008). Für eine nähere Evaluation der Subregionen wurden nun zusätzlich Läsionen explizit nur des CA3c geschaffen und das Verhalten von Ratten ausgewertet, wenn diesen erneut Objekte mit unterschiedlichem Abstand oder die gleichen Objekte in einer runden oder einer quadratischen Box präsentiert wurden. Hierunter fielen erneut gravierende Defizite bei Läsionen des DG auf, ebenso wie Defizite bei Läsionen des CA3c. Der Einfluss von Läsionen des CA3b und a war hingegen nur gering (Hunsaker et al., 2008).

Demzufolge konnten hier erste Hinweise auf eine mögliche Kooperation vom DG und dem CA3c oder auf eine nachgeschaltete Verarbeitung der gleichen Informationen durch beide Bereiche beobachtet werden, da beide an der Musterdifferenzierung beteiligt zu sein schienen. CA3b und a schienen hier jedoch keinen großen Anteil an der Musterdifferenzierung zu nehmen.

### **1.2.3.3 Läsionen der ventralen im Vergleich zur dorsalen Hippocampusformation**

Unterschiede zwischen der ventralen und dorsalen Hippocampusformation wurden bereits früh mittels klassischer Experimente untersucht. Zu diesen gehört unter anderem das Morris-Wasserlabyrinth, in dem Ratten oder Mäuse in einem großen Behälter mit Wasser platziert wurden. In diesem gab es nur eine kleine Plattform knapp unterhalb der Wasseroberfläche, auf die sich die Tiere retten konnten, ohne dass sie diese jedoch sehen konnten. Zur Orientierung wurden hier meist Symbole an den Wänden des Raums verwendet. Gesunde Tiere konnten sich die Lokalisation der Plattform nach einigen Versuchen bereits gut merken und zeigten rasch direkte Schwimmrouten zu der erwarteten Plattform.

Um die Auswirkungen von ventralen oder dorsalen Schäden der Hippocampusformation zu untersuchen, wurden Ratten mit entsprechenden Läsionen des dorsalen oder ventralen Hippocampus versehen und in das Morris-Wasserlabyrinth gesetzt. Anschließend wurde ausgewertet, mit welcher Verzögerung die Tiere im Vergleich zu Kontrollgruppen die Plattform nach vorherigem Training erreicht haben. Es zeigten sich dabei starke Verzögerungen des Erreichens der Plattform, wenn die Tiere Läsionen des dorsalen Hippocampus erhalten hatten. Hingegen haben Schäden des ventralen Hippocampus keine relevanten Verzögerungen bewirkt (Moser et al., 1993). Dies waren bereits erste Hinweise darauf, dass vor allem die dorsale Hippocampusformation eine Rolle bei der räumlichen Orientierung spielt, was in darauffolgenden Studien noch weiter bestätigt wurde (Bannerman et al., 2002, Bannerman et al., 2004, Moser et al., 1995, Moser und Moser, 1998).

### **1.2.3.4 Resümee der Läsionsstudien**

Eine Zusammenfassung der Läsionsstudien ergibt das einheitliche Bild einer primär durch den DG durchgeführten Musterdifferenzierung. Sowohl für das Unterscheiden bekannter und neuer Objekte als auch zwischen bekannten und neuen Positionen dieser ist die Funktionsfähigkeit des DG notwendig. Darüber hinaus kann ebenso der Subregion des CA3c zumindest eine Mitarbeit an der Musterdifferenzierung zugesprochen werden. Die weiteren Subregionen des CA3 scheinen jedoch nur einen geringen Einfluss auf den Prozess der Musterdifferenzierung zu nehmen. Wie genau derartige Läsionsstudien eine funktionelle Charakterisierung erlauben, ist bei nicht auszuschließenden Läsionen der angrenzenden Faserbahnen und bezogen auf das CA3c der angrenzenden Interneurone der polymorphen

Schicht des DG jedoch nicht vollkommen sicher. Von einer primären Prozessierung räumlicher Informationen durch die dorsalen Anteile der Hippocampusformation kann jedoch ausgegangen werden.

#### **1.2.4 Knockout-Studien zur Charakterisierung der hippocampalen Subregionen**

Knockout-Experimente nutzen grundsätzlich die Veränderung oder Manipulation des genetischen Materials von Lebewesen, wodurch die Gene oder deren Produkte ihre Funktion verlieren. Bei Knockout-Studien zur Hippocampusformation bediente man sich vor allem an Modifikationen von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren). NMDA-Rezeptoren sind an den Plastizitätsvorgängen innerhalb der Hippocampusformation beteiligt und ermöglichen vor allem den Mechanismus der Langzeitpotenzierung, der für die Gedächtnisbildung essenziell ist (Pape et al., 2014, S. 833-835).

Für die Untersuchung der Musterdifferenzierung wurde eine Mauslinie verwendet, bei welcher das Gen für eine Untereinheit (NR1) der NMDA-Rezeptoren nur innerhalb des DG ausgeschaltet wurde und diese somit funktionsunfähig waren (McHugh et al., 2007). Wurde an solch einer Gruppe von Mäusen eine kontextbezogene Angstkonditionierung durchgeführt, wurden sie also darauf trainiert, in einer bestimmten Umgebung Schmerzreize zu erwarten, so taten sie dies auch in einer ähnlichen Umgebung, welche sich jedoch merklich von der antrainierten unterschied. Im Unterschied zur gesunden Kontrollgruppe, welche in der zweiten Umgebung keine Angstreaktion zeigte und somit zwischen den beiden Kontexten unterscheiden konnte, wurde bei den Knockout-Mäusen somit durch die Manipulation der NMDA-Rezeptoren im DG die Fähigkeit zur Diskriminierung zweier Umgebungen ausgeschaltet. Demzufolge bestand eine Unfähigkeit zur räumlichen Musterdifferenzierung. Hierdurch lässt sich erneut eine Zuordnung der Funktion der Musterdifferenzierung zum DG ableiten.

Auch für die Untersuchung der Musterkomplettierung wurde eine ähnliche Studie durchgeführt, bei der eine Mauslinie verwendet wurde, bei welcher eine Untereinheit des NMDA-Rezeptors in Pyramidenzellen, speziell im CA3, ausgeschaltet wurde (Nakazawa et al., 2002). Die Mäuse einer solchen Gruppe wurden in das im vorherigen Kapitel bereits beschriebene Morris-Wasserlabyrinth gesetzt und darauf trainiert, in der konstant gleichen Umgebung immer wieder die Plattform zu finden. Nachdem man ihnen jedoch einige der Hinweise an den Wänden genommen hatte, waren sie nicht mehr in der Lage, die Plattform in

der bekannten Position in der gleichen Zeit wie eine gesunde Kontrollgruppe zu finden. Ihnen wurde demzufolge die Fähigkeit der gesunden Kontrollgruppe genommen, sich durch eine nur gering veränderte Umgebung an die vorher bekannte Umgebung sowie die Lokalisation der Plattform zu erinnern und dementsprechend eine Musterkomplettierung durchzuführen. Hier lässt sich der Prozess der Musterkomplettierung somit dem CA3 zuordnen.

## **1.2.5 Elektrophysiologische Charakterisierung**

Elektrophysiologische Studien haben den großen Vorteil, dass man die Zellaktivität einzelner Neurone direkt in vivo bestimmen und damit sowohl registrieren kann, wann ein Neuron aktiv ist, als auch welche Aktivitätsmuster es aufweist. Mittels stereotaktischer Elektrodenplatzierung im DG oder in Regionen des CA konnten somit weitere Eigenschaften von Körnerzellen als auch von Pyramidenzellen bestimmt werden, welche im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

### **1.2.5.1 Elektrophysiologische Eigenschaften des Gyrus dentatus**

Bereits in zahlreichen Studien wurde beschrieben, dass die Aktivität eines Neurons im DG ortsabhängig ist (Danielson et al., 2016, GoodSmith et al., 2017, Leutgeb et al., 2005, Senzai und Buzsaki, 2017). Ein Neuron weist vereinfacht dann ein Aktionspotential auf, wenn sich die Maus oder Ratte an einem bestimmten Ort befindet. Entsprechend dieser Beobachtung wurde der Begriff der „Ortszelle“ (*place cell*) eingeführt. Ebenso wurde gezeigt, dass der DG nur eine sehr geringe Zellaktivität von 2 – 4 % seiner Neurone in einer räumlichen Umgebung aufweist, was deutlich weniger im Vergleich zum CA3 oder dem CA1 ist (Alme et al., 2010, Jung und McNaughton, 1993, Leutgeb et al., 2007, Schmidt et al., 2012a).

Betrachtet man diese Aussage in Blick auf die Theorie der Musterdifferenzierung, so passt diese spärliche Zellaktivität des DG hervorragend zu den initialen, in Kapitel 1.2.1 dargelegten Überlegungen und somit zur Abgrenzung von Umgebungen, indem für einzelne Kontexte nur ein kleiner Bruchteil an Zellen aktiviert wird, um eine Überschneidung der Neuronensembles zu verhindern.

Betrachtet man ebenfalls Studien, in denen untersucht wurde, wie sich das Aktivitätsmuster von Körnerzellen verändert, wenn Tiere zwei verschiedene Umgebungen erkunden, so wurde hier der Begriff der „Umkartierung“ (*remapping*) eingeführt (Danielson et al., 2016, Leutgeb et al., 2005). Hierbei lässt sich zwischen einer Frequenz-Umkartierung (*rate remapping*) und einer räumlichen Umkartierung (*spatial remapping*) unterscheiden, was einer Veränderung

der Feuerrate eines Neurons beziehungsweise der Aktivierung eines anderen Neurons an dessen Stelle entspricht. Beides zusammengefasst wird auch als globale Umkartierung (*global remapping*) bezeichnet und beschreibt ein paralleles Stattfinden beider Prozesse. In diesem Rahmen wurde beobachtet, dass sich die Feuerrate von Neuronen verändert hat, wenn Ratten einer gleichen Umgebung mit jedoch veränderten lokalen Hinweisen exponiert wurden (Leutgeb et al., 2005). Die Gruppe an aktiven Neuronen blieb für die Umgebung konstant. Die veränderte Feuerrate beziehungsweise Frequenz der Neurone implizierte jedoch eine Frequenz-Umkartierung in Anbetracht der veränderten lokalen Hinweise. Veränderte man hingegen den Ort an sich, auch wenn die lokalen Hinweise die gleichen blieben, so schien sich sowohl die Gruppe an Zellen zu ändern, welche in diesem Kontext aktiviert wurden (räumliche Umkartierung), als auch deren Feuerrate. Dies entsprach wiederum einer globalen Umkartierung.

Derartige Veränderungen ließen sich ebenfalls im Rahmen der Theorie der Musterdifferenzierung interpretieren. So kann innerhalb des DG sowohl mittels der Rekrutierung neuer Neurone, entsprechend einer räumlichen Umkartierung, als auch mittels veränderter Aktivitätsmuster im Sinne einer Frequenz-Umkartierung der Prozess einer Musterdifferenzierung durchgeführt werden. Bei Kombination dieser beiden Mechanismen wird die Menge an voneinander abgrenzbaren Erlebnissen nochmals deutlich erweitert.

Eine Einschränkung vieler elektrophysiologischer Studien innerhalb dieses Bereichs war jedoch die ungenaue Bestimmung der Zellart die aufgezeichnet wurde (Senzai und Buzsaki, 2017). So wurde meist anhand histologischer Schnitte auf die Zellschicht geschlossen, in der die Elektrodenpitze platziert gewesen sein muss. Aufgrund der in Kapitel 1.1.2.3 bereits beschriebenen dichten Organisation des DG mit zahlreichen Interneuronen, welche teilweise genau an der Grenze zwischen der Körnerzellschicht und der polymorphen Schicht liegen, konnte nicht vollständig sichergestellt werden, dass in diesen Studien Körnerzellen und nicht Interneurone wie Mossyzellen aufgezeichnet wurden. Mittels weiterentwickelter Methoden, wie der Kalzium-Bildgebung, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, wurde in weiteren Studien genauer zwischen den Neuronenklassen differenziert (Danielson et al., 2017, Senzai und Buzsaki, 2017). Dementsprechend wurde gezeigt, dass Mossyzellen deutlich häufiger und ausgeprägter Umkartierungen aufweisen als Körnerzellen und dass diese auch in multiplen Kontexten aktiv sind. Daher ist es wahrscheinlich, dass Mossyzellen in hohem Maß in den Prozess der Musterdifferenzierung involviert sind und dieser nicht allein den Körnerzellen zugeschrieben werden kann.



### **1.2.5.2 Elektrophysiologische Eigenschaften des CA3**

In Studien zur Evaluation des Aktivitätsmusters von Pyramidenzellen im CA3 wurden bisher teils übereinstimmende, teils aber auch inhomogene Ergebnisse beschrieben (Neunuebel und Knierim, 2014, Leutgeb et al., 2005, Lu et al., 2015). So führten Leutgeb et al. (2005) eine Studie durch, in der beobachtet werden konnte, dass in Ratten eine konstante Zellgruppe im CA3 aktiviert wurde, wenn sie in die gleiche Umgebung mit veränderten lokalen Hinweisen gesetzt wurden. Gleichzeitig registrierte man jedoch eine Veränderung der Aktivitätsmuster einzelner Neurone im Sinne einer Frequenz-Umkartierung. Anhand letzterer ist somit der Prozess einer Musterdifferenzierung auszumachen. Die Rekrutierung einer konstanten Neuronenpopulation kann hingegen entweder als gleichzeitige Musterkomplettierung interpretiert werden oder als nicht benötigte räumliche Umkartierung einer Musterdifferenzierung, da die Veränderungen des Kontextes nicht ausreichend stark waren. In anderen Studien wurde hingegen nur eine Musterkomplettierung im CA3 registriert, während eine Musterdifferenzierung nur im DG beobachtet wurde (Neunuebel und Knierim, 2014). Entsprechend einer genaueren Differenzierung zwischen den Subregionen des CA3 in einer Studie von Lu et al. (2005) wurde, wie es bei Läsionsstudien der Fall gewesen war, ebenfalls eine Inhomogenität entlang der Achse des CA3 festgestellt. Hier wurde in den proximalen Anteilen des CA3 (nahe dem DG und damit in etwa dem CA3c entsprechend) eine Beteiligung an der Musterdifferenzierung erfasst, während in distalen Anteilen (nahe dem CA2 und damit eher dem CA3a entsprechend) Prozesse im Sinne einer Musterkomplettierung zu registrieren waren. Zu ähnlichen Resultaten kamen auch Lee et al. (2015). Passend zu den anatomischen Grundlagen sprechen diese Ergebnisse also für eine funktionelle Heterogenität entlang der Subregionen des CA3.

### **1.2.5.3 Resümee elektrophysiologischer Studien**

Eine Zusammenfassung der elektrophysiologischen Studien bestätigt die Zuständigkeit des DG für die Musterdifferenzierung und charakterisiert die hier ablaufenden Prozesse genauer, als es die Läsionsstudien getan haben. So werden im DG grundsätzlich nur wenige Neurone an der Verarbeitung der Informationen einer Situation beteiligt. Unter diesen können sogenannte Ortszellen ausgemacht werden, welche repetitiv an der gleichen räumlichen Position eines Individuums aktiviert werden. Zusätzlich kann im Rahmen der Musterdifferenzierung zwischen einer Frequenz-Umkartierung und einer räumlichen Umkartierung unterschieden werden, durch die eine zusätzliche Variabilität in der Codierung

einer Umgebung ermöglicht wird. Im CA3 wurden im Gegensatz zum DG unterschiedliche Reaktionen auf die Erkundung von Umgebungen registriert, wodurch hier von einer nicht ganz eindeutigen bis variablen Funktion ausgegangen werden muss, die zusätzlich eine asymmetrische Verteilung entlang der transversalen Achse des CA3 (vom DG bis zum CA2) aufweist. Auch hier kann jedoch die Hypothese einer Beteiligung des CA3c an der Musterdifferenzierung aufgestellt werden.

### **1.2.6 Charakterisierung auf Neuronenpopulationsebene**

Mit den bisher aufgeführten Methoden konnten bereits tiefe Einblicke in die Prozesse der Musterdifferenzierung und -komplettierung in der Hippocampusformation gewonnen werden. Ein Nachteil, den alle bislang verwendeten Methoden gemeinsam haben, ist allerdings die nur unzureichende, quantitative Erfassung der aktivierten Zellen. Nachdem mittels Läsions- und Knockout-Studien nur das Verhalten der Tiere beobachtet wurde, kam die Analyse elektrophysiologisch aufgezeichneter Zellaktivitäten der Beobachtung der Prozesse noch am nächsten. Dennoch wurde hier meist nur eine Zahl an Zellen im dreistelligen Bereich untersucht (Leutgeb et al., 2005, Leutgeb et al., 2007, Lu et al., 2015). Hierdurch konnten zwar zunehmende Erkenntnisse zum Aktivitätsverhalten einzelner Zellen erhalten werden, doch die Aktivität von Neuronensembles und deren Interaktion blieb bislang weitgehend unklar. Erkenntnisse zu diesem Gebiet brachten in den letzten Jahrzehnten vor allem Studien, welche sich die Analyse sogenannter unmittelbar exprimierter Gene (*immediate-early genes*, IEGs) zu Nutze machten. Da diese Methode auch in dieser Doktorarbeit eine zentrale Rolle spielt, soll sie in den nächsten Kapiteln näher vorgestellt werden sowie ein kurzer Überblick über die bisher hiermit gewonnen Erkenntnisse vermittelt werden.

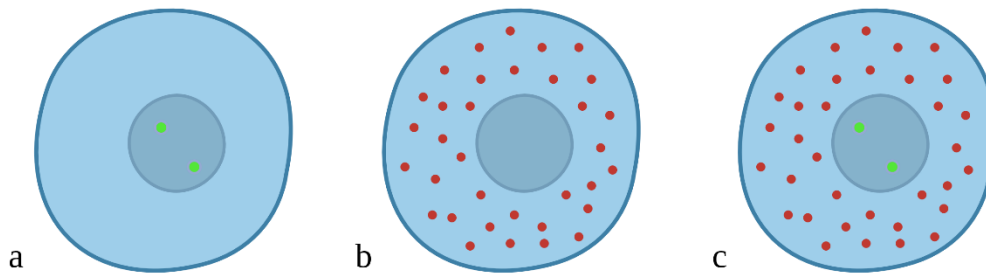
#### **1.2.6.1 Was sind IEGs?**

IEGs sind Gene, welche im Rahmen der Aktivität von Zellen, wie neuronaler Aktivität, transkribiert werden. Sie können in zwei verschiedene Klassen eingeteilt werden. Einerseits gibt es IEGs, welche „regulatorische Transkriptionsfaktoren“ (*regulatory transcription factors*, RTFs) kodieren. Andererseits gibt es jene, die „Effektorproteine“ kodieren (Guzowski et al., 2001). Letztere sind Gene, welche Proteine kodieren, die vor allem direkte Auswirkungen auf die Zelle haben, in der sie transkribiert werden. Einer ihrer bekanntesten Vertreter in diesem Rahmen ist das Aktivitäts-regulierte Zytoskelett-assoziierte Protein (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*, Arc) (Bramham et al., 2008). Die zuerst

genannte Klasse an IEGs kodiert RTFs, welche meist die Transkription weiterer Gene beeinflussen und daher eine indirekte Auswirkung auf die Zelle haben (Guzowski et al., 2001). Wichtige Vertreter dieser Klasse sind c-Fos und zif268/egr-1. Alle drei genannten IEGs (Arc, c-Fos, zif268/egr-1) sind Gene, bei welchen nachgewiesen werden konnte, dass sie an der Gedächtniskonsolidierung beteiligt sind. So wurde gezeigt, dass ihre Suppression oder ein Knockout dieser Gene eine Gedächtniskonsolidierung verhindert, beziehungsweise deutlich einschränkt (Grimm et al., 1997, Guzowski et al., 2000, Jones et al., 2001). Durch die Möglichkeit ihrer Detektion konnte auch ihre Expression bei Lern-assoziierten Situationen nachgewiesen werden, womit schließlich ganze Neuronensembles visualisiert werden konnten (Duclot und Kabbaj, 2017, Guzowski et al., 1999). Das IEG zif268/egr-1 spielt im Rahmen dieser Doktorarbeit eine wichtige Rolle, da seine Transkription zur Detektion der Zellaktivität im DG und im CA3 verwendet wurde.

#### **1.2.6.2 Die Methode der catFISH**

Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) konnte nachgewiesen werden, dass die Ausprägung der Expression von IEGs wie Arc oder zif268/egr-1 einen gewissen Verlauf im Rahmen neuronaler Zellaktivität besitzt. Bei beiden wurde beobachtet, dass bei einer Zellaktivität innerhalb der letzten fünf bis zwanzig Minuten die mRNA der IEGs im Nukleus der aktivierten Zelle detektiert werden kann, wo das IEG entsprechend transkribiert wurde (Abbildung 7). Bei einer neuronalen Aktivität vor mehr als 30 Minuten, wird diese jedoch im zytoplasmatischen Kompartiment nachgewiesen, wo zif268/egr-1 beispielsweise auch 60 Minuten nach neuronaler Aktivität noch vorhanden ist (Guzowski et al., 1999). Diese Kompartiment-abhängige Lokalisation beruht auf dem Export von mRNA aus dem Zellkern ins umgebende Zytoplasma, wo die anschließende Translation an den Ribosomen stattfindet (Horn, 2018, S. 290ff). Anhand dieser zeitlich abhängigen Lokalisation der mRNA kann somit unterschieden werden, in welchem Zeitintervall vor dem Tod einer Maus noch eine neuronale Aktivität stattgefunden hat. Aus diesem Grund wurde die Methode auch als zelluläre Kompartimentanalyse der zeitlichen Aktivität mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (*cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescent in-situ hybridisation*, catFISH) bezeichnet.



**Abbildung 7 Lokalisation von IEGs bei der catFISH**

Schematische Darstellung von Zellsomata mit Zellkern (dunkelblau) und Zytoplasma (hellblau). (a) Wurde ein Neuron in den letzten 5 – 20 Minuten aktiviert, so wurde im Zellkern die Transkription von unmittelbar exprimierten Genen (engl. immediate early-gene; IEG) eingeleitet. Die synthetisierte prä-mRNA inklusive Introns und die mRNA können mittels FISH im Nukleus nachgewiesen werden, was hier durch die grünen Signale (grüne Punkte) gezeigt ist. (b) Wurde eine Zelle vor etwas mehr als 30 Minuten aktiviert, so wurde die transkribierte mRNA bereits aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert, wo sie mittels FISH detektiert werden kann. Die zytoplasmatischen Signale sind hier als rote Punkte dargestellt. (c) Wurde eine Zelle sowohl vor etwas mehr als 30 Minuten als auch in den letzten 5 – 20 Minuten aktiviert, so ist die mRNA in beiden Kompartimenten der Zelle vorhanden. Die mittels FISH detektierbaren Signale sind exemplarisch als grüne Punkte im Nukleus sowie als rote Punkte im Zytoplasma gezeigt. (erstellt mit BioRender.com)

### 1.2.6.3 Rekrutierung von Neuronensembles im DG

Der DG wurde mittels IEG-Bildgebung und weiter auch mittels catFISH bisher in unterschiedlicher Herangehensweise und in unterschiedlichen Situationen untersucht. Es wurden sowohl Experimente durchgeführt, in denen betrachtet wurde, wie viele Neurone in einzelnen Subregionen aktiviert werden, wenn Tiere in gleiche und differente Umgebungen gesetzt werden (Chawla et al., 2005). Auch wurde aber untersucht, wie die neuronale Aktivität im DG verteilt ist, wenn Ratten verschiedene Aufgabenstellungen erfüllen sollen, statt bestimmte Bereiche ausschließlich zu erkunden (Satvat et al., 2011). Hierbei wurde initial häufig das IEG Arc verwendet, da schon früh herausgefunden wurde, dass es bei neuronaler Aktivität im Rahmen der Gedächtniskonsolidierung transkribiert wird und gut mit elektrophysiologischen Ergebnissen übereinstimmt (Minatohara et al., 2015, Kubik et al., 2007). Seine Aussagekraft in Bezug auf die zeitlich zuzuordnende neuronale Aktivität, welche durch die catFISH nachgewiesen werden sollte, wurde für den DG mit weiteren Studien jedoch deutlich eingeschränkt. Hier wurde registriert, dass Arc eine prolongierte Transkription im Zellkern von Körnerzellen des DG aufweist (Chawla et al., 2005, Maple et al., 2017, Ramirez-Amaya et al., 2013). Entsprechend konnte in Studien, in welchen Arc genutzt wurde und in denen zwei aufeinanderfolgende Situationen mittels catFISH beurteilt werden sollten, nicht mehr differenziert werden, ob die nukleäre Expression von Arc nun durch die erste oder zweite Situation hervorgerufen wurde. Gezeigt wurde letztendlich, dass

die Transkription von Arc sogar bis zu acht Stunden andauern kann (Ramirez-Amaya et al., 2013). Neben Arc wurden einzelne Experimente auch mit dem oben bereits genannten IEG *zif268/egr-1* durchgeführt (Grella et al., 2019, Satvat et al., 2011). *Zif268/egr-1* zeigt sehr ähnliche Eigenschaften wie Arc, wohingegen bei *zif268/egr-1* keine prolongierte Transkription besteht und damit eine präzisere zeitliche Differenzierung der Zellaktivierungen möglich ist (Guzowski et al., 2001). Derartige Ähnlichkeiten zwischen beiden IEGs sind möglicherweise auch dadurch zu erklären, dass Arc ein Ziel des RTFs *zif268/egr-1* ist und letzteres die Transkription von Arc hochreguliert (Li et al., 2005).

Einige Studienergebnisse sind trotz der Anwendung von Arc im DG jedoch durchaus verwertbar und lassen darauf schließen, dass die elektrophysiologisch beschriebenen Ortszellen auch mittels catFISH identifiziert werden können (Chawla et al., 2005). In der aufgeführten Studie wurde nur der spDG betrachtet. Dort konnte gezeigt werden, dass in demselben Kontext meist die gleiche Zahl an Zellen rekrutiert wird. Es spielt dabei keine Rolle, ob die Versuchstiere den Kontext bereits kannten oder nicht. War er ihnen vertraut, wurden genauso viele Neurone aktiviert, wie es bei solchen Versuchstieren der Fall war, die den Kontext noch nicht kannten. Dies stimmt auch mit den Ergebnissen anderer Studien überein, in denen beobachtet werden konnte, dass die Menge an Zellen, welche in einer Umgebung aktiviert wird, mehr von dessen Größe abhängt als von dessen Neuheit (Nakamura et al., 2010). Neben diesen Ergebnissen wurde ebenfalls beschrieben, dass bei der Erkundung zweier verschiedener Umgebungen auch unterschiedliche Neuronensembles im spDG aktiviert werden, was nicht der Fall ist, wenn nur eine Umgebung wiederholt erforscht wird. Dies sind Ergebnisse, die deutlich auf den Prozess der Musterdifferenzierung schließen lassen, welche im ipDG im Gegensatz hierzu nicht beobachtet werden konnte. So wurde hier eine relative funktionale Differenzen zwischen dem spDG und dem ipDG vermutet, auch wenn beide Schenkel ähnliche Projektionen aus dem MEC und dem LEC erhalten (Chawla et al., 2005). Fasst man die Studienlage zusammen, wie es Meyer & Radulovic (2021) getan haben, so sprechen sowohl die stärkere Innervation des spDG als auch elektrophysiologische und IEG-Studien dafür, dass dieser im dorsalen Hippocampus mehr in den Prozess der Musterdifferenzierung involviert ist und stärker an Verhaltens-beeinflussenden Prozessen teilnimmt als der ipDG. Eine eindeutige Differenzierung ihrer funktionalen Zuordnung konnte allerdings noch nicht erfolgen, weshalb noch weitere Studien notwendig sind, die Einbindungen des spDG und des ipDG in funktionelle Abläufe zu charakterisieren. Es steht jedoch fest, dass der DG als Ganzes stärker an der Musterdifferenzierung beteiligt ist, als es wiederum das CA3 und CA1 sind (Lee et al., 2020).

#### **1.2.6.4 Rekrutierung von Neuronensembles im CA3**

Die Zuordnung von Aufgaben im Rahmen der Gedächtnisbildung beziehungsweise die Zuschreibung einer funktionellen Heterogenität zum CA3 hat in den letzten Jahrzehnten mehrere Wandel erlebt. In den anfänglichen Theorien ging man von einer Zuordnung der Musterdifferenzierung zum DG und von einer Musterkomplettierung zum CA3 aus (Marr, 1971, Treves und Rolls, 1994). Bereits in frühen Studien zur IEG-Bildgebung und der catFISH fand man allerdings Hinweise, dass eine Heterogenität entlang der transversalen Achse des CA3 und CA1 (vom DG in Richtung des CA1) besteht (Vazdarjanova und Guzowski, 2004). Auch Marrone et al. (2014) fanden eine stärkere Differenz der aktivierten Neuronensembles innerhalb des CA3c als im CA3b und CA3a, wenn Versuchstiere in unterschiedliche Kontexte platziert wurden, was somit einer Musterdifferenzierung durch das CA3c entsprach. Demnach wurde passend zu anatomischen und elektrophysiologischen Studien eine Kooperation zwischen dem proximalen CA3 und dem DG bei der Musterdifferenzierung vermutet sowie von einer anderweitigen Aufgabe des distalen CA3 (Goodsmith et al., 2019). In einer Kontrollgruppe der Studie von Grella et al. (2019) wurde hingegen gezeigt, dass auch CA3b und a an der Musterdifferenzierung beteiligt sind und hier neue Neuronensembles aktiviert werden, wenn Versuchstiere in zwei verschiedene Kontexte gesetzt wurden, auch wenn der Mechanismus der Musterdifferenzierung im DG, CA3c und im CA1 durch Clonidin verhindert wurde. Gleichzeitig waren in beiden Kontexten signifikant mehr aktivierte Zellen zu detektieren, wenn sie wiederholt dem gleichen Kontext ausgesetzt waren. Hier scheint es somit unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der funktionellen Aufteilung des CA3 zu geben.

In wieder anderen Studien der letzten Jahre wurde gezeigt, dass man weiterhin zwischen den verschiedenen Informationsanteilen unterscheiden muss, wie zum Beispiel zwischen räumlichen und zeitlichen Informationen, welche sich häufig auch zu überlagern scheinen. So ist eine Meinung, dass die Verarbeitung zeitlicher Informationen mehr auf das proximale CA3 und das distale CA1 zurückzuführen wäre, während jene von räumlichen Informationen in einem Subnetzwerk aus distalem CA3 und proximalem CA1 stattfinden würde (Flasbeck et al., 2018). Laut Beer et al. (2018) sind hingegen das gesamte CA3 und das proximale CA1 an der Verarbeitung räumlicher Informationen beteiligt und das distale CA1 diene eher der Prozessierung zeitlicher Informationen. Auch diese Ergebnisse tragen damit zu einer fehlenden eindeutigen Zuordnung funktioneller Prozesse zu den einzelnen Subregionen des CA3 bei.

### **1.2.7 Aktueller Stand zur Abgrenzung zwischen Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung**

Betrachten wir die Erkenntnisse aus den vorangegangenen Kapiteln, so kann zusammengefasst werden, dass der DG grundsätzlich für den Prozess der Musterdifferenzierung zuständig ist und beim CA3 weiterhin noch unklar ist, welche Subregionen für eine Musterdifferenzierung oder Musterkomplettierung bei verschiedenen Informationsqualitäten zuständig sind.

Beim DG ist der Konsens vieler Studien, dass der DG für die Musterdifferenzierung zuständig ist und diese in jeder Situation durchführt. Die dorsalen Anteile sind hierbei mehr an der Verarbeitung räumlicher Informationen beteiligt als es die ventralen sind. Dennoch ist noch immer nicht vollständig geklärt, welche Anteile der spDG und der ipDG bei der Verarbeitung der verschiedenen Informationsqualitäten im Rahmen des Prozesses der Musterdifferenzierung haben. Bis dato wird dem spDG jedoch eine größere Relevanz bei dieser Aufgabe zugesprochen (Kesner, 2018).

Wie im vorherigen Kapitel angemerkt, ist die Situation für das CA3 noch nicht in dem Maß geklärt, wie es für den DG der Fall ist. Aufgrund der anatomischen Besonderheit, dass die Neurone des CA3c rekurrente Verbindungen zu Körnerzellen des DG haben, ebenso wie exzitatorische und inhibitorische Verbindungen zu diesen über Mossyzellen und weitere Interneurone, ist es wahrscheinlich, dass das CA3c zusammen mit dem DG für den Prozess der Musterdifferenzierung zuständig ist (Goodsmith et al., 2019). Unterstützt wird diese Ansicht ebenfalls durch elektrophysiologische Studien sowie jene, in denen IEG-Bildgebung verwendet wurde (Lee et al., 2015, Marrone et al., 2014). Für das CA3a und das CA3b lassen sich hingegen teils widersprüchliche Ergebnisse finden, für welche sich nicht einheitlich formulieren lässt, dass sie eindeutig für eine Musterdifferenzierung oder eine Musterkomplettierung zuständig wären. Fasst man die Ergebnisse einiger Studien zusammen, in denen der Einfluss durch Veränderungen von lokalen und globalen Hinweisen in sogenannter Doppelrotationsstudien in unterschiedlichem Ausmaß untersucht wurde, so lässt sich für räumliche Aspekte ein Konzept erstellen, mittels dessen sich einige der widersprüchlichen Ergebnisse erklären lassen (Knierim und Neunuebel, 2016). Laut diesem Konzept führt der DG unabhängig von der Ähnlichkeit zweier Umgebungen immer eine Musterdifferenzierung durch. Dieselbe Umgebung wird hierbei weitgehend durch dieselbe Neuronenpopulation repräsentiert, welche auch bei einer ersten Erkundung dieser aktiv gewesen ist. Werden die Unterschiede zwischen zwei Umgebungen größer, so wird die

Überlappung der zwei in diesen Situationen aktivierten Neuronensembles kleiner, auch wenn die Unterschiede nur gering sind. Werden zwei vollkommen verschiedene Umgebungen erkundet, so werden hingegen auch zwei voneinander unabhängige Neuronensembles im DG aktiviert. Die hier beschriebenen Repräsentationen werden nun an das CA3 weitergeleitet und hier unterschiedlich verarbeitet. Diese Stelle im Prozess der Informationsverarbeitung stellt dabei den besonderen Aspekt dieses Konzeptes dar. Basierend auf der Annahme, dass das CA3 sowohl eine Musterdifferenzierung als auch eine Musterkomplettierung durchführen kann, wird je nach Qualität der Eingänge aus dem DG entschieden, welcher der beiden Prozesse durchgeführt wird. Ist die Überlappung der im DG aktivierten Neuronensembles groß und die Umgebungen ähneln sich entsprechend stark, so wird der Prozess der Musterkomplettierung durchgeführt und im CA3 erfolgt eine Reaktivierung der im ersten Kontext aktivierten Neurone. Entsprechend kann dieser Prozess als Reaktivierung einer Erinnerung interpretiert werden. Dieser Prozess wird für eine gewisse Spanne der starken Überlappung der Neuronenpopulationen im DG durchgeführt. Wird die Überlappung jedoch deutlich geringer, so setzt auch im CA3 schnell der Prozess einer starken Musterdifferenzierung ein und es werden zunehmend verschiedene Neuronenpopulationen rekrutiert. Interpretiert bedeutet dies, dass die Umgebung vom CA3 als neu empfunden wird und somit keine Erinnerungen an eine Umgebung, welche zuvor besucht wurde, abgerufen werden.

Entgegen der verbreiteten Ansicht, dass der DG mittels Musterdifferenzierung nur bei der Speicherung von Informationen beziehungsweise bei der Implementierung von Erinnerungen benötigt wird, wird hier postuliert, dass der DG in jeder Situation eine Musterdifferenzierung durchführt (Knierim und Neunuebel, 2016). Erst im Anschluss wird im CA3 über eine Speicherung der Informationen oder über ein Wiederabrufen von Erinnerungen entschieden. Hierdurch ist auch das CA3 in jeder Situation an der Verarbeitung der Informationen beteiligt und kann seine Funktion an die Qualität seiner Eingänge anpassen.

In diesem Zusammenhang wurde eine weitere Besonderheit festgestellt. Diese besteht darin, dass das CA3 primär durch die lokalen Hinweise in der Umgebung kontrolliert wird (Knierim und Neunuebel, 2016). Nur ein kleiner Anteil der Zellen im CA3 hat sich in den Doppelrotationsexperimenten von den globalen Hinweisen beeinflussen lassen, wohingegen bei den meisten Neuronen eine Reaktion auf die Veränderung der lokalen Hinweise zu beobachten war. Hierzu besteht die Theorie, dass lokale Hinweise im CA3 und globale Hinweise über direkte Verbindungen vom MEC zum CA1 verarbeitet werden. In diesem



werden schließlich die Informationen von lokalen und globalen Hinweisen gleichermaßen miteinbezogen und verarbeitet.

Dieses Konzept fasst die Ergebnisse zahlreicher, hier anteilig aufgeführter Studien am besten zusammen und lässt die teils widersprüchlichen Ergebnisse einiger Studien durch die variable Funktion des CA3 in einer gemeinsamen Theorie aufgehen. Entsprechend wird diese Hypothese für die spätere Diskussion der Ergebnisse dieser Doktorarbeit als Grundlage angenommen.

### 1.3 Zielsetzung der Doktorarbeit

Die Prozesse der Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung spielen sowohl in der Gedächtniskonsolidierung als auch beim Abrufen bereits erlernter Gedächtnisinhalte eine zentrale Rolle. Mittels unterschiedlicher Methoden wurde versucht, die Beteiligung der verschiedenen Subregionen der Hippocampusformation an beiden Prozessen aufzuklären. Den bisherigen Studien mangelte es jedoch an einer einheitlichen Untersuchung der verschiedenen Hirnareale sowie der gleichzeitig nötigen hohen Auflösung der Zellaktivität auf Populationsebene mit Differenzierung in ihre anatomisch unterschiedlichen Abschnitte.

In dieser Arbeit sollte die Zellaktivität innerhalb des DG und des CA3 mittels der catFISH unter Verwendung des IEGs *zig268/egr-1* auf Populationsebene untersucht werden, wenn Mäuse wiederholt denselben Kontext oder zwei voneinander verschiedene Umgebungen erkunden. Hierbei lag der Fokus auf den dorsalen Anteilen dieser Gebiete, welchen die Verarbeitung räumlicher Informationen zugeschrieben wird. Kernpunkte der Arbeit bestanden dabei in der einheitlichen Verwendung des gleichen IEGs sowohl für den DG als auch für das CA3, um eine Vergleichbarkeit der Zellaktivität beider Regionen zu erreichen, ebenso wie in der anatomisch hohen Auflösung. Letztere bestand in der Differenzierung der Zellaktivität zwischen dem spDG und dem ipDG sowie zwischen den Subregionen des CA3c, CA3b und CA3a, welche eine funktionelle Charakterisierung der einzelnen Bereiche ermöglichen sollte. Weitere Fragestellungen waren außerdem:

- Gibt es zwischen den Hippocampusformationen beider Hemisphären Unterschiede in der neuronalen Aktivität sowie in der Beteiligung an den Prozessen der Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung?
- Gibt es innerhalb des dorsalen DG und CA3 Unterschiede in der neuronalen Aktivität sowie der funktionellen Zuordnung zwischen rostralen und kaudalen Anteilen der jeweiligen Region?

## 2 Material und Methoden

Im Folgenden werden die für diese Arbeit verwendeten Materialien aufgelistet, sowie die Versuchstiere genauer charakterisiert. Im Anschluss hieran erfolgt die detaillierte Beschreibung der einzelnen Versuchsabschnitte sowie der Datenerhebung und -auswertung.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Großgerät	Hersteller
<b>Autoklav</b>	Matachana Group; Barcelona; ES
<b>Axio Imager 2 mit ApoTome.2</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Oberkochen; D
<b>Gefrierschrank (-80°C) (U570 Premium)</b>	New Brunswick Scientific™; Eppendorf; D
<b>Gefrierschrank (-20°C)</b>	Liebherr; Ochsenhausen; D
<b>Hybridisierungsinkubator</b>	Techne/Cole-Parmer, Staffordshire; UK
<b>Inkubationskammer/Wärmeschrank</b>	Memmert GmbH + Co. KG; Schwabach; D
<b>Sicherheitswerkbank</b>	Waldner Holding SE & Co. KG; Wangen; D
<b>Kryostat Leica CM3050 S</b>	Leica Biosystems Nussloch GmbH; Nussloch; D
<b>Kühlschrank (+4°C)</b>	Liebherr; Ochsenhausen; D
<b>Laborspülmaschine</b>	Miele & Cie. KG; Gütersloh; D
<b>Milli-Q® Reinstwassersystem (arium® pro)</b>	Sartorius AG, Goettingen; D
<b>Sterilisator</b>	Memmert GmbH + Co. KG; Schwabach; D
<b>Trockeneismaschine</b>	Scotsman Ice; Vernon Hills; IL

**Tabelle 1 Großgeräte**

Verwendete Großgeräte mit Angabe der Gerätebezeichnung und des Herstellers

Kleingerät	Hersteller
<b>Guillotine</b>	World Precision Instruments Ltd.; Hitchin; Hertfordshire; UK
<b>Laborschüttler</b>	Edmund Bühler GmbH; Bodelshausen; D
<b>Laborwaage</b>	Erich Eydam KG; Kiel; D
<b>Labor-Heizblock</b>	Techne/Cole-Parmer, Staffordshire; UK
<b>Magnetrührer</b>	IKA®-Werke GmbH & CO. KG; Staufen; D

<b>Mikroskop (Nikon Eclipse E200)</b>	Nikon Europe BV; Amsterdam; NL
<b>pH-Meter/Temperatur-Sonde</b>	Hanna Instruments Deutschland GmbH; Vöhringen; D
<b>Wasserbad</b>	Grant Instruments Ltd.; Cambridge; UK

**Tabelle 2 Kleingeräte**

Verwendete Kleingeräte mit Angabe der Gerätebezeichnung und des Herstellers

## 2.1.2 Laborausstattung und Gefäße

<b>Laborausstattung/Gefäß</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Archivierkasten</b>	Alfred Behr Laboratoriums- & Industriebedarf; Hamburg; D
<b>Archivierkasten/Microscope Slide Box</b>	HEATHROW SCIENTIFIC; Vernon Hills; USA
<b>Becherglas (50 ml; 100 ml; 200 ml; 500 ml; 1 l; 2 l)</b>	DURAN®; Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Laborflasche aus Glas (100 ml; 200 ml; 500 ml; 1 l; 2 l)</b>	Fisherbrand®; Fisher Scientific GmbH; Schwerte; D
<b>Magnetrührstäbchen</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Messzylinder (100 ml; 200 ml; 500 ml; 1000 ml)</b>	Fisherbrand®; Fisher Scientific GmbH; Schwerte; D
<b>Objektträger-Küvette nach Hellendahl mit Deckel</b>	Brand, Wertheim; D
<b>Objektträgermappe</b>	Leica Biosystems Nussloch GmbH; Nussloch; D
<b>Pipette (Reference® 2) (0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 2-20 µl; 10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl)</b>	Eppendorf SE; Hamburg; D
<b>Pipettierhilfe (S1)</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Präparierbesteck</b>	Leica Biosystems Nussloch GmbH; Nussloch; D
<b>Spatel</b>	Bochem Instrumente GmbH; Weilburg; D
<b>Stoppuhr</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D

**Tabelle 3 Laborausstattung und Gefäße**

Laborausstattung und Gefäße mit Angabe des Herstellers

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth; Karlsruhe; D
Deckgläser (24 x 60 mm)	Carl Roth; Karlsruhe; D
SafeSeal Gefäß (0,5 ml; 1,5 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG; Nuembrecht; D
Laborhandschuhe (Rotiprotect Nitril green)	Carl Roth; Karlsruhe; D
Mikrotomklingen (C35)	FEATHER® Safety Razor Co. Ltd.; Osaka; J
Objektträger (Menzel-Gläser Polysine®)	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG; Braunschweig; D
PAP-Pen	Sigma-Aldrich; München; D
Parafilm M	Brand, Wertheim; D
Peel-A-Way® Embedding Mold; Truncated (T12)	Polysciences, Inc.; Warrington; USA
Pipettenspitzen Biosphere® (20 µl; 200 µl; 1000 µl)	SARSTEDT AG & Co. KG; Nuembrecht; D
Schraubenröhren (15 ml; 50 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG; Nuembrecht; D
Serologische Pipette (5 ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG; Nuembrecht; D
Sterilisations-Klebeband	A. Hartenstein GmbH; Würzburg; D
Transferpipette (3,5 ml)	SARSTEDT AG & Co. KG; Nuembrecht; D
Wägebapier	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG; Düren; D

**Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien**

Verwendetes Verbrauchsmaterial mit Angabe des Herstellers

### 2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
Blockierungsreagenz	Roche; Mannheim; D
Borsäure	Carl Roth; Karlsruhe; D
Chlorwasserstoff	Carl Roth; Karlsruhe; D
Diamidin-2-phenylindol-Lösung (DAPI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

<b>Denhardt's Solution</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<b>Diethylpyrocarbonat (DEPC)</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Dinatriumhydrogenphosphat</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Essigsäureanhydrid</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Ethanol (rein)</b>	Walter-CMP GmbH & Co. KG; Kiel; D
<b>Formalin (37%)</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Formamid, ≥ 98%, reinst</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Glycin</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Kaliumchlorid</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Leica tissue freezing medium™</b>	Leica Biosystems Nussloch GmbH; Nussloch; D
<b>Mowiol</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Natriumchlorid</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Natriumcitrat</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Natriumdihydrogenphosphat</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Natriumhydroxid</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Normales Ziegenserum (normal goat serum; NGS)</b>	Capricorn Scientific GmbH; Ebsdorfergrund; D
<b>Salmon Sperm DNA</b>	Sigma-Aldrich; München; D
<b>Triethylamin (TEA)</b>	Sigma-Aldrich; München; D
<b>Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D
<b>Tween® 20</b>	Sigma-Aldrich; München; D
<b>Vanillin</b>	Sigma-Aldrich; München; D
<b>Wasserstoffperoxid</b>	Carl Roth; Karlsruhe; D

**Tabelle 5 Chemikalien und Reagenzien**

Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Angabe des Herstellers

## 2.1.5 Lösungen

<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Acetylierungspuffer</b>	2,4 ml TEA (50%) 250 µl Essigsäureanhydrid 100 ml Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Blockpuffer</b>	2 g Blockierungsreagenz-Pulver 500 µl Tween® 20 (20%) 20 ml NGS 180 ml TBS (0.1 M) (Lagerung bei -20°C)

<b>Boratpuffer (1x)</b>	Borsäure (61,83 g/mol) 31 g Natriumhydroxid (10 M) bis pH 8,5 ad 500 ml mit Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Ethanol (95%)</b>	190 ml Ethanol (100%) 10 ml Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Ethanol (75%)</b>	150 ml Ethanol (100%) 50 ml Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Ethanol (70%)</b>	140 ml Ethanol (100%) 60 ml Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Formalinlösung (4%)</b>	11 ml Formalin (37%) 50 ml Phosphatpuffer (0,2 M) ad 100 ml mit Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Formamid-SSC-Lösung</b>	75 ml SSC (20x) 150 ml Formamid ad 300 ml mit Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Hybridisierungslösung</b>	25 ml Formamid 12,5 ml SSC (20x) 5 ml Denhardt's Solution (50x) 2,5 ml Salmon Sperm DNA 20 µl DEPC 250 µl Tween® 20 (20%) 4730 µl Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Kochsalzlösung (NaCl) (4 M)</b>	117 g NaCl ad 500 ml mit Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Kochsalznatriumcitratlösung (SSC) (20x)</b>	88,2 g Natriumcitrat 175,2 g Natriumchlorid pH 7,0 mit Chlorwasserstoff ad 1000 ml mit Milli-Q® H <sub>2</sub> O 1 ml DEPC (anschließend autoklavieren)
<b>Kochsalznatriumcitrat-Tween®-Lösung (SSC-T) (5x)</b>	250 ml SSC (20x) 2,5 ml Tween® 20 (20%) ad 1000 ml mit Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Kochsalznatriumcitrat-Tween®-Lösung (SSC-T) (0,1x)</b>	10 ml SSC (20x) 5 ml Tween® 20 (20%) ad 2000 ml mit Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Mowiol-DAPI-Lösung</b>	1 ml Mowiol 1,5 µl DAPI
<b>Natriumhydroxid (NaOH) (10 M)</b>	40 g Natriumhydroxid 100 ml Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (10x)</b>	80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid 14,4 g Natriumdihydrogenphosphat 2,4 g Kaliumdihydrogenphosphat 1000 ml Milli-Q® H <sub>2</sub> O pH 7,4

<b>PBS (1x)</b>	100 ml PBS (10x) 900 ml Milli-Q® H <sub>2</sub> O 1 ml DEPC (anschließend autoklavieren)
<b>Phosphatpuffer (0,2 M)</b>	5,24 g Natriumdihydrogenphosphat 58,02 g Dinatriumhydrogenphosphat ad 1000 ml mit Milli-Q® H <sub>2</sub> O pH 7,4 1 ml DEPC (anschließend autoklavieren)
<b>Quench-Lösung</b>	7,5 g Glycin 5 ml Tween® 20 (20%) ad 1000 ml mit Milli-Q® H <sub>2</sub> O pH 2,0 mit Chlorwasserstoff
<b>Triethylamin (TEA) (50%)</b>	5 ml Triethylamin 5 ml Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) (1 M)</b>	121 g Tris 88 g Natriumchlorid ad 1000 ml mit Milli-Q® H <sub>2</sub> O pH 7,5 mit Chlorwasserstoff (anschließend autoklavieren)
<b>TBS (0,1 M)</b>	100 ml TBS 1 M 900 ml Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>TBS-Tween® (TBS-T) (0,1 M)</b>	200 ml TBS 1 M 5 ml Tween® 20 (20%) ad 2000 ml mit Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Tween® 20 (20%)</b>	10 ml Tween® 20 40 ml Milli-Q® H <sub>2</sub> O
<b>Tyramid-Amplifikationslösung</b>	6 ml Boratpuffer (1x) 15 ml Natriumchloridlösung (4 M) 300 µl Wasserstoffperoxid (0,3%) 30 µl Vanillin (450 mg/ml) 9 ml Milli-Q® H <sub>2</sub> O

**Tabelle 6 Lösungen**

Verwendete Lösungen mit Angabe der Zusammensetzung für exemplarische Mengen im Rahmen der durchgeführten Experimente

## 2.1.6 Nukleinsäuren, Antikörper und Tyramide

Im Rahmen der FISH wurden Sonden für verschiedene Abschnitte des IEG zif268/egr-1 genutzt. Hierbei wurde zwischen zwei Sonden unterschieden. Die erste Sonde, im Folgenden als zif268 bezeichnet, stellte eine zur gesamten Länge des kodierenden Bereichs des Gens komplementäre Sonde von 3072 Basenpaaren dar, welche sich entsprechend an die mRNA des IEG hybridisieren lässt (Schmill et al., 2023). Sie entsprach damit solchen Sonden,



welche auch in vorherigen Studien bereits zum Einsatz gekommen waren (Gheidi et al., 2013, Marrone et al., 2011, Satvat et al., 2011). Bezogen auf die catFISH (Kapitel 1.2.6.2) sollte die mRNA mittels dieser Sonde in den ersten Minuten nach Zellaktivierung nukleär sowie nach einer Zeit von 30 Minuten im Zytoplasma nachgewiesen werden können. Die zweite hier verwendete Sonde, welche im Folgenden als egr-1 bezeichnet wird, stellte eine zum zweiten Intron komplementäre Sonde von 675 Basenpaaren dar, welche sich dementsprechend nur mit dem Intron der prä-mRNA hybridisieren lässt (Schmill et al., 2023). Da Introns nur in der prä-mRNA vorhanden sind und nur die gespleißte mRNA den Nukleus verlassen kann, können über diese Sonde detektierte Transkripte nur nukleär und nur innerhalb der ersten Minuten nach Zellaktivierung nachgewiesen werden (Horn, 2018, S. 290ff). Sie diente damit der zusätzlichen Kontrolle der Transkription des IEGs und damit der Zellaktivität innerhalb der letzten fünf bis zehn Minuten im Leben einer Maus. Aufgrund der Detektion der mRNA durch zif268 und der prä-mRNA durch egr-1 standen beide Sonden somit nicht im Konflikt und eine gegenseitige Beeinflussung ihrer Hybridisierung mit den unterschiedlichen Abschnitten der prä-mRNA war damit nicht zu erwarten. Die Sonden wurden von Frau Dr. rer. nat. Kira Balueva aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Peer Wulff des Physiologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel synthetisiert, auf ihre Funktionsfähigkeit geprüft und für diese Doktorarbeit zur Verfügung gestellt. Bei der Synthese der Sonden wurde mittels der aufgeführten Markierungsmixe an zif268 Fluoreszein-12-Uridintriphosphat angeheftet. Bei egr-1 wurde entsprechend Digoxigenin-11-Uridintriphosphat verwendet (Schmill et al., 2023).

Markierter Nukleinsäure-Mix	Katalognummer	Hersteller
<b>DIG RNA-Markierungsmix</b>	11277073910	Roche; Mannheim; D
<b>Fluoreszein Markierungsmix</b>	11685619910	Roche; Mannheim; D

**Tabelle 7 Markierte Nukleinsäuren**

Verwendete Nukleinsäuren zur Synthetisierung von RNA-Sonden mit Angabe des Herstellers

Antigen	Donor	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
<b>Digoxigenin</b>	Schaf	1:500	11207733910	Roche; Mannheim; D
<b>Fluoreszein</b>	Schaf	1:500	11426346910	Roche; Mannheim; D

**Tabelle 8 Antikörper**

Verwendete Antikörper mit Spezifikation, Hersteller und Verdünnungsgrad in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung: Anti-Digoxigenin-Peroxidase (Anti-Dig-POD) in der ersten Zeile sowie Anti-Fluoreszein-Peroxidase (Anti-Fluor-POD) in der zweiten Zeile. Jeweils unter Verwendung einer Meerrettich-Peroxidase als Konjugat.

<b>Tyramid</b>	<b>Basisverbindung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Cyanin-3-Tyramid</b>	Cy3-mono-NHS-Ester	1:1000	PA13101	Sigma-Aldrich; München; D
<b>FITC-Tyramid</b>	Fluorescein-NHS-Ester	1:500	46100	Life Technologies; Carlsbad; USA

**Tabelle 9 Tyramide**

Verwendete Tyramide mit Angabe des Herstellers und des Verdünnungsgrades in der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

## 2.1.7 Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Adobe Illustrator CC 2019</b>	Adobe Systems Software Ireland Limited; Dublin; IRL
<b>Adobe Photoshop CC 2019</b>	Adobe Systems Software Ireland Limited; Dublin; IRL
<b>CellProfiler™</b>	Broad Institute; Havard; USA
<b>EthoVision XT</b>	Noldus; Wageningen; NL
<b>Fiji 1.0 ImageJ 1.51n</b>	Open Source; National Institute of Health; USA
<b>GraphPad Prism 9.0</b>	GraphPad Software; La Jolla; USA
<b>ImarisViewer 9.8.0</b>	Oxford Instruments plc; Tubney Woods; UK
<b>Microsoft Excel</b>	Microsoft Corporation; Redmond, USA
<b>Microsoft Word</b>	Microsoft Corporation; Redmond; USA
<b>Zen 2 (blue edition)</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Oberkochen; D

**Tabelle 10 Software**

Verwendete Software mit Angabe des Herstellers

## 2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 19 Mäuse des Stamms C57BL/6J (Janvier Labs; Le Genest-Saint-Isle; Frankreich) verwendet. Die Tiere wurden in einem Alter von 9 Wochen geliefert und im lokalen Tierhaus der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bis zu einem Alter von 17 Wochen aufgezogen. Anschließend erfolgte die Verlegung von einer gemeinsamen Haltung in separate Käfige, was einem Zeitraum von elf bis dreizehn Tagen vor Beginn des Experimentes entsprach. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem Temperatur- und Luftfeuchtigkeits-kontrolliertem Raum bei einem Zyklus von je zwölf Stunden für Licht und Dunkelheit mit einem täglichen Wechsel um 06:00 Uhr und 18:00 Uhr. Die Tiere hatten die gesamte Zeit über freien Zugang zu Wasser und erhielten täglich eine definierte Menge an Futter.

## **2.3 Methoden**

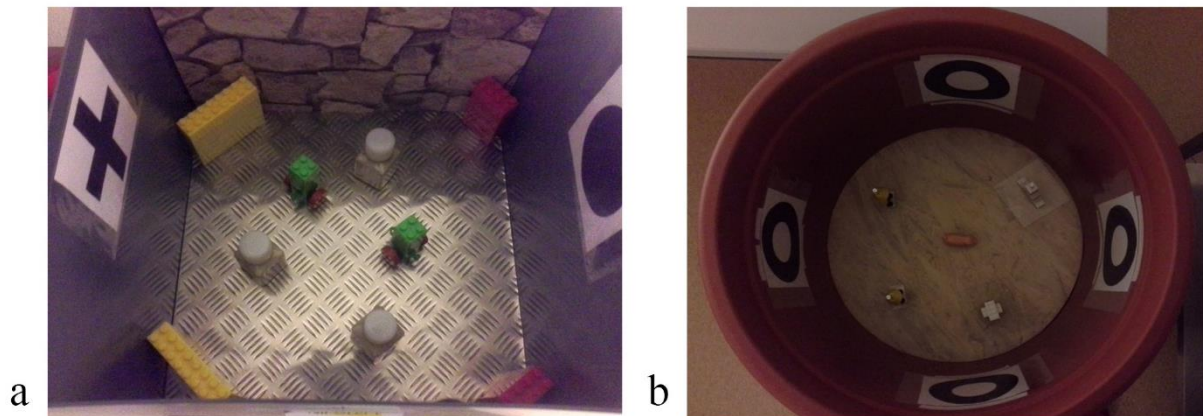
### **2.3.1 Versuchsaufbau zur Exposition der Versuchstiere**

#### **2.3.1.1 Aufbau der Kontexte**

Für die Exposition der Versuchstiere gegenüber zwei verschiedenen Umgebungen wurden zwei Kontexte in Eigenbau der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Peer Wulff des Physiologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel konzipiert (Abbildung 8). Kontext A bestand aus einer quadratischen, grauen Kunststoffbox mit einer Abmessung von 50 cm x 50 cm x 50 cm und einem metallischen Boden. Aufgrund der Beobachtung, dass Mäuse sich häufig in abgeschlossenen Ecken von Umgebungen aufhalten, wurden Türme aus Bauklötzen in die Ecken der Box gestellt, um diese für die Tiere unzugänglich zu konzipieren. Auf zwei gegenüberliegenden Seiten der Box befanden sich Poster mit Steinoptik. An den anderen zwei, sich gegenüberliegenden Seiten wurde jeweils ein Symbol als Orientierung für die Versuchstiere befestigt. Hierfür wurde auf der einen Seite ein schwarzes Kreuz auf weißem Untergrund verwendet. Auf der anderen Seite wurde ein schwarz ausgefüllter Kreis auf weißem Untergrund verwendet. Als Objekte, welche von den Versuchstieren erkundet werden sollten, dienten drei Flaschen, welche mit Sand gefüllt waren, sowie zwei Figuren der Firma Lego® (Lego Systems A/S; Billund; DK).

Kontext B bestand aus einem runden, roten Plastiktopf mit einem Durchmesser von 47 cm und einer Wandhöhe von 50 cm, in den eine passgenau zugeschnittene Grobspanplatte als Boden eingesetzt wurde. Hier dienten vier Symbole in Form eines schwarzen Rings auf weißem Grund als Orientierungssymbole, welche von oben betrachtet auf 3 Uhr, 6 Uhr, 9 Uhr und 12 Uhr an der Innenwand des Topfes befestigt waren (Abbildung 8b). Als Objekte wurden hier zwei verschiedene Figuren der Marke Playmobil® (geobra Brandstätter Stiftung und Co. KG; Zirndorf; D) verwendet, von denen eine doppelt aufgestellt wurde. Weiterhin wurden auch hier zwei, sich von denen in Kontext A unterscheidende, Figuren der Marke Lego® platziert.

In beiden Kontexten wurden alle Objekte gleichmäßig verteilt und auf dem Boden fixiert, um ein Umfallen zu verhindern. Zudem wurden die Objekte entsprechend der Voraussetzung ausgewählt, dass die Versuchstiere diese nicht erklettern konnten. Um die äußeren Bedingungen sowie die globalen Hinweise für die Tiere im Sinne des Raums konstant zu halten, wurde die Exposition der Tiere gegenüber den Kontexten im gleichen Raum mit gleicher Lokalisation der Kontexte im Raum durchgeführt.



**Abbildung 8 Aufbau der Kontexte**

(a) Foto des Kontextes A. (b) Foto des Kontextes B.

### 2.3.1.2 Gewöhnung der Versuchstiere

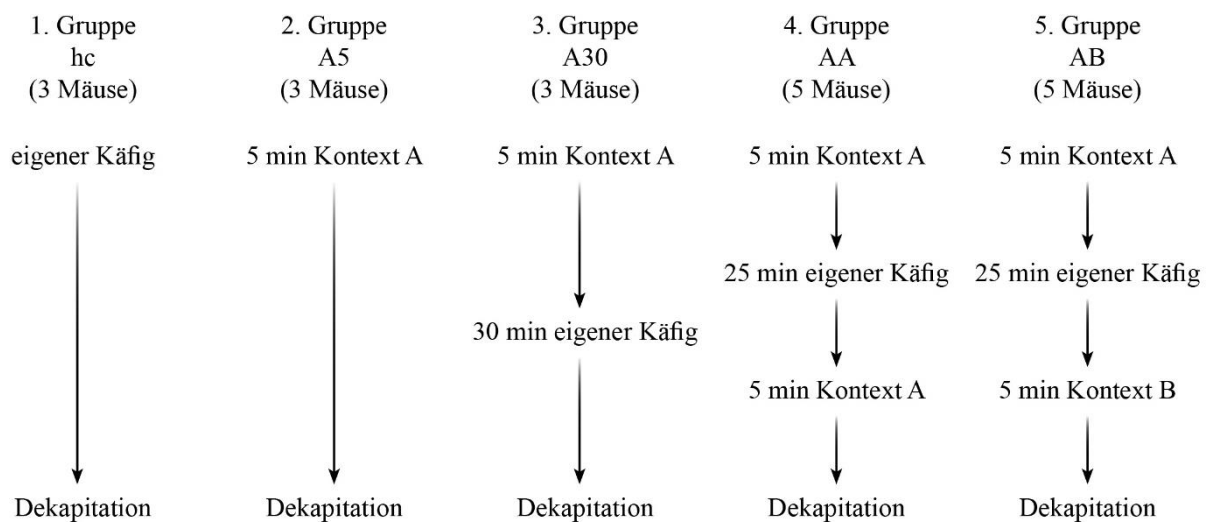
Um einen Einfluss der Handhabung der Mäuse während der Versuchsdurchführung zu minimieren, haben alle Versuchstiere eine Gewöhnungsphase erhalten. Hierfür erhielten sie in der Woche vor der Durchführung der Experimente über 5 Tage zweimal täglich ein Training zur Gewöhnung an den Transport. Dabei wurden die Mäuse im Experimentraum einzeln am Schwanz aus ihrem Käfig genommen, auf einen Handfeger als Transportmittel gesetzt, für fünf Minuten in einen größeren Käfig gesetzt, welcher ungefähr die Größe der Kontexte A und B besaß, und zurück in ihren Käfig gesetzt. Für die Gewöhnung an eine wiederholte Durchführung erfolgte dieser Ablauf zweimal pro Trainingseinheit mit einem Abstand von 25 min. Hierüber sollte gewährleistet werden, dass der Transport sowie die Handhabung der Mäuse keinen Einfluss auf die Wahrnehmung der Kontexte und die damit induzierten Erinnerungen ausüben konnte.

### 2.3.1.3 Versuchsgruppen

Die 19 verwendeten Tiere wurden für die Experimente in fünf verschiedene Gruppen aufgeteilt (Abbildung 9). Hierbei wurden drei Gruppen von jeweils drei Mäusen als Kontrollgruppen zur Kontrolle der Methode verwendet. Außerdem wurden zwei Gruppen von jeweils fünf Mäusen als Experimentgruppen genutzt. Alle Gruppen haben dafür zuvor die gleiche Gewöhnung erhalten.

Die Versuchstiere der ersten Gruppe, im Folgenden als Gruppe hc (*home cage*) bezeichnet, wurden keinem der Kontexte ausgesetzt und stattdessen am Tag des Experiments direkt nach Entnahme aus dem Käfig mittels einer Guillotine geköpft. Die Mäuse der zweiten Gruppe, im

Folgenden als Gruppe A5 bezeichnet, wurden nach Entnahme aus dem Käfig für fünf Minuten dem Kontext A ausgesetzt und direkt im Anschluss ebenso umgebracht. Die Mäuse der dritten und damit letzten Kontrollgruppe, im Folgenden als Gruppe A30 bezeichnet, wurden nach Entnahme aus dem Käfig für fünf Minuten dem Kontext A ausgesetzt, anschließend für 30 min erneut in den eigenen Käfig gesetzt und daraufhin dekapitiert. Die Versuchstiere der vierten Gruppe, im Folgenden als Gruppe AA bezeichnet, wurden nach Entnahme aus dem Käfig für fünf Minuten dem Kontext A ausgesetzt, für 25 min in den eigenen Käfig zurückgesetzt, danach erneut für fünf Minuten dem Kontext A ausgesetzt und direkt im Anschluss umgebracht. Die Mäuse der fünften und letzten Gruppe, im Folgenden als Gruppe AB bezeichnet, wurden nach Entnahme aus dem Käfig für fünf Minuten dem Kontext A ausgesetzt, ebenfalls für 25 min in den eigenen Käfig zurückgesetzt, darauffolgend für fünf Minuten in Kontext B gesetzt und im Anschluss hieran getötet.



**Abbildung 9 Versuchsgruppen**

Dargestellt ist die Aufteilung der Versuchstiere in drei Kontrollgruppen (1. bis 3. Gruppe; hc, A5, A30) sowie in zwei Experimentgruppen (4. und 5. Gruppe; AA, AB) mit Angabe der Anzahl an Mäusen pro Gruppe. Unterhalb der Gruppen ist jeweils der Versuchsablauf für jede der Gruppen aufgeführt. hc: home cage

### 2.3.1.4 Exposition der Versuchstiere

Für die Exposition der Versuchstiere wurden die Tiere jeder Gruppe erneut in zwei Gruppen aufgeteilt und an zwei verschiedenen Tagen für die Experimente herangezogen. Um die Bedingungen für beide Gruppen konstant zu halten, wurden die Experimente an beiden Tagen im gleichen Zeitraum durchgeführt. Weiterhin haben die Mäuse jeweils immer am Tag vor

dem Experiment eine Gewöhnung erhalten, um nochmals den Einfluss des Transportes auf das Erleben der Mäuse zu reduzieren.

Für das Verhindern eines Einflusses von Gerüchen auf die Mäuse wurden die Kontexte, sowie der größere Käfig für die Gewöhnung regelmäßig nach jedem Kontakt zu einer Maus desinfiziert. Hierdurch wurde vermieden, dass noch eigene Gerüche von der ersten Exposition bei der Gruppe AA oder Gerüche der Versuchstiere, welche zuvor den Kontexten ausgesetzt waren, einen Einfluss auf die Wahrnehmung der Mäuse nehmen konnten.

Des Weiteren wurden alle Experimentdurchläufe mittels einer über den Kontexten montierten Kamera aufgezeichnet. Eine nachträgliche Auswertung des Videomaterials sollte gewährleisten, dass keine voneinander abweichenden Verhaltensweisen innerhalb der einzelnen Gruppen einen Einfluss auf die Ergebnisse haben würden.

### **2.3.1.5 Dekapitation der Versuchstiere**

Entgegen dem Goldstandard in Kiel wurde für die Tötung der Versuchstiere kein Genickbruch, sondern die sofortige Dekapitation mittels Guillotine durchgeführt. Die Entscheidung zum beschriebenen Vorgehen basiert hierbei auf den Auswirkungen des Genickbruchs oder einer Narkotisierung auf die Expression von IEGs. In Vorübungen zum eigentlichen Experiment waren bei einigen vorherigen Übungstiere intrakranielle Verletzungen beobachtet worden, wenn die Tiere mittels Genickbruch getötet wurden. Die Annahme war hierbei, dass die genannten Läsionen aufgrund des starken Zuges des Rückenmark am Hirnstamm der Mäuse beim Vorgehen mittels Genickbruch entstanden waren, weshalb von dieser Methode zur IEG-Detektion Abstand genommen wurde. Gleichzeitig hätte eine Narkotisierung der Tiere einen zusätzlichen Zeitaufwand und zusätzliche Eindrücke nach der Erkundung eines Kontextes für die Maus bedeutet, was wiederum Einfluss auf die Expression von IEGs hätte nehmen können. Daher wurde auch dieses Vorgehen als unpraktikabel eingestuft und die sofortige Dekapitation mittels Guillotine wurde als Methode für diese Experimente ausgewählt. Hierbei galt zu beachten, die Köpfe der Mäuse weit genug kaudal abzutrennen, um auch hierbei eine Verletzung des Gehirns auszuschließen.

## **2.3.2 Anfertigung der histologischen Schnitte**

### **2.3.2.1 Präparation des Gehirns**

Nach der Dekapitation erfolgte sofort die Entnahme des Gehirns unter standardisiertem Vorgehen, damit auch hier keine Zeitverzögerungen aufkamen. So konnte gewährleistet werden, dass die Gehirne innerhalb von zwei Minuten nach Exposition gegenüber dem letzten Kontext fixiert waren. Exemplarisch für eine Maus wurde hierfür die Haut ausgehend von der zervikalen Resektionskante lateral mittels Präparierschere gelöst und nach rostral über den Kopf der Maus geschlagen. Bei diesem Schritt musste speziell beachtet werden, nicht den Schädel zu verletzen, welcher in Umgebung der Ohren besonders dünn ist. Anschließend wurde erneut vom Rückenmark ausgehend der Schädel in schrägen Schnitten nach rostromedial eröffnet und ein Querschnitt an der frontalen Kalotte gesetzt, um anschließend den Kalottendeckel abzuheben. Mit Griff des Kleinhirns mittels Pinzette konnte nun das gesamte Hirn leicht angehoben werden und das Rückenmark sowie der Nervus opticus beidseits durchtrennt werden. Daraufhin wurde das Gehirn entnommen, in PBS (10x) vorsichtig gewaschen, das Kleinhirn abgetrennt und das Großhirn in die beschriftete Ausgießform gegeben. Hierbei wurde stets auf die gleiche Orientierung der Gehirne geachtet, bei der „dorsal“ mit einem Pfeil an der Ausgießform markiert wurde und die rostralen Anteile zur Öffnung der Ausgießform ausgerichtet waren. Nach Zugabe von Leica tissue freezing medium<sup>TM</sup> mit vollständiger Bedeckung des Gehirns wurde die Form in Trockeneis gelegt und mittels Zugabe von reinem Ethanol zum Trockeneis ein sofortiges Frieren des Präparates hervorgerufen. Nach der Durchführung der Experimente jeweils einer Gruppe wurden die Präparate im Gefrierschrank bei -80°C gelagert.

### **2.3.2.2 Anfertigung der Kryoschnitte**

Die Anfertigung der Kryoschnitte wurde an einem Kryostaten der Firma Leica durchgeführt. Hierfür wurden die Präparate einzeln nach ausreichender Lagerung für mindestens 24 Stunden bei -80°C aus dem Gefrierschrank entnommen, die Ausgießform entfernt und das einzelne Präparat auf dem Objekttisch des Kryostats mittels Zugabe geringer Mengen von Leica tissue freezing medium<sup>TM</sup> mit der okzipitalen Seite in Ausrichtung zum Objekttisch fixiert. Die Objekttemperatur wurde am Kryostaten auf -17°C eingestellt sowie die Kammertemperatur auf -20°C. Nach Einspannen der Kryostatklinge erfolgte die Abtragung nicht benötigter Schnitte bis auf die Höhe eines Bregma-Levels von -1,00 mm, was dem rostralen Beginn des DG entspricht. Die Bestimmung des richtigen Bregma-Levels wurde hierbei durch



regelmäßige Sicherung eines Schnittes mit mikroskopischer Begutachtung und Abgleich mit dem entsprechenden Bregma-Level in anatomischen Atlanten sichergestellt (Paxinos et al., 2001). Ab hier erfolgte die Sicherung der angefertigten Kryoschnitte mit einer Schichtdicke von 20 µm auf fünfzehn Objektträger pro Maus mit gleichmäßiger Verteilung der rostrokaudalen Schnittebenen über alle Objektträger. Die Sammlung der Kryoschnitte erfolgte bis zu einem Maximum von fünf Kryoschnitten pro Objektträger oder bis zum Erreichen des Bregma-Levels von -2,70 mm. Nach vorheriger Beschriftung der Objektträger erfolgte die Lagerung in einem Archivierkasten bei erneut -80°C.

### **2.3.3 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Aufgrund der benötigten mehrfachen Inkubation der Präparate über Nacht erfolgte eine FISH über vier Tage. Pro Durchlauf wurden hierbei mindestens acht und maximal 24 Objektträger für die FISH ausgewählt. Diese Menge wurde basierend auf dem verfügbaren Platz und der verfügbaren Laborausstattung sowie der Praktikabilität ausgewählt. Im Folgenden werden die Abläufe der FISH der Übersicht halber nach Tagen aufgeteilt erläutert. An dieser Stelle ist hervorzuheben, dass die verwendeten Materialien und Lösungen des ersten Tages keine RNase enthalten durften, damit eine entsprechende Hybridisierung der Sonden mit der in den Zellen vorhandenen RNA stattfinden konnte. Hierfür mussten die verwendeten Lösungen, wie in Kapitel 2.1.5 vermerkt, mit DEPC versehen und autoklaviert werden. Verwendete Glasware musste vor gebraucht entsprechend einer Heißluftsterilisation für vier bis sechs Stunden bei 200°C erhitzt werden. Aufgrund des Abschlusses der Hybridisierung zu Beginn von Tag zwei musste ab diesem Tag keine besondere Rücksicht mehr auf eine Freiheit von RNase genommen werden.

#### **2.3.3.1 Tag 1**

Für die FISH wurden die in Kapitel 2.1.5 und 2.1.6 aufgeführten Lösungen und Reagenzien vorbereitet. Anschließend erfolgte die Entnahme der Objektträger mit den zu färbenden Schnitten aus dem Gefrierschrank. Die Objektträger wurden in Küvetten nach Hellendahl positioniert und für 15 Minuten bei 15°C ohne Auflegen des zugehörigen Deckels getrocknet. In allen weiter aufgeführten Arbeitsschritten wurden die Küvetten mit ihren Deckeln verschlossen, um eine Kontamination der Lösungen und damit der Präparate mit anderen Reagenzien zu vermeiden. Für eine Fixierung der Gewebeschnitte erfolgte nach der Trockenphase die Zugabe von Formalinlösung (4%) für 20 min unter Kühlung auf Eis sowie

unter durchgehender Schwenkbewegung auf einem Laborschüttler (70 rpm). Nach dem Verwerfen der Formalinlösung wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur in PBS (1x) unter gleicher Schwenkbewegung gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Dehydratation mittels Bades in Ethanol unterschiedlicher Konzentration bei Raumtemperatur ohne Schwenken. Nach 5 Minuten in Ethanol (70%), folgten 5 Minuten in Ethanol (95%), 5 Minuten in Ethanol (100%) sowie weitere 5 Minuten in Ethanol (75%), gefolgt von erneutem dreimaligem Waschen in PBS (1x) für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Schwenkbewegung. Hieran schloss sich ein Bad für 10 Minuten in Acetylierungspuffer bei Raumtemperatur unter Schwenkbewegung an. Nach abgelaufener Zeit wurde der verwendete Acetylierungspuffer in eine 500 ml Flasche gegeben, erneut 250 µl Essigsäureanhydrid hinzugegeben, die Lösung mittels kurzen Schwenkens gemischt und erneut für 10 Minuten zu den Präparaten gegeben. Anschließend erfolgten Waschvorgänge in PBS (1x) und SSC-T (5x) für jeweils zweimal 5 Minuten. Während dieser Zeit wurde die Hybridisierungslösung mit den Sonden vorbereitet. Hierfür wurden die Proben mit den Sonden zif268 und egr-1 aus dem Gefrierschrank (-80°C) genommen und für ein bis zwei Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut, bis sich diese verflüssigten. Anschließend wurden von jeder Probe jeweils 2 µl pro Objektträger in 100 µl der Hybridisierungslösung verdünnt. Danach fand eine Denaturierung für fünf Minuten bei 80°C im vorgeheizten Heizblock statt, wonach die Lösung auf Eis gelegt wurde. Der Lösung wurde dann die benötigte Menge der Hybridisierungslösung zugegeben, um ein Volumen von 200 µl pro Objektträger zu erreichen. Für die anschließende Vorbereitung der Objektträger auf die Hybridisierung wurde jeder Objektträger einzeln aus der zuletzt verwendeten Waschlösung genommen und die Gewebeschnitte eines Objektträgers gemeinsam mit einer Umrandung mittels PAP-Pen versehen. Bis zur Zugabe der Hybridisierungslösung wurden die Gewebeschnitte daraufhin mit SSC-T (5x) bedeckt, um ein Austrocknen dieser zu verhindern. Nach der abgeschlossenen Vorbereitung wurden für jeden Objektträger nacheinander die folgenden Arbeitsschritte durchgeführt. Das SSC-T wurde mittels Wasserstrahlpumpe von dem Objektträger entfernt. Anschließend wurden 200 µl der Hybridisierungslösung inklusive der Sonden auf den Objektträger gegeben und alle Gewebeschnitte mit Parafilm abgedeckt. Alle Objektträger wurden dann in horizontaler Ausrichtung in einem Archivierkasten platziert, auf dessen Boden 100 ml der Formamid-SSC-Lösung gegeben wurden, ohne dass die Objektträger die Flüssigkeit berührten. Die Box wurde daraufhin geschlossen, in eine Plastiktüte zusammen mit einigen Millilitern Milli-Q®-Wasser gegeben, die Plastiktüte verschlossen und über Nacht bei 60°C in der Inkubationskammer gelagert. Um für eine ausreichende Luftfeuchtigkeit in

der Inkubationskammer zu sorgen, wurde zusätzlich ein Becherglas mit 200 ml Milli-Q®-Wasser auf dem Boden der Inkubationskammer platziert.

### **2.3.3.2 Tag 2**

Zur Vorbereitung auf die Arbeitsschritte des zweiten Tages wurde die benötigte Menge an Blockpuffer (-20°C) aufgetaut. Außerdem wurden ein bis zwei Küvetten sowie SSC-T (5x) und SSC-T (0,1x) in einem Wasserbad gelagert und dieses auf 65°C erwärmt. Anschließend wurden die Präparate aus der Inkubationskammer entnommen und aufgrund des Formamidgehalts unter einer biologischen Sicherheitswerkbank aus den Archivierkästen genommen. Hierbei wurde das Parafilm vorsichtig mittels Pinzetten entfernt. Es folgte das zweimalige Waschen in SSC-T (5x) für jeweils 5 Minuten bei 65°C im Wasserbad unter Schwenkbewegung auf dem Laborschüttler sowie das sechsmalige Waschen in SSC-T (0,1x) für jeweils 10 Minuten unter gleichen Bedingungen. Hierdurch wurden die überschüssigen, nicht gebundenen Sonden von den Gewebeschnitten entfernt. Nach den genannten Waschvorgängen wurden die Präparate für 5 Minuten im zuletzt verwendeten SSC-T (0,1%) etwas abgekühlt. Im Anschluss erfolgte die Lagerung in Quench-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schwenken, um eine weitere Hybridisierung zu unterbrechen. Bei diesem Schritt war darauf zu achten, dass die Küvetten sowie ihre Deckel mit Aluminiumfolie bedeckt wurden, um die Präparate vor Lichteinfall zu schützen. Im letzten Waschschrift des zweiten Tages wurden die Präparate dreimal für jeweils 10 Minuten in TBS-T (0,1x) gegeben und bei Raumtemperatur geschwenkt. Darauffolgend wurde die Umrandung der Gewebeschnitte mittels PAP-Pen erneuert und die Präparate in neuen Archivierkästen mit 300 µl Blockpuffer je Objektträger für 1 Stunde bedeckt. Währenddessen erfolgte die Verdünnung des Antikörpers Anti-Fluor-POD in Blockpuffer. Hierbei wurde je Objektträger eine Menge von 300 µl Blockpuffer und 0,6 µl des bereits 1:500 verdünnten Anti-Fluor-POD verwendet. Anschließend wurde der reine Blockpuffer mittels Wasserstrahlpumpe von den Präparaten entfernt und das Blockpuffer-Antikörper-Gemisch auf diese aufgetragen. Es folgte eine erneute Lagerung der Objektträger in den neuen Archivierkästen im Kühlschrank bei 4°C über Nacht.

### **2.3.3.3 Tag 3**

Für alle nun folgenden Arbeitsschritte mussten die Küvetten ebenso wie ihre Deckel mit Aluminiumfolie bedeckt werden, um die Präparate vor Lichteinfall zu schützen und damit eine Photobleichung der Fluorophore zu verhindern.

Wie am zweiten Tag wurde zu Beginn die benötigte Menge an Blockpuffer aufgetaut. Zur vorbereiteten Tyramid-Amplifikationslösung wurde am jeweiligen Tag sowohl Vanillin als auch Wasserstoffperoxid frisch hinzugefügt. Die Objektträger wurden nun aus dem Kühlschrank genommen und nach dem Entfernen des Blockpuffers sechsmal für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur und unter Schwenkbewegung in TBS-T gewaschen, um die überschüssigen Antikörper zu entfernen. Daraufhin folgte die Verdünnung des Cyanin-3-Tyramids in der Tyramid-Amplifikationslösung im Verhältnis von 1:1000. Bei einer geplanten Menge von 300 µl Tyramid-Amplifikationslösung pro Objektträger wurden entsprechend 0,3 µl des Cyanin-3-Tyramids hinzugefügt. Nach entsprechender Vorbereitung wurden die Objektträger erneut waagrecht in den Archivierkästen gelagert und die Präparate für 30 Minuten mit dem Tyramid in seiner Lösung bedeckt. Im Anschluss erfolgte eine erneute Reinigung für dreimal 10 Minuten in TBS-T sowie ein erneutes Bad in Quench-Lösung für 30 Minuten wie am Vortag. Nachfolgend wurden die Schnitte drei weitere Male für jeweils 15 Minuten in TBS-T gereinigt. Kongruent zum Ablauf am Vortag wurden die Präparate erneut für eine Stunde mit Blockpuffer bedeckt. In dieser Zeit wurde der Antikörper Anti-Dig-POD in einem Verhältnis von 1:500 in Blockpuffer verdünnt. Nach Ablauf der einstündigen Einwirkung des Blockpuffers wurde dieser mittels Pumpe entfernt und der neue Antikörper appliziert. Es erfolgte die erneute Lagerung der Präparate im Kühlschrank bei 4°C über Nacht.

### **2.3.3.4 Tag 4**

Die Präparate wurden aus dem Kühlschrank entnommen und nach dem Entfernen des Blockpuffers erneut sechsmal für jeweils 10 Minuten in TBS-T gewaschen. Somit wurden auch hier die überschüssigen Antikörper entfernt. Nun wurde analog zum Vortag das FITC-Tyramid im Verhältnis von 1:500 in Tyramid-Amplifikationslösung verdünnt und von dieser 300 µl pro Objektträger für 30 Minuten auf die Präparate aufgetragen. Anschließend wurden zwei Reinigungsphasen von jeweils 30 Minuten mit TBS-T durchgeführt. Nach weiterem Waschen für 10 Minuten in PBS (1x) und für 5 Minuten in Milli-Q®-Wasser wurden die Objektträger bei 37°C auf einem Heizblock getrocknet. Abschließend wurden 150 µl der

Mowiol-DAPI-Lösung auf die Präparate gegeben, diese mit einem Deckglas abgedeckt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur in Dunkelheit getrocknet. DAPI wurde hierbei als fluoreszierende Verbindung genutzt, welche sich bevorzugt an AT-reiche Regionen in den kleinen Furchen der DNA anlagert (Tanious et al., 1992). Es fand somit eine Färbung der nukleären DNA statt, durch welche sich in den nachfolgenden Schritten zwischen einer nukleären und einer zytoplasmatischen Signallokalisation unterscheiden ließ. Die dauerhafte Lagerung der Objektträger erfolgte schließlich in handelsüblichen Objektträgerboxen.

### **2.3.4 Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Axio Imager 2 mit ApoTome.2 verwendet. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte vor jeder Verwendung an zwei Standardpräparaten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Peer Wulff des Physiologischen Instituts der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Die Methode der Fluoreszenzmikroskopie machte sich in diesem Fall den fluoreszierenden Effekt der Fluorophore Cyanin 3, FITC und DAPI zunutze. Zusammengefasst wird von der Lichtquelle des Mikroskops mittels Anregungsfilter kurzwelliges Licht selektiert, welches auf das Präparat gerichtet wird. Durch dieses kurzwellige und damit energiereiche Licht werden Elektronen der Fluorophore auf ein höheres Energieniveau angeregt. Aufgrund der Instabilität dieses höheren Energieniveaus, fallen die Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück und geben hierbei ein für das Fluorophor charakteristisches Licht spezifischer Wellenlänge ab. Dieses wird entsprechend der Voreinstellungen des Fluoreszenzmikroskops registriert und über das Okular und den Computerbildschirm abgebildet. Für diese Arbeit wurden selektiv nur die Farbkanäle für Cyanin-3, FITC und DAPI ausgewählt. Entsprechend der Farbeinstellungen wurde zur Abbildung der zif268-Sonde über Fluoreszein und Cyanin-3 ein roter Farbkanal, für die Abbildung der egr-1-Sonde über Digoxigenin und FITC ein grüner Farbkanal und für die Abbildung von DAPI ein blauer Farbkanal ausgewählt. Als weitere Voreinstellungen für alle Aufnahmen wurde eine 20-fache Vergrößerung mit einer Belichtungszeit von 2,0 Sekunden für Cyanin-3, von 3,8 Sekunden für FITC und von 140 ms für DAPI gewählt, um eine ausreichende Signalstärke zu erhalten. Zudem wurde ein optischer Z-Stapel mit sechs Schichten von je 1,25 µm Schichtdicke bei einer Gesamtdicke des Stapels von 6,25 µm eingestellt.

Für die automatisierte, unihemisphäre Aufnahme des gesamten DG und des CA3 wurde die Aufnahmetechnik in Kacheln ausgewählt, welche von der Software des Mikroskops

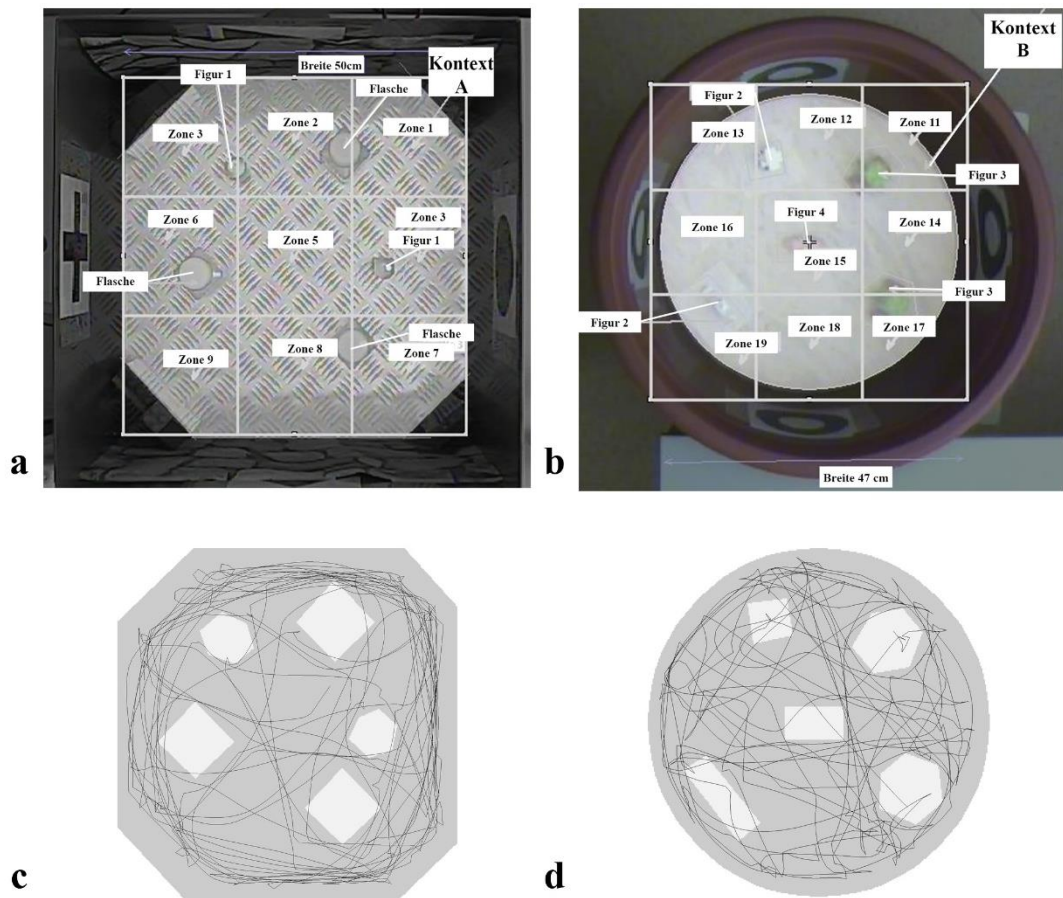
automatisch aneinander angefügt wurden. Je nach Ausdehnung des DG und des CA3 auf den verschiedenen rostrokaudalen Ebenen war hierfür die Aufnahme von zehn bis 27 Kacheln notwendig. Die Aufnahmezeit für ein Bild betrug hierbei 35 – 96 Minuten. Nach erfolgter Aufnahme eines Bildes wurde eine Maximumintensitätsprojektion (*maximum intensity projection*, MIP) erstellt, bei der für alle Aufnahmen die gleichen Schwellenwerte der einzelnen Farbkanäle eingestellt wurden. Hier galt es jedoch zu beachten, dass für Signale der Körnerzellen des DG und für die der Pyramidenzellen des CA3 unterschiedliche Schwellenwerte einzustellen waren. Aufgrund der Beobachtung in Vorexperimenten, dass die zytoplasmatische Signalintensität im CA3 grundsätzlich geringer ausfiel als im DG, wurde der Schwellenwert für die Fluoreszenzsignale der an die zif268-Sonden gebundenen Fluorophore etwas niedriger eingestellt. Hierdurch wurde unter der Voraussetzung, dass die FISH bei allen Durchgängen gleich starke Färbungen hervorgerufen hat, sichergestellt, dass verschiedene Zellen in einer Subregion mit gleicher Signalintensität abgebildet wurden, wenn sie dieselbe Zellaktivität besaßen. Die derart aneinander angeglichenen Aufnahmen wurden schließlich für die weitere Auswertung verwendet.

## **2.3.5 Auswertung**

### **2.3.5.1 Verhaltensanalysen**

Die Verhaltensanalysen wurden mittels der Video Tracking Software EthoVision XT durchgeführt. Der Kopf einer jeden Maus wurde als Fixpunkt festgelegt und ihre Strecke innerhalb von Kontext A und Kontext B aufgezeichnet und graphisch dargestellt. Beide Kontexte wurden weiterhin in neun weitgehend gleichgroße Bereiche eingeteilt (Abbildung 10). Ausgewertet wurde einerseits die zurückgelegte Strecke der Mäuse. Diese wurde zwischen den Gruppen AA und AB sowie zwischen dem ersten und zweiten Kontext, denen die jeweiligen Mausgruppen ausgesetzt wurden, verglichen. Andererseits wurde die Anzahl der Durchquerungen jeder der neun Bereiche ermittelt und auch diese zwischen den Gruppen AA und AB sowie zwischen dem ersten und zweiten Kontext, denen die Mausgruppen ausgesetzt wurden, verglichen. Der Vergleich der zurückgelegten Strecke sollte ausschließen, dass sich einzelne Versuchstiere deutlich weniger als andere bewegten und einen größeren Teil der Expositionsdauer beispielsweise nur in einer Ecke der jeweiligen Arena verbrachten. Zudem sollte hiermit untersucht werden, ob beide Arenen in gleichem Maß erkundet wurden. Über einen Vergleich der Anzahl der Durchquerungen der einzelnen Regionen sollte

untersucht werden, ob jeder Bereich der Arenen gleichmäßig erkundet und damit gleichermaßen wahrgenommen wurde.



**Abbildung 10 Kontexte mit Zonen sowie exemplarische Laufstreckenaufzeichnungen**

(a) Foto des Kontextes A in Schwarz-Weiß mit eingetragener Aufteilung in Zone 1 bis 9 zur Auswertung der Verhaltensanalysen. (b) Foto des Kontextes B in Schwarz-Weiß mit eingetragener Aufteilung in Zone 11 bis 19 zur Auswertung der Verhaltensanalysen. (c) Visualisierung einer exemplarischen Laufstreckenaufzeichnung in Kontext A mittels der Software EthoVision XT. (d) Visualisierung einer exemplarischen Laufstreckenaufzeichnung in Kontext B mittels der Software EthoVision XT.

In (a) und (b) sind die Objekte markiert, welche in den verschiedenen Kontexten aufgestellt wurden. Gleich Objekte wurde mit gleicher Bezeichnung versehen. In (c) und (d) ist die durch die Mäuse begehbare Fläche grau hinterlegt. Aufgestellte Objekte sind weiß hinterlegt. Die Laufstrecke wurde als schwarze Linie eingezeichnet.

### **2.3.5.2 Histologische Auswertung**

Für die histologische Auswertung erfolgte eine Differenzierung zwischen linkshemisphäralen und rechtshemisphäralen Schnitten durch die Hippocampusformation. Hierbei wurden der DG und das CA3 seitengetrennt in die jeweiligen Subregionen unterteilt und für diese die später aufgeführten Werte erhoben. Es ergaben sich somit separate Werte für den spDG, den ipDG, das CA3c, das CA3b und das CA3a. Hierbei erfolgte die Aufteilung des CA3 nach den Vorgaben von Lorente de Nó (1934) in drei gleichgroße Abschnitte entlang der Achse der Pyramidenzellschicht wie bereits in Abbildung 5 gezeigt. In der Gruppe hc wurden pro Maus jeweils drei Aufnahmen des DG sowie des CA3 herangezogen. In den Gruppen A5 und A30 wurden vier Aufnahmen je Maus ausgewertet, von denen jeweils zwei von der rechtsseitigen und zwei von der linksseitigen Hippocampusformation stammten. Für die Gruppen AA und AB wurden je Maus sechs Aufnahmen angefertigt und analysiert, von denen jeweils drei von der rechtsseitigen und linksseitigen Hippocampusformation stammten. Die histologischen Schnitte wurden hierbei so ausgewählt, dass jeweils eine rechtsseitige und eine linksseitige Aufnahme aus den rostralen Abschnitten der dorsalen Hippocampusformation stammten (Bregma -1,2 mm bis Bregma -1,5 mm), jeweils eine rechtsseitige und eine linksseitige Aufnahme aus mittleren Anteilen (Bregma -1,5 mm bis Bregma -1,8 mm) sowie jeweils eine aus kaudalen Abschnitten (Bregma -1,8 mm bis Bregma -2,1 mm).

### **2.3.5.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl**

Für alle Aufnahmen wurde für jede der im vorherigen Kapitel genannten Subregionen die Gesamtzellzahl bestimmt, indem die anhand der DAPI-Färbung abgrenzbaren Zellkerne automatisiert ausgezählt wurden. Die Auszählung erfolgte hierbei durch die Software CellProfiler<sup>TM</sup>, in der die Abgrenzung zwischen den Zellkernen nochmals manuell überprüft wurde. Zur Vorbereitung der automatisierten Auswertung wurden die MIPs der Aufnahmen in Adobe Photoshop CC in einzelne Bildausschnitte aufgeteilt, die jeweils den einzelnen Subregionen entsprachen. Hierdurch wurde verhindert, dass Neurone der angrenzenden Subregionen sowie Interneurone in den angrenzenden zytoarchitektonischen Schichten in die Auswertung miteinbezogen wurden.

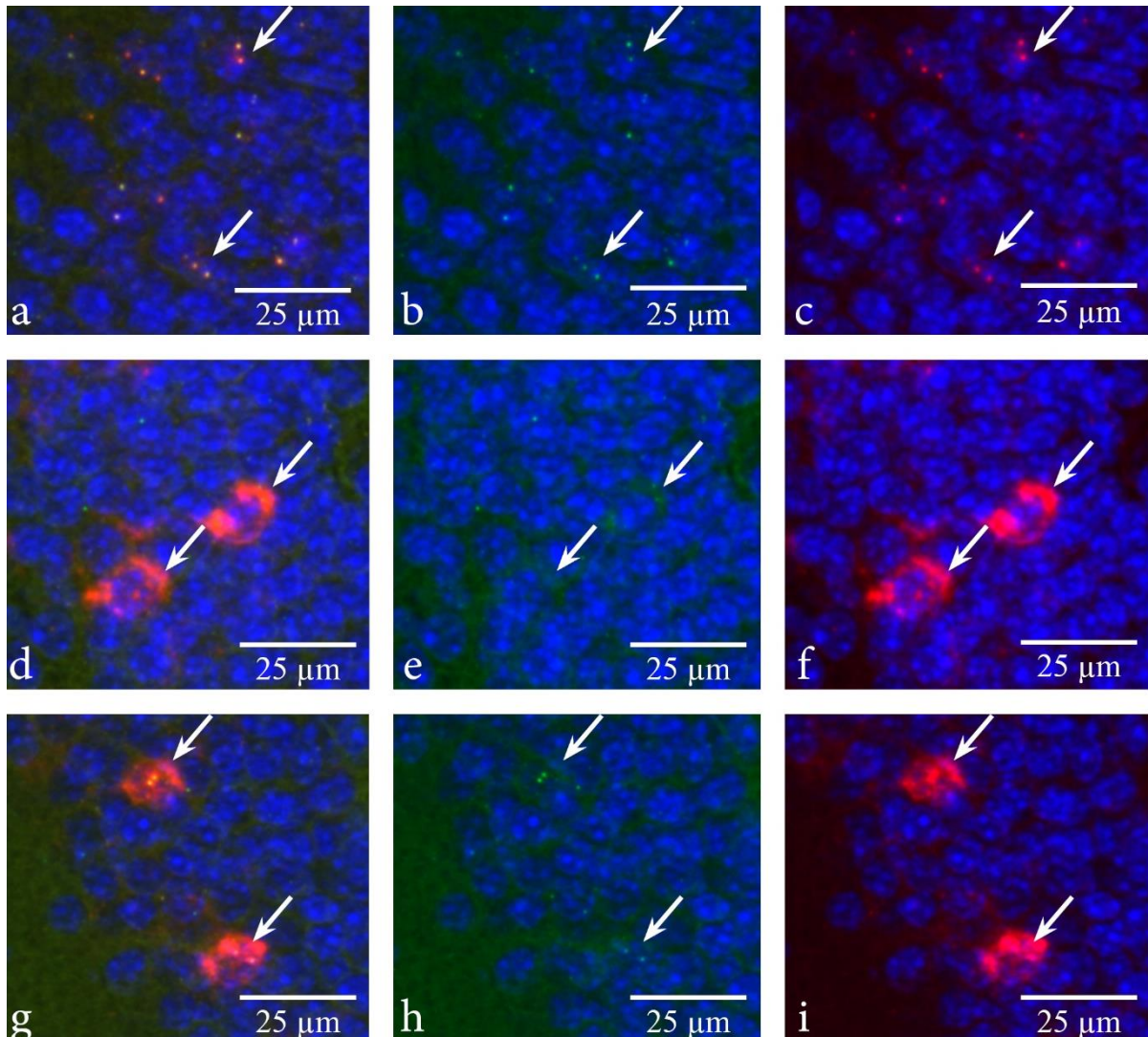
### **2.3.5.4 Bestimmung der Anzahl aktivierter Neurone**

Die Auszählung und Charakterisierung der aktivierten Neurone wurde verblindet durchgeführt, indem alle Aufnahmen durch Frau Dr. rer. nat. Kira Balueva eine neue



Nummerierung erhielten, die in keinem Bezug zu den einzelnen Gruppen stand und keinen Zusammenhang zwischen den einzelnen Schnitten eines Versuchstieres erkennen ließ. Bei der Auszählung der aktivierten Neurone wurde dabei zwischen drei verschiedenen Arten der nachweisbaren Zellaktivität differenziert (Abbildung 11). Die erste stellte die Aktivierung eines Neurons nur innerhalb der letzten 5 – 10 Minuten der Maus dar. Diese Situation wurde durch den nukleären Nachweis von Fluoreszenzsignalen der Proben bei gleichzeitiger Abwesenheit zytoplasmatischer Signale charakterisiert. Da bei einer solchen Aktivität der Neurone sowohl prä-mRNA als auch mRNA im Nukleus vorliegen mussten, galt hier als Voraussetzung für die Echtheit eines nukleären Signals, dass es sowohl mittels zif268 als auch mittels egr-1 nachgewiesen werden musste (Abbildung 11a-c). Die zweite Art der Zellaktivität wurde durch jene ausschließlich vor mehr als 30 Minuten charakterisiert und mittels des Nachweises zytoplasmatischer Signale bei Abwesenheit nukleärer Signale definiert. Aufgrund der zügigen Prozessierung der prä-mRNA in Zellkern war in dieser Situation nur der zytoplasmatische Nachweis von zif268 und nicht von egr-1 zu erwarten (Abbildung 11d-f). Die dritte Art wurde als wiederholte und damit doppelte Zellaktivität sowohl vor mehr als 30 Minuten als auch innerhalb der letzten 5 - 10 Minuten der Maus definiert, was bei den Gruppen AA und AB einer neuronalen Aktivität in beiden Kontexten entsprach. In dieser Situation mussten sowohl nukleäre Signale mittels zif268 und egr-1 nachweisbar sein als auch zytoplasmatische Signale mittels zif268 (Abbildung 11g-i).

Die Zählung dieser drei Arten zellulärer Signale erfolgte dabei mit Hilfe des Softwarepaketes Fiji des Programms ImageJ. Mit diesem wurden erneut die MIPs der Aufnahmen betrachtet und die entsprechend aktivierten Neurone in den verschiedenen Subregionen vom gleichen Untersucher manuell mit jeweils drei verschiedenen Markern versehen. Diese wurden anschließend automatisch durch das Programm ausgezählt und wiedergegeben. Nach Auswertung aller Aufnahmen erfolgte die Entblindung.



**Abbildung 11 Beispiele nachgewiesener Signale**

Abgebildet sind exemplarische Ausschnitte aus mikroskopischen Aufnahmen von histologischen Präparaten dreier verschiedener Mäuse nach erfolgter FISH bei einer 40x Vergrößerung in unterschiedlichen Kombinationen der Fluoreszenzkanäle. Abbildung (a) – (c) zeigen den gleichen Bildausschnitt eines Präparates einer Maus der Gruppe A5. Abbildung (d) – (e) zeigen den gleichen Bildausschnitt eines Präparates einer Maus der Gruppe A30. Abbildung (g) – (i) zeigen den gleichen Bildausschnitt eines Präparates einer Maus der Gruppe AA. Die Bilder der ersten Spalte (a, d, g) zeigen eine Kombination der Fluoreszenzkanäle von DAPI (blau), FITC (grün) und Cyanin-3 (rot) zur Detektion der Zellkerne, der Sonde *egr-1* und der Sonde *zif268*. Die Bilder der zweiten Spalte (b, e, h) zeigen eine Kombination der Fluoreszenzkanäle von DAPI und FITC. Die Bilder der dritten Spalte (c, f, i) zeigen eine Kombination der Fluoreszenzkanäle von DAPI und Cyanin-3. (a) Exemplarische Darstellung nukleärer Signale (Pfeile), welche sich sowohl mittels *egr-1* (grün) in (b) als auch mittels *zif268* (rot) in (c) innerhalb der mit DAPI markierten Nuclei nachweisen lassen. (d) Exemplarische Darstellung zytoplasmatischer Signale (Pfeile), welche sich wie in (e) nicht mittels *egr-1* (grün) detektieren lassen, sondern nur mittels *zif268* (rot) wie in (f) um einen Nucleus herum. (g) Exemplarische Darstellung von Zellen sowohl mit nukleärem als auch mit zytoplasmatischem Signal (Pfeile), bei denen die nukleären Signale sowohl mittels *egr-1* wie in (h) als auch mittels *zif268* wie in (i) detektiert werden können, wohingegen die zytoplasmatischen Signale nur mittels *zif268* wie in (i) nachweisbar sind.

## 2.3.6 Statistik

### 2.3.6.1 Statistische Aufarbeitung und verwendete Testverfahren

Für die statistische Aufarbeitung wurde entsprechend der Ausführungen der vorherigen Kapitel die Anzahl an Zellen mit nukleärem Signal, die Anzahl an Zellen mit zytoplasmatischem Signal und die Zahl derjenigen Zellen bestimmt, welche doppelt aktiviert wurden. Über die Summe jeweils zweier dieser Gruppen wurde wiederum die Gesamtzahl an Zellen mit nukleärem Signal (Zellen mit nukleärem Signal + doppelt aktivierte Zellen) sowie die Gesamtzahl an Zellen mit zytoplasmatischem Signal (Zellen mit zytoplasmatischem Signal + doppelt aktivierte Zellen) bestimmt. Aus diesen wurden weiterhin die Prozentsätze an der Gesamtzellzahl bestimmt, zu denen Neurone der verschiedenen Subregionen des DG und des CA3 aktiviert wurden. Diese Werte wurden für jeden unihemisphären Schnitt durch die Hippocampusformation einer jeden Maus bestimmt. Anschließend wurden die Mittelwerte der entsprechenden Parameter für jede Subregion einer jeden Maus erhoben und diese für die weitere Analyse der Mausgruppen sowie für den Vergleich dieser verwendet.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GraphPad Prism 9. Eine Normalverteilung der erhobenen Werte wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Ausreißer wurden im Vorfeld mit dem Ausreißertest nach Grubbs identifiziert. Der Vergleich der Zellzahlen in den MIPs mit denen in den dreidimensionalen Rekonstruktionen der mikroskopischen Aufnahmen sowie der Vergleich der Zellzahlen zwischen der automatischen und der manuellen Zählung erfolgte mit einem gepaarten t-Test bzw. einem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test. Der Vergleich der Gruppen hc, A5 und A30 zur Kontrolle der Methode erfolgte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (*ordinary one-way analysis of variance; ordinary one-way ANOVA*) oder einem Kruskal-Wallis-Test (*Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks*). Für Mehrfachvergleiche zwischen den Gruppen wurden post-hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur ausgeführt. Die Analyse der Zellaktivität, der wiederholten Aktivierung von Zellen sowie des Ähnlichkeits-Scores und der Reaktivierungsraten zwischen den Gruppen AA und AB wurde mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (*two-way analysis of variance; two-way ANOVA*) durchgeführt. Auch hier wurden post-hoc-Tests mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche durchgeführt. Innerhalb der Gruppen AA und AB erfolgten die Auswertungen erneut mittels einfaktorieller Varianzanalyse oder Kruskal-Wallis-Test. Für den Vergleich zwischen den Hemisphären und zwischen den verschiedenen Höhen der rostrokaudalen Achse wurde erneut die zweifaktorielle Varianzanalyse verwendet. Bei allen Tests wurde das Signifikanzniveau auf

5% festgelegt. Ergebnisse mit einem p-Wert von < 0,05 wurden mit \* markiert, solche mit einem p-Wert von < 0,005 mit \*\*, Ergebnisse mit einem p-Wert von < 0,0005 mit \*\*\* sowie die mit einem p-Wert von < 0,0001 wurden mit \*\*\*\* markiert. Ergebnisse, welche nicht signifikant waren, wurden mit ns (*nicht signifikant*) gekennzeichnet. Soweit dies nicht anders angegeben wird, sind in den Abbildungen die Ergebnisse der post-hoc-Tests dargestellt.

### 2.3.6.2 Ähnlichkeits-Score (Similarity Score)

Als weitere Parameter wurden zwei verschiedene Reaktivierungsraten für die Gruppen AA und AB berechnet. Die Reaktivierungsrate 1 (RR1) gibt den Anteil von allen im ersten Kontext aktivierten Zellen (Zellen mit zytoplasmatischem Signal) an, welche auch im zweiten Kontext erneut aktiviert wurden (zusätzliches nukleäres Signal) und lässt sich über die folgende Formel berechnen:

$$RR1 = \frac{\text{Anteil doppelt aktivierter Zellen}}{\text{Anteil an Zellen mit nur zytoplasmatischem Signal} + \text{Anteil doppelt aktivierter Zellen}}$$

Die Reaktivierungsrate 2 (RR2) gibt hingegen den Anteil von allen im zweiten Kontext aktivierten Zellen (Zellen mit nukleärem Signal) an, welche bereits im ersten Kontext aktiviert wurden (zusätzliches zytoplasmatisches Signal) und lässt sich über folgende Formel berechnen:

$$RR2 = \frac{\text{Anteil doppelt aktivierter Zellen}}{\text{Anteil an Zellen mit nur nukleärem Signal} + \text{Anteil doppelt aktivierter Zellen}}$$

Weiterhin wurde in Anlehnung an bereits veröffentlichte Studien zur IEG-Bildgebung ein Ähnlichkeit-Score (*similarity score*) berechnet, der bereits eine breite und etablierte Anwendung in der Wissenschaft gefunden hat (Kubik et al., 2007, Vazdarjanova und Guzowski, 2004). Bei diesem werden nicht nur wie oben beschrieben die Anteile an aktivierten Zellen verglichen. Hier wird zusätzlich die Wahrscheinlichkeit miteinbezogen, dass zwei Situationen statistisch voneinander unabhängige Zellpopulationen aktivieren. Ebenso wird hier die Abweichung von der Hypothese einer voneinander unabhängigen Aktivierung auf eine perfekte AA-Situation normalisiert, wenn genau die im ersten Kontext

aktivierten Zellen reaktiviert werden würden. Ein Wert des Ähnlichkeits-Scores von 1 entspricht damit einer vollständigen Überlappung der Neuronenensembles, welche im ersten und zweiten Kontext aktiviert wurden. Ein Wert des Ähnlichkeits-Scores von 0 entspricht zwei komplett voneinander unabhängig aktivierten Neuronenensembles ohne Überlappungen (vgl. Vazdarjanova und Guzowski (2004)).

Aufgrund der in der Wissenschaft bereits etablierten Anwendung des Ähnlichkeits-Scores wird bei den Ergebnissen und der Diskussion von diesen das Hauptaugenmerk auch auf dem Ähnlichkeits-Score liegen. Die Berechnung und Auswertung der Reaktivierungsraten erfolgten dennoch, da sie etwas sensitiver auf nur geringe Veränderungen in der Reaktivierung von Neuronen ansprechen. Da sie jedoch in keiner Weise normalisiert sind, darf ihre Aussagekraft nicht überbewertet werden. Die Auswertung der Reaktivierungsraten sollte hier somit nur zur sensitiveren Detektion von Trends genutzt werden.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Ein- und Ausschluss von Versuchstieren**

Von den 19 initial in die Studie eingeschlossenen Mäusen konnten 18 in die endgültige Auswertung einbezogen werden. Eine Maus aus der Gruppe AA musste bei mangelndem Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufgrund schlechter Qualität der zytoplasmatischen Signalausprägungen und hohem Hintergrundsignal aus der Studie ausgeschlossen werden. Im Vergleich zu den vier weiteren Versuchstieren der Gruppe AA konnte hier nur eine signifikant niedrigere, noch abgrenzbare Anzahl an Zellen mit zytoplasmatischem Signal in verschiedenen Subregionen identifiziert werden. Exemplarisch sei hier die Subregion CA3c genannt, in der lediglich ein Anteil an Zellen mit zytoplasmatischem Signal von 17,46% des Mittelwertes der weiteren Mäuse der Gruppe sicher nachgewiesen werden konnte ( $p = 0,0164$ ). Auch mit dem Ausreißertest nach Grubbs wurden die Werte dieser Maus für das CA3c, das CA3b und das gesamte CA3 als Ausreißer identifiziert. Auch stellte der Wert des ipDG derselben Maus einen Ausreißer dar. Aufgrund der somit für den DG und das CA3 einheitlich niedrigen Ausreißer bei verschiedenen Gewebeschnitten dieser Maus bei jedoch gemeinsamer FISH mit Gewebeschnitten anderer Mäuse und unauffälliger Darstellung der Verhaltensanalyse konnte lediglich ein Problem bei der Fixierung des Gehirns oder bei der Anfertigung der Kryoschnitte dieser Maus eine derartige Abweichung erklären.

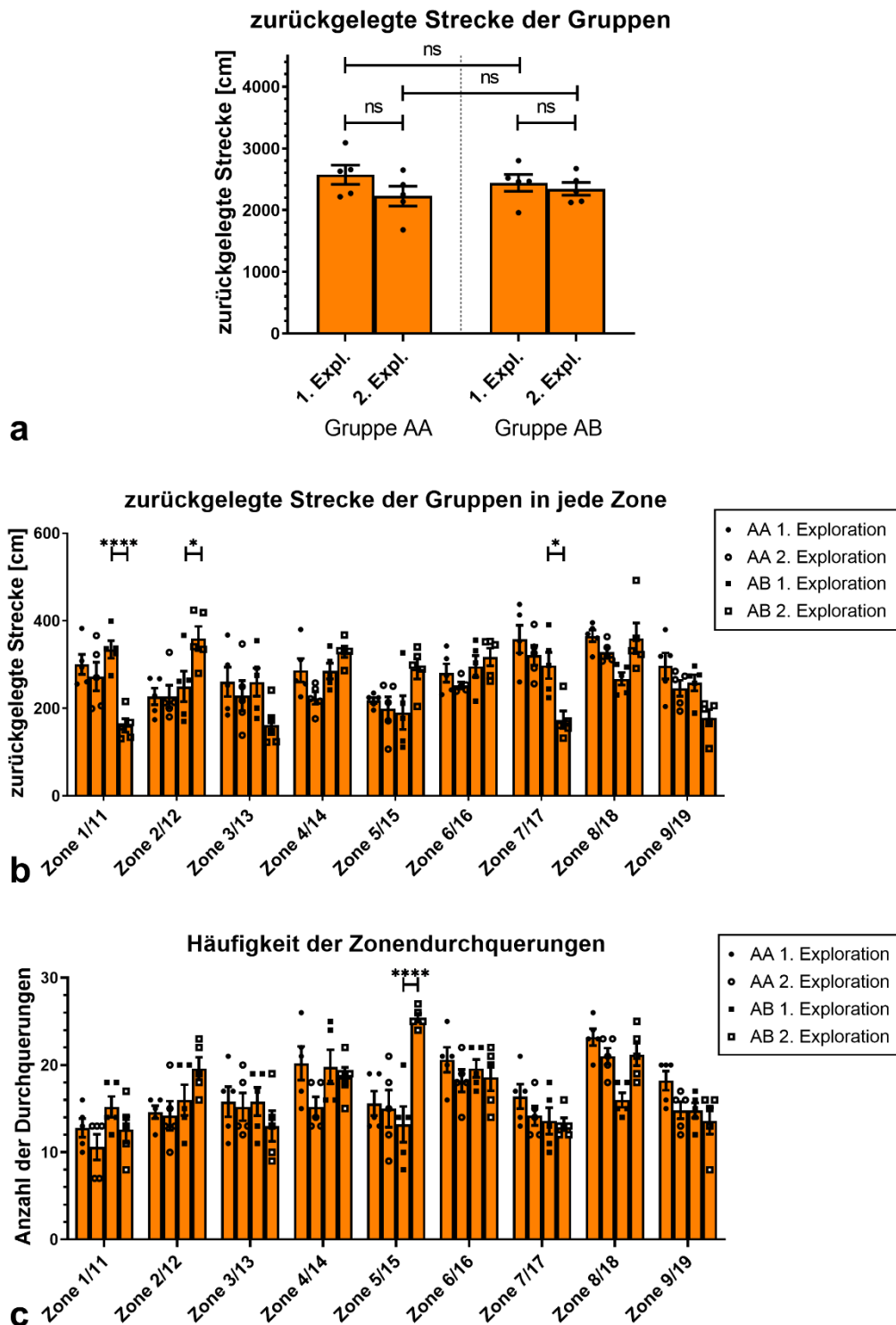
### **3.2 Verhaltensanalysen**

#### **3.2.1 Analyse der Laufstrecke**

Die Laufstrecke wurde für die verschiedenen Versuchsgruppen sowohl in den einzelnen Zonen der Kontexte ausgewertet als auch bezogen auf den gesamten ersten und zweiten Kontext. Für die gesamte in der jeweiligen Umgebung zurückgelegte Strecke konnte weder zwischen den Gruppen AA und AB noch zwischen den jeweiligen zuerst und zuletzt besuchten Kontexten ein Unterschied festgestellt werden (Gruppen:  $F(1, 16) = 0,0027$ ;  $p = 0,9589$ ; Expositionen:  $F(1, 16) = 2,456$ ;  $p = 0,1366$ ; Abbildung 12a). Es lagen nur drei signifikante Abweichungen zwischen den zurückgelegten Strecken für einzelne Zonen zwischen dem ersten und zweiten Kontext in der Gruppe AB vor (Zonen:  $F(8, 72) = 5,833$ ;  $p < 0,0001$ ; Expositionen:  $F(1, 72) = 1,084$ ;  $p = 0,3012$ ; Abbildung 12b). Sowohl in Zone 11 ( $p < 0,0001$ ) als auch in Zone 17 ( $p = 0,0064$ ) des Kontextes B haben die Mäuse signifikant

kürzere Strecken zurückgelegt als in den korrespondierenden Zonen 1 und 7 des Kontextes A (für Zonen vgl. Abbildung 10 a, b). Eine signifikant längere Strecke wurde hingegen in Zone 12 von Kontext B im Vergleich zu Zone 2 von Kontext A zurückgelegt ( $p = 0,0227$ ). Zwischen den Strecken der weiteren Zonen waren keine signifikanten Unterschiede zu registrieren ( $p > 0,05$ ).

Bei der Auswertung der Häufigkeit, mit der die einzelnen Zonen durchquert wurden, war lediglich ein signifikant häufigeres Passieren von Zone 15 als von der korrespondierenden Zone 5 durch Gruppe AB in Kontext B zu erkennen (Zonen:  $F(8, 72) = 6,852$ ;  $p < 0,0001$ ; Expositionen:  $F(1, 72) = 3,938$ ;  $p = 0,0510$ ; Zone 15:  $p < 0,0001$ ). Alle weiteren Zonen wurden von Gruppe AA und AB mit einer vergleichbaren Häufigkeit durchquert.



**Abbildung 12 Verhaltensanalysen**

(a) Gruppierter Darstellung der in den Kontexten zurückgelegten Strecken für die Gruppe AA und AB in der 1. Explorationsphase (1. Expl.) und der 2. Explorationsphase (2. Expl.). (b) Darstellung der in den Kontexten zurückgelegten Strecken in jeder Zone für die Gruppen AA und AB in der 1. Explorationsphase und der 2. Explorationsphase. (c) Darstellung der Anzahl der Durchquerungen einer Zone für die Gruppen AA und AB in der 1. Explorationsphase und der 2. Explorationsphase aufgeteilt in die einzelnen Zonen der Kontexte.

Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. ns: nicht signifikant; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$ ; Der Übersicht halber wurde in (b) und (c) die Darstellung der Ergebnisse auf die statistisch signifikanten reduziert.



### **3.2.2 Schlussfolgerungen der Verhaltensanalyse für die Verwertbarkeit der Daten für die weitere Auswertung**

Eine gleichmäßige Erkundung der Umgebungen in beiden Kontexten war für die Wahrnehmung und die damit verbundene Verarbeitung sowie Speicherung von Informationen der Umgebungen essenziell. Entsprechend mussten eine vergleichbare Laufstrecke und eine einheitliche Inspektion aller Abschnitte der Kontexte durch die Mäuse vorliegen, um eine ordnungsgemäße Aussagekraft der Ergebnisse voraussetzen zu können. Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Abweichungen zwischen den Gruppen lassen sich hier auf die Geometrien der Umgebungen und auf die Erfassung von diesen durch die Software zurückführen. In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass sowohl Zone 11 als auch Zone 17 nicht nur den Boden der Arena, sondern zu einem nicht unerheblichen Teil auch einen Abschnitt der Wand erfassen. Dieser konnte von den Mäusen jedoch nicht betreten werden, womit in diesen Zonen entsprechend der geringeren erfassten Bodenfläche auch eine kürzere Laufstrecke als in den Zonen 1 und 7 zu erwarten war. Derartige geometrische Verhältnisse lassen sich ebenfalls in den eckständigen Zonen 13 und 19 finden, für die in der aufgeführten Statistik ebenfalls niedrigere Laufstrecken als in den Zonen 3 und 9 zu verzeichnen sind, die jedoch das Signifikanzniveau verfehlen. Gleichzeitig fallen Zone 12 und Zone 15 im Verhältnis zu den vier eckständigen Zonen in Kontext B größer aus als die Zonen 2 und 5 in Kontext A zu den dortigen eckständigen Zonen. Bei gleicher Gesamtstrecke, die die Mäuse in beiden Arenen zurückgelegt haben, war damit zu erwarten, dass in Kontext B ein größerer Teil dieser Strecke in den nicht eckständigen Zonen zurückgelegt wurde. Dies würde die längere Laufstrecke in Zone 12 erklären. Gleichzeitig kann mit der größeren Fläche von Zone 15 bei gleichzeitig zentraler Position in einer runden Umgebung vermutet werden, dass diese häufiger durchquert wurde als eine zentrale, zu ihren angrenzenden Zonen annähernd gleichgroße Fläche.

Die Verhaltensanalyse zeigt daher, dass die Umgebungen von beiden Gruppen gleichmäßig und vergleichbar erkundet wurden, womit die Voraussetzungen zur Verwertbarkeit der erhobenen Daten gewährleistet ist.

### **3.3 Analyse der Bildauswertung**

#### **3.3.1 Vergleich der Maximumintensitätsprojektion mit der dreidimensionalen Rekonstruktion der mikroskopischen Aufnahmen**

Wie bereits in Kapitel 2.3.4 ausgeführt, wurden die im Z-Stapel aufgenommenen mikroskopischen Bilder im Anschluss an die Aufnahme zu einer MIP zusammengefügt, um die weitere Bildanalyse zu ermöglichen. Um sicherzugehen, dass diese durch die Verwendung der MIP nicht beeinträchtigt wird, erfolgte vor der eigentlichen Auswertung der Signale ein Abgleich der Anzahl der nukleären und zytoplasmatischen Signalen zwischen der MIP und der entsprechenden dreidimensionalen Rekonstruktion der Aufnahmen. Letztere wurden mit der Software ImarisViewer 9.8.0 erstellt. Für den Vergleich wurden die Signale innerhalb des gesamten DG sowohl in der MIP als auch in der dreidimensionalen Rekonstruktion für vier histologische Schnitte manuell gezählt. Hierfür wurden Präparate einer Maus der Gruppe AA ausgewählt, um das Vorhandensein ähnlich vieler nukleärer und zytoplasmatischer Signale zu sichern, da bei der Erkundung desselben Kontexts initial von einer vergleichbaren Zellaktivität auszugehen war. Aufgrund der hohen Zelldichte der Körnerzellschicht des DG verglichen mit der Pyramidenzellschicht des CA3 und der hierdurch erschwerten Detektion und Zuordnung der Signale zu ihrem jeweiligen Neuron im DG erfolgte kein entsprechender Abgleich für das CA3. Die Aussagekraft für das CA3 wurde aufgrund der hier einfacheren Zuordnung der Signale im Falle einer regelrechten Zuordnung im DG als gesichert eingestuft. Die Auswertung ergab, dass weder für die nukleären noch für die zytoplasmatischen Signale ein signifikanter Unterschied zwischen der MIP und der dreidimensionalen Rekonstruktion vorlag ( $p > 0.05$ ). Die Verwendbarkeit der Signalauswertungen in der MIP wurde somit für den DG und das CA3 als valide gewertet und für die weitere Arbeit verwendet.

#### **3.3.2 Kontrolle der automatischen Zellzählung**

In Kapitel 2.3.5.3 wurde erläutert, dass die Gesamtzahl an erfassten Zellen in den jeweiligen Regionen durch eine automatisierte Zählung der Software CellProfiler<sup>TM</sup> ermittelt wurde. Um die Aussagekraft dieser automatisierten Zählung sicherzustellen, wurden die hierdurch erhaltenen Ergebnisse mit manuellen Zählungen verglichen. Hierfür wurde bei fünf histologischen Schnitten einer Maus die Gesamtzahl an Zellen durch eine manuelle Zählung bestimmt. Aufgrund der hohen Zelldichte der Körnerzellschicht des DG im Vergleich zur Pyramidenzellschicht des CA3 wurde dieser Vergleich sowohl für den DG bei ca. 3300 Zellen

als auch für das CA3 bei ca. 3400 Zellen durchgeführt. So sollte eine aussagekräftige Zählung der Zellzahl bei hoher und eher geringerer Dichte der Anordnung der Zellkörper sichergestellt werden. Ein Vergleich der automatisierten mit der manuellen Zählung der Gesamtzahl an Zellen lieferte in beiden Regionen keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0.05$ ). Dementsprechend wurde die automatisierte Zählung durch die Software als aussagekräftig eingestuft und für die weitere Auswertung verwendet.

### 3.4 Kontrolle der Methode der catFISH

Für die Kontrolle der Methode erfolgte ein Vergleich der Daten zwischen den Gruppen hc, A5 und A30. Einerseits sollte in diesem Rahmen kontrolliert werden, dass die Transkription von zif268/egr-1 in dieser Arbeit den gleichen zeitlichen und Zellkompartiment-abhängigen Verlauf aufweist, wie er in der bisherigen Literatur angegeben wurde. Andererseits wurde in dieser Arbeit die Transkription und der Nachweis eines Introns und damit der prä-mRNA des Gens mittels der Sonde egr-1 konkreter in Abhängigkeit einer Zellaktivität im Rahmen von Lernprozessen untersucht, was in der bisher veröffentlichten Literatur noch nicht der Fall war. Daher musste auch für egr-1 die Korrektheit der zeitabhängigen Lokalisation im Zellkern nachgewiesen werden.

#### 3.4.1 Nukleäre Signallokalisation

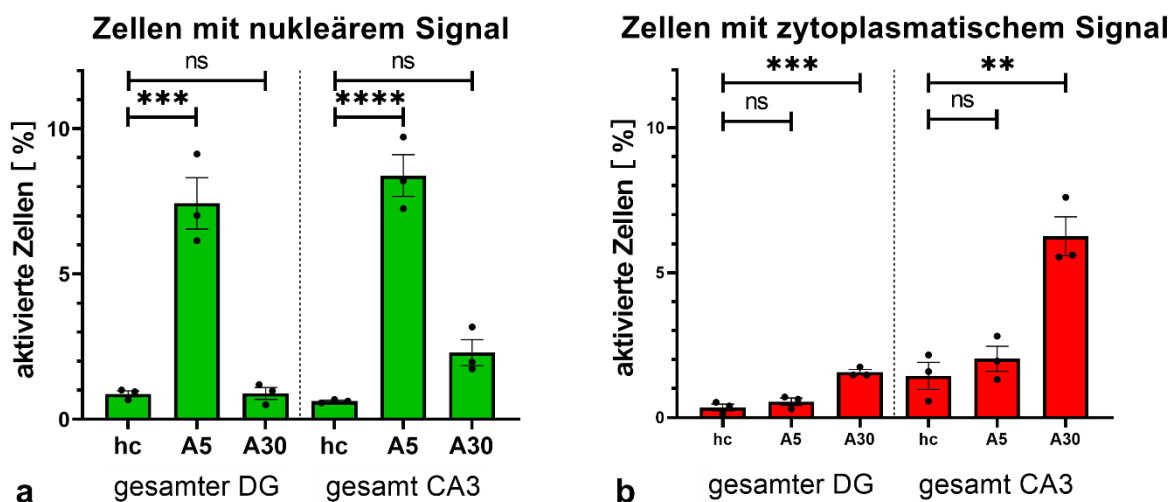
Für die nukleären Signale galt die Voraussetzung, dass die Signale sowohl mittels zif268 als auch mittels egr-1 nachweisbar sein mussten, um eine Echtheit der Signale zu garantieren. Entsprechend sind nachfolgend nur die für beide Sonden positiven Signale in die aufgeführte Statistik eingegangen.

Die Auswertung der nukleären Signale ergab, dass in der Kontrollgruppe hc im DG im Mittel  $0,88\% \pm 0,18\%$  Standardabweichung (*standard deviation*, SD) der Zellen ein nukleäres Signal aufwiesen, ebenso wie  $0,63\% \pm 0,06\%$  SD im CA3 (Abbildung 13a). Damit waren in einer bekannten und gewohnten Umgebung weniger als 1% der Zellen aktiv. In der Gruppe A5 war ein signifikant höherer Mittelwert des Anteils an Zellen mit nukleärem Signal zu registrieren (DG:  $F(2, 6) = 51,23$ ;  $p = 0,0002$ ; hc vs. A5:  $p = 0,0004$ ; CA3:  $F(2, 6) = 70,09$ ;  $p < 0,0001$ ; hc vs. A5:  $p < 0,0001$ ). Hier lag der Mittelwert bei  $7,43\% \pm 1,53\%$  SD für den DG und bei  $8,34\% \pm 1,24\%$  SD für das CA3. 30 Minuten nach Exposition gegenüber Kontext A war hingegen wieder das Ausgangsniveau in beiden Regionen erreicht, was in der Gruppe A30 durch einen Mittelwert von  $0,90\% \pm 0,36\%$  SD für den DG und von  $2,30\% \pm 0,77\%$  SD für das CA3 abgebildet wurde. Zwischen der Gruppe hc und A30 war somit kein signifikanter Unterschied an Zellen mit nukleärem Signal innerhalb des DG und im CA3 zu verzeichnen (hc vs. A30:  $p > 0,05$  jeweils für den DG und das CA3).

### 3.4.2 Zytoplasmatische Signallokalisation

Ein Nachweis der zytoplasmatischen Signale war nur mit der Sonde zif268 möglich. Egr-1 konnte zytoplasmatisch nur in Einzelfällen und hier als entsprechende Artefakte nachgewiesen werden. In der nachfolgenden Statistik sind damit nur zytoplasmatische Signale aufgeführt, welche mittels zif268 detektiert wurden.

Der Anteil an Zellen, die ein zytoplasmatisches Signal aufwiesen, war sowohl in der Gruppe hc als auch in der Gruppe A5 sehr gering (Abbildung 13b). Für den DG lagen die Mittelwerte bei  $0,35\% \pm 0,20\%$  SD für die Gruppe hc und bei  $0,55\% \pm 0,22\%$  SD für die Gruppe A5. Für das CA3 lagen die Mittelwerte in diesen Gruppen bei  $1,44\% \pm 0,81\%$  SD (hc) und bei  $2,02\% \pm 0,75\%$  SD (A5). Zwischen beiden Gruppen lagen für beide Bereiche somit keine signifikanten Unterschiede vor (hc vs. A5 für den DG und das CA3 jeweils  $p > 0,05$ ). Bei der Gruppe A30 war hingegen ein signifikanter Anstieg des Anteils an Zellen mit zytoplasmatischem Signal im Vergleich zur Gruppe hc zu registrieren (DG:  $F(2, 6) = 32,81$ ;  $p = 0,0006$ ; hc vs. A30:  $p = 0,0008$ ; CA3:  $F(2, 6) = 24,02$ ;  $p = 0,0014$ ; hc vs. A30:  $p = 0,0021$ ). Hier lag der Anteil an Zellen mit einem zytoplasmatischem Signal bei  $1,56\% \pm 0,16\%$  SD im DG und bei  $6,25\% \pm 1,17\%$  SD im CA3.



**Abbildung 13 Kontrolle der Methode der catFISH**

Es sind die Ergebnisse der post-hoc-Tests für die Anteile an Zellen mit nukleärem (a) und zytoplasmatischem (b) Signal von allen erfassten Zellen der jeweiligen Region im gesamten DG und im gesamten CA3 für die Gruppen hc, A5 und A30 dargestellt.

Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. DG: Gyrus dentatus; CA3: Cornu ammonis 3; ns: nicht signifikant; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,0005$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$

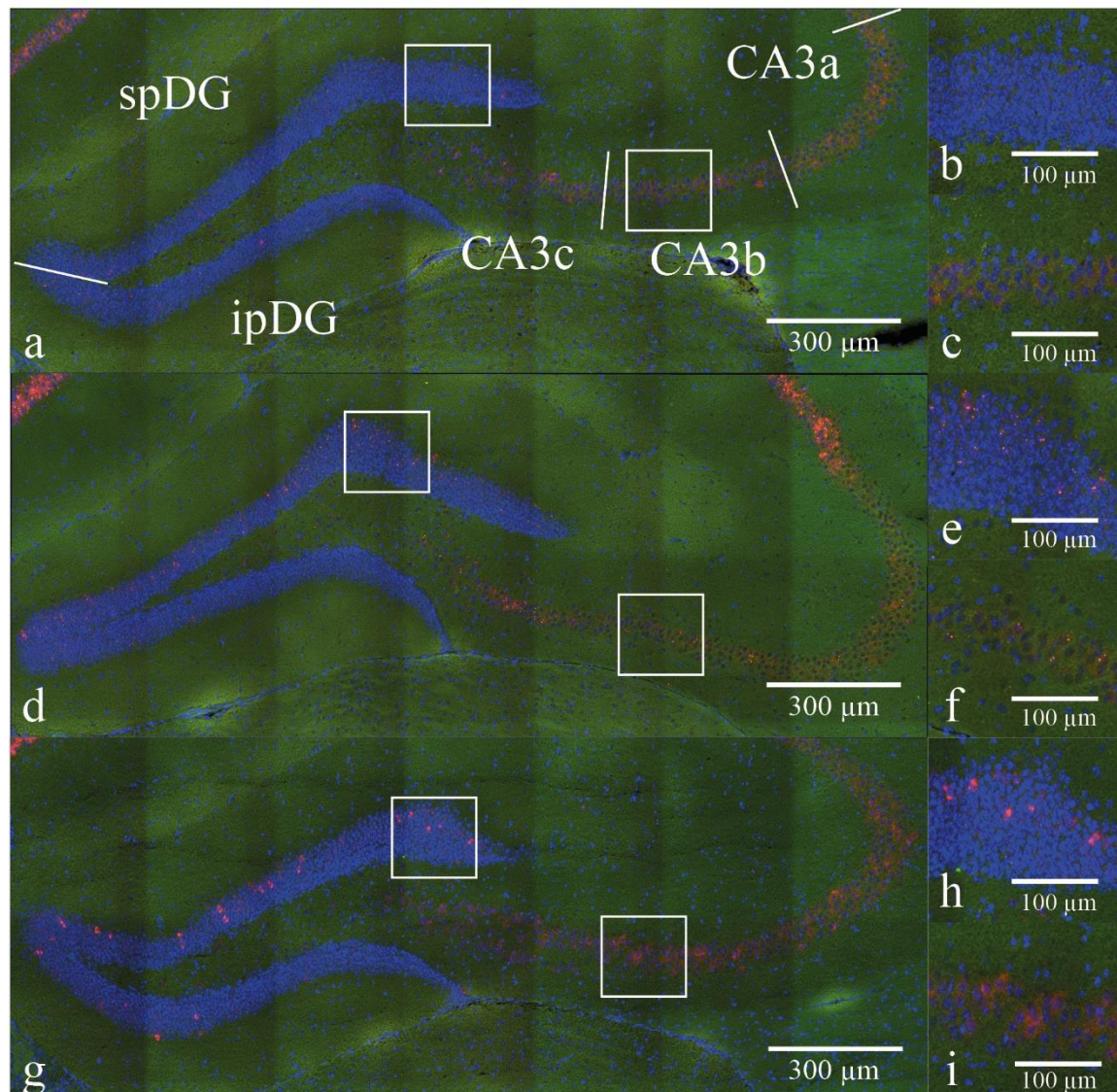
### **3.4.3 Schlussfolgerungen aus der Kontrolle der Methode für die weiteren Ergebnisse**

Die Funktionalität der hier angewandten Methode als catFISH ist für diese Arbeit ein entscheidendes Kriterium und gilt als Voraussetzung für die Korrektheit der weiteren Ergebnisse. Aus diesem Grund sollen die Ergebnisse der vorangegangenen beiden Kapitel bereits an dieser Stelle diskutiert werden und damit ein Ausblick zur grundsätzlichen Interpretierbarkeit dieser geschaffen werden.

In Kapitel 1.2.6.2 wurde bereits näher ausgeführt, dass ein Nachweis der mRNA und der prä-mRNA des *zif268/egr-1*-Gens bereits wenige Minuten nach lernassoziierten Gedächtnisaktivität möglich sein soll. Zusätzlich sollen Transportvorgänge einsetzen, welche die mRNA in das Zytoplasma transportieren, wo sie nach einer Zeit von ca. 30 Minuten abgrenzbar sein soll (Guzowski et al., 1999). Ebenso soll es zu einer raschen Prozessierung der prä-mRNA innerhalb weniger Minuten kommen (Horn, 2018, S. 290ff). Zu dem Zeitpunkt 30 Minuten nach Exposition soll die Transkription bereits wieder sistiert haben, wodurch nukleär kein Nachweis von mRNA oder prä-mRNA mehr möglich sein soll. Diese Vorgänge sind in den hier aufgeführten Ergebnissen hervorragend abzugrenzen (Abbildung 13; Abbildung 14). So war in der Gruppe A5 ein signifikanter Anstieg des Anteils an Zellen mit nukleärem Signal zu erkennen, welcher 30 Minuten später in der Gruppe A30 nicht mehr nachzuweisen war. Dies bestätigt den Transport beziehungsweise die nukleäre Prozessierung von prä-mRNA und mRNA. Eine prolongierte Transkription wie bei Arc ist an dieser Stelle demzufolge auszuschließen (Ramirez-Amaya et al., 2013). Der regelrechte und zeitabhängige Transport der mRNA in das Zytoplasma wird ebenfalls durch den signifikanten Anstieg des Anteils an Zellen mit zytoplasmatischem Signal in der Gruppe A30 bestätigt. Ein verfrühter Transport von dieser ins Zytoplasma ist dabei aufgrund eines nicht vorhandenen signifikanten Unterschieds im Anteil an Zellen mit zytoplasmatischem Signal zwischen den Gruppen hc und A5 auszuschließen. Eine regelrechte Nutzung der hier verwendeten Methode zur catFISH ist demzufolge gewährleistet und von einer Korrektheit der nachfolgenden Ergebnisse kann grundsätzlich ausgegangen werden.

Zusätzlich sei an dieser Stelle anzumerken, dass für den DG ein deutlich höherer Anteil an Zellen mit nukleärem Signal bei der Gruppe A5 registriert werden konnte als an Zellen mit zytoplasmatischem Signal bei der Gruppe A30 (DG:  $p = 0,0027$ ; CA3:  $p = 0,0174$ ). Hier wäre zu erwarten, dass diese Werte nicht voneinander abweichen, da die nukleäre mRNA ins Zytoplasma transportiert wird und bei gleich vielen Zellen ein späteres zytoplasmatisches

Signal zu detektieren sein müsste, wie es zuvor bei nukleären Zellen zu registrieren war. Auf diesen Aspekt soll jedoch an einem späteren Zeitpunkt in Kapitel 4.1.1 näher eingegangen werden, wenn auch die Ergebnisse der weiteren Gruppen vorgestellt wurden.



**Abbildung 14 Exemplarische Aufnahmen der Kontrollgruppen**

(a), (d) und (g) zeigen exemplarische Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie nach durchgeführter Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Dargestellt ist jeweils ein mittlerer Schnitt durch die rechtsseitige Hippocampusformation von Mäusen der Gruppe hc (a-c), der Gruppe A5 (d-f) und der Gruppe A30 (g-i). Exemplarische Beschriftung der Subregionen des Gyrus dentatus (DG) und des Cornu ammonis 3 (CA3) in (a). Die weißen Linien in (a) markieren jeweils die Grenzen zwischen den einzelnen Subregionen. Die weißen Boxen markieren die Ausschnitte für (b), (c), (e), (f), (h) und (i). (b), (e) und (h) stellen vergrößerte Ausschnitte aus dem suprapyramidalen Gyrus dentatus (spDG) dar. (c), (f) und (i) sind vergrößerte Ausschnitte aus der Subregion des Cornu ammonis 3 b (CA3b). Die Signale der Sonde zif268 sind in Rot und diejenigen der Sonde egr-1 in Grün dargestellt. Zellkerne sind nach Markierung mittels Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in Blau abgebildet. Zu sehen sind nur vereinzelte nukleäre und zytoplasmatische Signale in (a-c), deutlich vermehrte nukleäre Signale in der Gruppe A5 (d-f) bei weitgehend fehlenden zytoplasmatischen Signalen sowie deutlich vermehrte zytoplasmatische Signale in der Gruppe A30 (g-i) bei hier weitgehend fehlenden nukleären Signalen.

spDG: suprapyramidaler Gyrus dentatus; ipDG: infrapyramidaler Gyrus dentatus; CA3c: Cornu ammonis 3 c; CA3b: Cornu ammonis 3 b; CA3a: Cornu ammonis 3 a

## **3.5 Verhältnisse der neuronalen Aktivität im Vergleich zweier konstanter oder differenter Kontexte**

### **3.5.1 Einfluss der wiederholten Erkundung einer Umgebung auf die Rekrutierung von Neuronen**

Die Mäuse der Gruppe AA wurden mit einem Abstand von 25 Minuten wiederholt dem Kontext A ausgesetzt. Die Auswertung der Anteile an Zellen, welche ein nukleäres Signal aufwiesen, und die der Anteile an Zellen, welche ein zytoplasmatisches Signal aufwiesen, führte hierbei zu sehr ähnlichen Größen der aktivierten Neuronenensembles (Abbildung 15a). Bei Betrachtung der gesamten Region des DG und des gesamten CA3 waren keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Anteile nukleär und zytoplasmatisch aktivierter Zellen zu finden ( $F(1, 12) = 1,006$ ;  $p = 0,3358$ ). Im DG wurden im Mittel  $1,49\% \pm 0,49\%$  SD der Zellen bei einer ersten Erkundung des Kontextes A rekrutiert, während bei der zweiten Expositionsphase im Mittel  $1,61\% \pm 0,43\%$  SD der Zellen aktiviert wurden. Im CA3 fielen die Neuronenensembles etwas größer aus. Hier wurden bei der ersten Erkundung im Mittel  $5,53\% \pm 2,13\%$  SD der Neurone rekrutiert. Bei wiederholter Erkundung ergab sich ein Anteil von  $6,63\% \pm 0,98\%$  SD.

Auch eine Betrachtung der Subregionen des DG und vom CA3 erbrachte ähnliche Ergebnisse (Abbildung 15b). In keiner der Subregionen wurden signifikante Unterschiede registriert ( $F(1, 30) = 3,32$ ;  $p = 0,0784$ ). Im CA3c und CA3b war lediglich ein leichter Trend zu einem etwas höheren Anteil an Zellen zu vernehmen, welche in der zweiten Expositionsphase aktiviert wurden. Exemplarisch lag der Mittelwert des im ersten Kontext aktivierten Anteils an Zellen im CA3c bei  $4,23\% \pm 1,57\%$  SD und bei  $6,12\% \pm 0,96\%$  SD im zweiten Kontext.

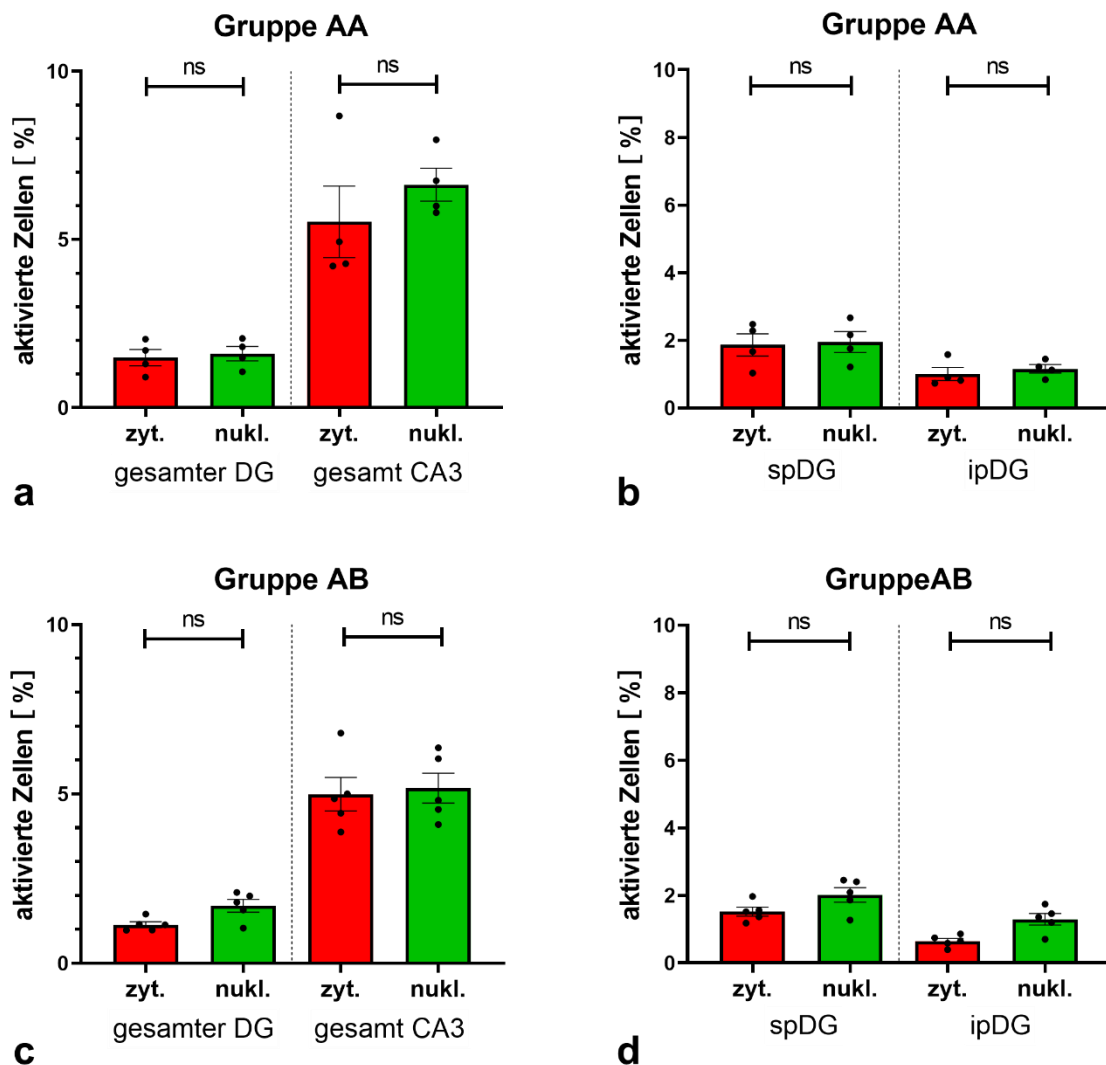
### **3.5.2 Einfluss der Erkundung von unterschiedlichen Umgebungen auf die Rekrutierung von Neuronen**

Ebenso wie bei der Gruppe AA lag bei der Gruppe AB im DG und CA3 ein ähnlicher Anteil an aktivierten Zellen für die Erkundung des ersten und des zweiten Kontextes vor, obwohl bei letzterer die Exposition gegenüber einer neuen Umgebung stattgefunden hatte (Abbildung 15c). Während im DG noch eine Tendenz zu einer leicht höheren Zellaktivität bei der Erkundung des Kontextes B im Vergleich zu der von Kontext A zu erkennen war, lag in CA3 bei einem Mittelwert des Anteils aktivierter Neurone von  $4,99\% \pm 1,10\%$  SD in Kontext A und von  $5,17\% \pm 0,98\%$  SD in Kontext B kein nennenswerter Unterschied vor. In beiden



Regionen blieben die Ergebnisse ohne Signifikanz ( $F(1, 16) = 1,146$ ;  $p = 0,3004$ ). Eine vergleichbare Situation lag auch für alle Subregionen des DG und des CA3 vor ( $F(1, 40) = 1,725$ ;  $p = 0,1966$ ).

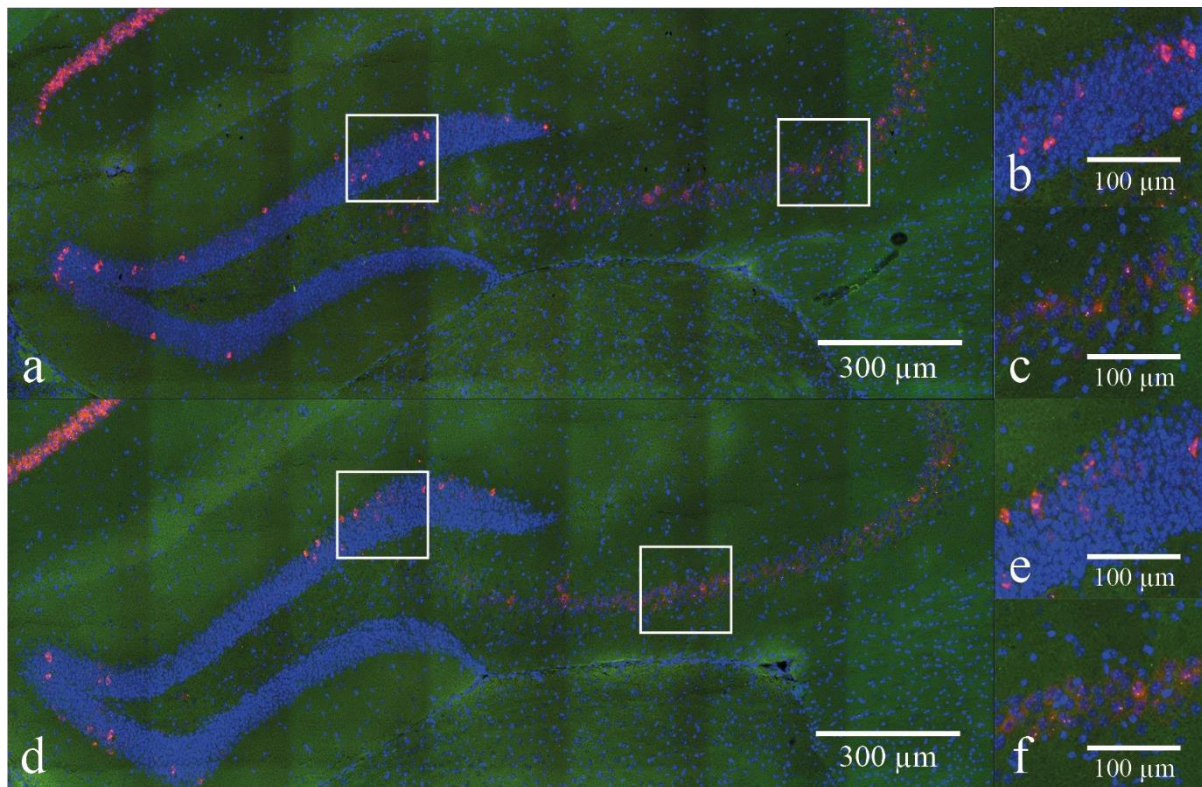
Der im DG beobachtete Trend zu einer leicht höheren Zellaktivität bei Erkundung des Kontextes B konnte aufgeteilt nach seinen Subregionen vor allem im ipDG registriert werden (Abbildung 15d). Hier wurden in Kontext A im Mittel  $0,65\% \pm 0,17\%$  SD der Neurone aktiviert, während in Kontext B  $1,29\% \pm 0,38\%$  SD rekrutiert wurden. Für den spDG war dieser Trend nur dezent vorhanden. Exemplarische Beispiele der Signalausprägung in den Gruppen AA und AB sind in Abbildung 16 dargestellt.



**Abbildung 15 Vergleich der Zellaktivierungen innerhalb von AA und AB**

Dargestellt sind die Ergebnisse für die Anteile aktivierter Neurone im gesamten DG und im gesamten CA3 für die Gruppe AA (a) und die Gruppe AB (c) sowie die Anteile aktivierter Neurone im spDG und ipDG für die Gruppe AA (b) und die Gruppe AB (d).

Aufgeführt ist für jede Region der Vergleich zwischen dem Anteil an Neuronen mit nukleärem Signal und dem mit zytoplasmatischem Signal. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. DG: Gyrus dentatus; CA3: Cornu ammonis 3; spDG: suprapyramidaler Gyrus dentatus; ipDG: infrapyramidaler Gyrus dentatus; ns: nicht signifikant



**Abbildung 16 Exemplarische Aufnahmen der Versuchsgruppen AA und AB**

(a) und (d) zeigen exemplarische Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie nach durchgeführter Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Dargestellt ist jeweils ein mittlerer Schnitt durch die rechtsseitige Hippocampusformation von Mäusen der Gruppe AA (a) und der Gruppe AB (d). Die weißen Boxen markieren die Ausschnitte für (b), (c), (e) und (f). (b) und (e) stellen vergrößerte Ausschnitte aus dem suprapyramidalen Gyrus dentatus (spDG) dar. (c) und (f) sind vergrößerte Ausschnitte aus der Subregion des Cornu ammonis 3 b (CA3b). Die Signale der Sonde zif268 sind in Rot und diejenigen der Sonde egr-1 in Grün dargestellt. Zellkerne sind nach Markierung mittels Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in Blau abgebildet. Zu sehen sind zahlreiche Zellen mit gleichzeitiger nukleärer und zytoplasmatischer Signalausprägung sowie einzelne Zellen mit nur nukleären oder zytoplasmatischen Signalen. Die Zellen mit gleichzeitiger Ausprägung beider Signalarten überwiegen hierbei leicht in der Gruppe AA (a-c) im Vergleich zur Gruppe AB (d-f).

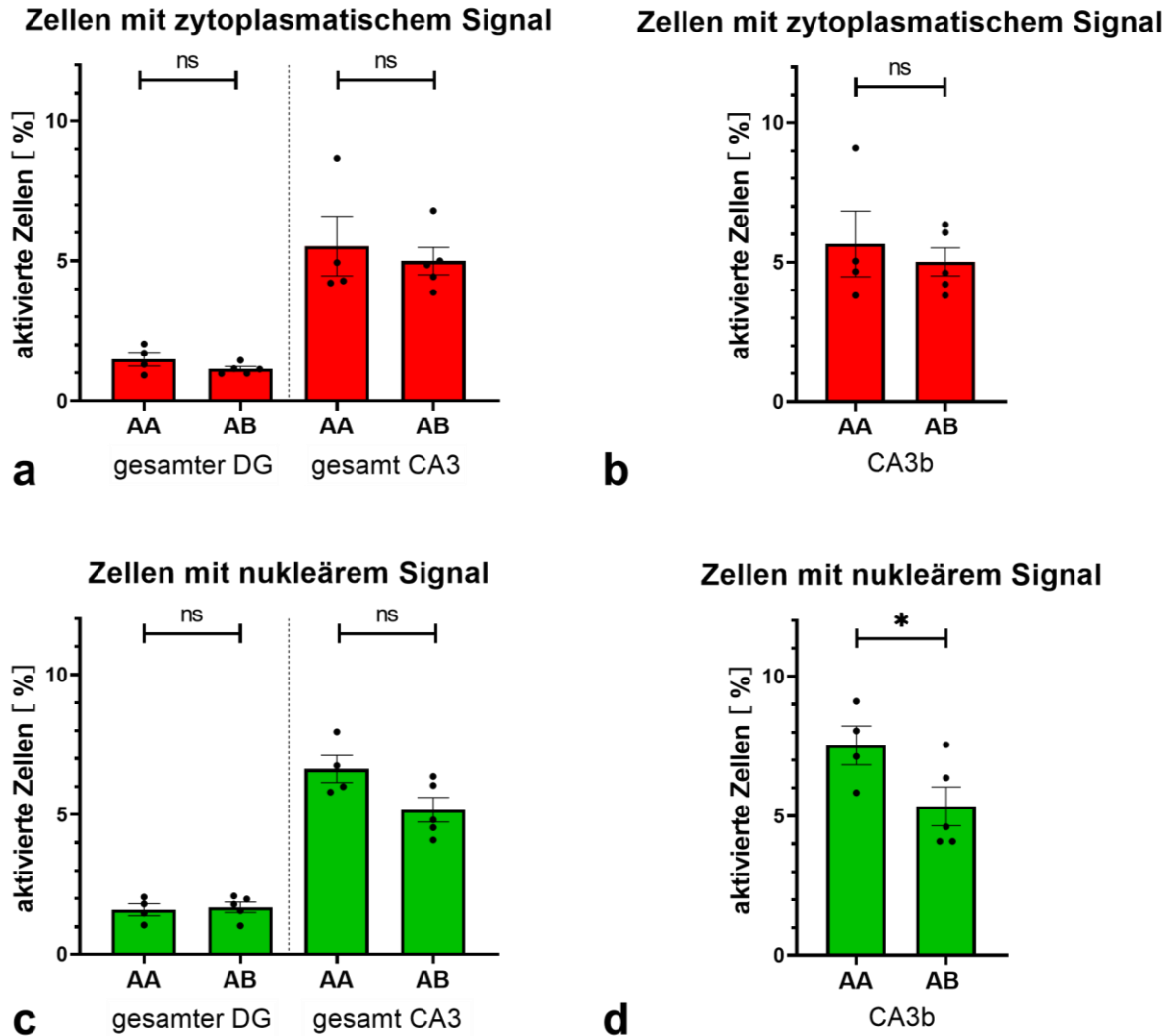
## **3.6 Anteile aktivierter Neurone im Vergleich zwischen Gruppe AA und Gruppe AB**

### **3.6.1 Rekrutierung von Neuronen bei erster Erkundung von Kontext A**

Die Neurone, welche bei der Erkundung des ersten Kontextes aktiviert wurden, wurden sowohl in Gruppe AA als auch in Gruppe AB durch das Vorhandensein zytoplasmatischer Signale charakterisiert. Wurden diese Anteile demzufolge zwischen beiden Gruppen verglichen, so ließen sich weder für den DG noch für das CA3 signifikante Unterschiede registrieren ( $F(1, 14) = 0,6375$ ;  $p = 0,4380$ ; Abbildung 17a). Für den DG ergaben sich Mittelwerte von  $1,49\% \pm 0,49\%$  SD für die Gruppe AA und  $1,14\% \pm 0,19\%$  SD für die Gruppe AB. Für das CA3 lagen diese bei  $5,53\% \pm 2,13\%$  SD (Gruppe AA) und bei  $4,99\% \pm 1,10\%$  SD (Gruppe AB). Auch der Vergleich bei Unterteilung in die einzelnen Subregionen des DG sowie des CA3 ergab keine signifikanten Unterschiede (DG:  $F(1, 14) = 3,506$ ;  $p = 0,0822$ ; CA3:  $F(1, 21) = 0,5869$ ;  $p = 0,4521$ ; exemplarisch Abbildung 17b).

### **3.6.2 Rekrutierung von Neuronen in der zweiten Expositionsphase**

Für die Neurone, welche bei der Erkundung des zweiten Kontextes rekrutiert wurden, lag eine Charakterisierung durch eine nukleäre Signalausprägung vor. Wurden die Anteile dieser Neurone zwischen den Gruppen AA und AB verglichen, so lagen erneut weder signifikante Unterschiede für den gesamten DG vor noch für das gesamte CA3 ( $F(1, 14) = 3,632$ ;  $p = 0,0774$ ; Abbildung 17c). Im DG sind  $1,61\% \pm 0,43\%$  SD der Zellen von Gruppe AA aktiviert worden sowie  $1,70\% \pm 0,42\%$  SD dieser von Gruppe AB. Für das CA3 lagen die entsprechenden Werte bei  $6,63\% \pm 0,98\%$  SD für Gruppe AA sowie bei  $5,17\% \pm 0,98\%$  SD für Gruppe AB. Bei dem zuletzt genannten Vergleich zeigen die Ergebnisse von Gruppe AA dabei einen leichten Trend zu einer vermehrten Aktivierung von Zellen bei erneuter Erkundung eines bekannten Kontextes. Dieser Trend entwickelte sich dabei zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen im CA3b ( $F(1, 21) = 11,00$ ;  $p = 0,0033$ ; CA3b: AA vs. AB:  $p = 0,0363$ ), wenn weiter zwischen den Subregionen differenziert wurde. Es lag hier eine Aktivierung von  $7,53\% \pm 1,39\%$  SD der Neurone im CA3b der Gruppe AA vor, während nur  $5,34\% \pm 1,55\%$  SD der Neurone der Gruppe AB im entsprechenden Bereich aktiviert wurden (Abbildung 17d). Bei allen weiteren Subregionen vom CA3 ( $p > 0,05$  für das CA3c und CA3a) und des DG ( $F(1, 14) = 0,2314$ ;  $p = 0,6380$ ) lagen ansonsten keine weiteren signifikanten Unterschiede vor.



**Abbildung 17 Vergleich der rekrutierten Neurone im ersten und zweiten Kontext**

Rekrutierte Neurone im gesamten DG und im gesamten CA3 während der Erkundung des ersten (a) und des zweiten Kontextes (c). Exemplarisch dargestellt ist außerdem der Anteil an rekrutierten Neuronen im CA3b während der Erkundung des ersten (b) und des zweiten Kontextes (d).

Aufgeführt ist für jede Region der Vergleich zwischen der Gruppe AA und der Gruppe AB. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. DG: Gyrus dentatus; CA3: Cornu ammonis 3; CA3b: Cornu ammonis 3 b; ns: nicht signifikant; \*:  $p \leq 0,05$

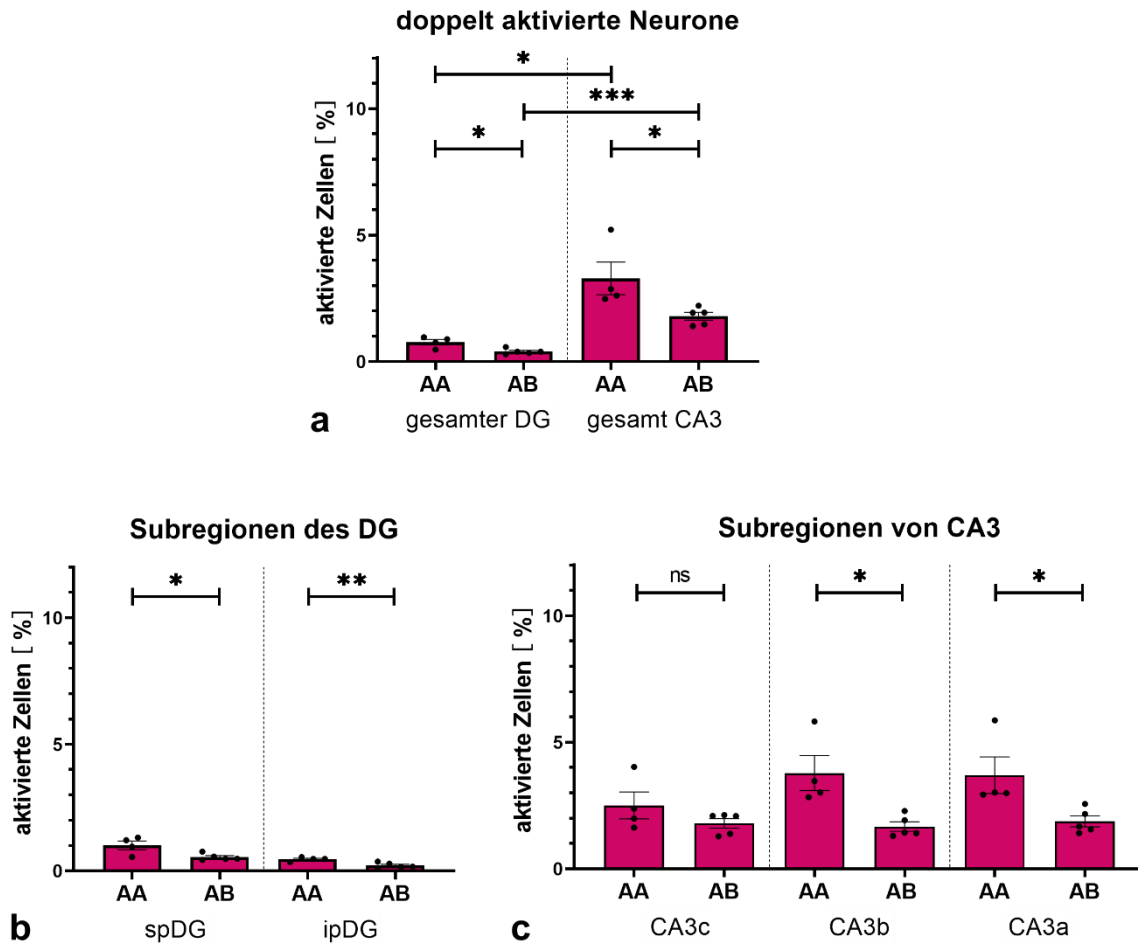
### **3.6.3 Einfluss der Reexploration eines Kontextes und der Erkundung zweier verschiedener Kontexte auf die wiederholte Aktivierung von Neuronen**

Neurone, welche in beiden Kontexten aktiviert wurden, stellten sich mit einer nukleären und einer gleichzeitigen zytoplasmatischen Signalausprägung dar. Hierbei war eine signifikant breitere Reaktivierung von Neuronen in der Gruppe AA im Vergleich zur Gruppe AB im DG zu detektieren ( $F(1, 14) = 9,607$ ;  $p = 0,0078$ ; AA vs. AB im DG:  $p = 0,0115$ ) (Abbildung 18a). Aufgeteilt in seine Subregionen ( $F(1, 14) = 16,39$ ;  $p = 0,0012$ ) lag dieser signifikante Unterschied sowohl im spDG ( $p = 0,0246$ ) als auch im ipDG ( $p = 0,0077$ ) vor (Abbildung 18b). Bei einem Anteil doppelt aktivierter Zellen im spDG von  $1,01\% \pm 0,34\%$  SD bei Gruppe AA und einem Anteil von  $0,54\% \pm 0,13\%$  SD in der Gruppe AB war der Unterschied hierbei im spDG im Mittel etwas größer als im ipDG. Im letzteren lagen die Anteile bei  $0,46\% \pm 0,08\%$  SD (AA) und bei  $0,21\% \pm 0,11\%$  SD (AB).

Im CA3 lag eine ähnliche Situation wie im DG vor. Auch für das gesamte CA3 ließ sich eine Reaktivierung eines signifikant größeren Anteils an Neuronen bei Mäusen der Gruppe AA abgrenzen als bei jenen der Gruppe AB ( $F(1, 14) = 9,607$ ;  $p = 0,0078$ ; AA vs. AB im CA3:  $p = 0,0159$ ). Nach Aufteilung vom CA3 konnte dieser Unterschied sowohl für das CA3b als auch für das CA3a nachgewiesen werden ( $F(1, 21) = 18,98$ ;  $p = 0,0003$ ; AA vs. AB: CA3b:  $p = 0,0134$ ; CA3a:  $p = 0,0159$ ; Abbildung 18c). Im CA3c lag hingegen kein signifikanter Unterschied vor. Hier zeigte sich lediglich ein leichter Trend zu einem größeren Anteil doppelt aktivierter Neurone für Gruppe AA. Die Unterschiede zwischen Gruppe AA und Gruppe AB waren für das CA3b und das CA3a in diesem Rahmen annähernd gleich. Für das CA3b ergab sich ein Anteil von  $3,78\% \pm 1,39\%$  SD für Gruppe AA sowie ein Anteil von  $1,67\% \pm 0,42\%$  SD für Gruppe AB. Im CA3a lagen diese Anteile bei  $3,70\% \pm 1,44\%$  SD für AA und bei  $1,87\% \pm 0,48\%$  SD bei AB.

Im Vergleich vom DG mit dem CA3 war außerdem anzumerken, dass im CA3 signifikant mehr Zellen reaktiviert wurden als im DG (Abbildung 18a). Dieser Sachverhalt traf sowohl für die Gruppe AA ( $p = 0,0256$ ) als auch für die Gruppe AB ( $p = 0,0003$ ) zu. Der Unterschied lag hier bei  $3,29\% \pm 1,29\%$  SD im CA3 zu  $0,77\% \pm 0,22\%$  SD im DG (Gruppe AA) sowie bei  $1,79\% \pm 0,34\%$  SD im CA3 zu  $0,40\% \pm 0,11\%$  SD im DG (Gruppe AB). Dies entspricht einem Verhältnis reaktiverter Zellen vom CA3 zum DG von mehr als 4 zu 1.

Zusammengefasst zeigte damit ein deutlich größerer Anteil der Neurone des DG und des CA3 bei Mäusen der Gruppe AA Zeichen einer Reaktivierung als bei der Gruppe AB. Eine Ausnahme stellte hierbei lediglich die Subregion des CA3c dar, für die keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten. Gleichzeitig wurden im CA3 deutlich mehr Neurone in beiden Kontexten aktiviert als im DG.



**Abbildung 18 Doppelt rekrutierte Neurone**

(a) Wiederholt rekrutierte Neurone im gesamten DG und im gesamten CA3 mit Vergleich zwischen den Gruppen AA und AB sowie mit Vergleich innerhalb der jeweiligen Gruppe zwischen dem DG und dem CA3. (b) Wiederholt rekrutierte Neurone im spDG und ipDG (b) sowie im CA3c, CA3b und CA3a (c) mit Vergleich zwischen den Gruppen AA und AB.

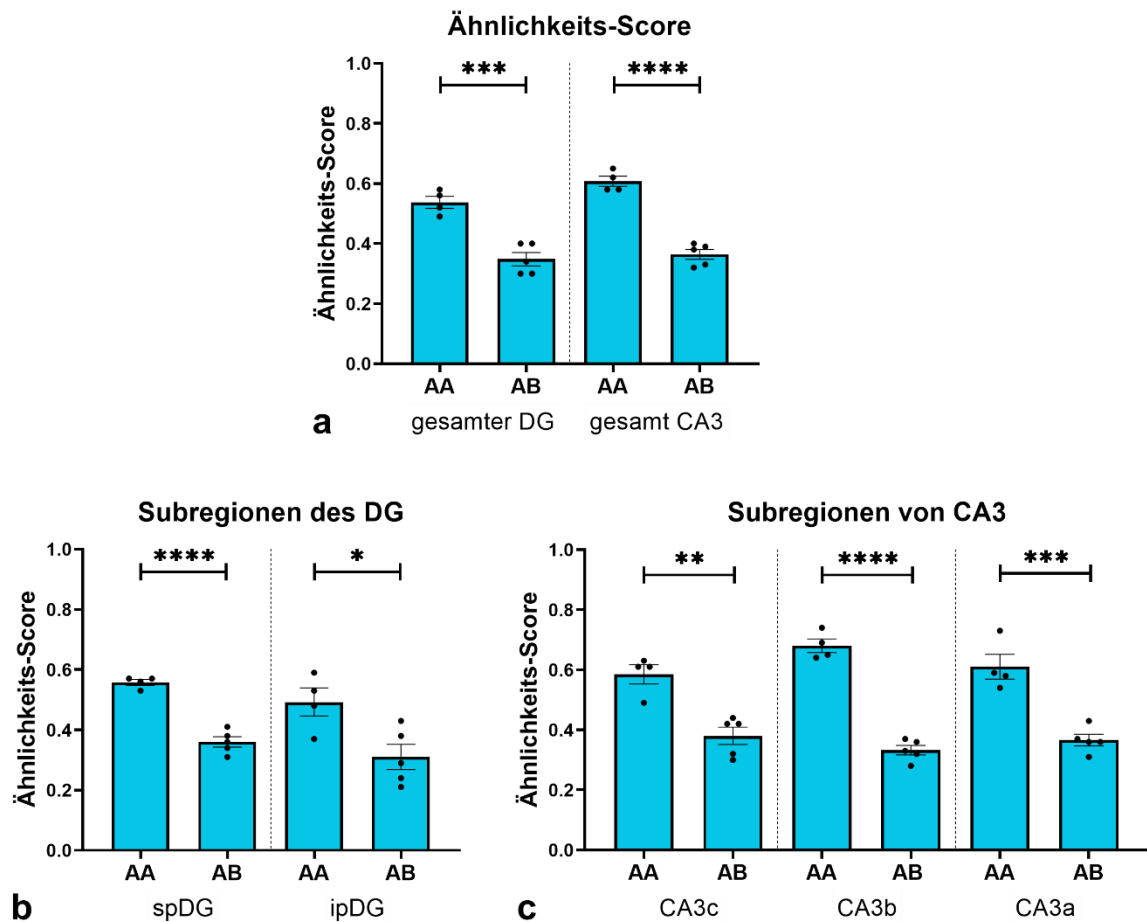
Aufgeführt ist für jede Region der Vergleich zwischen der Gruppe AA und der Gruppe AB. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. DG: Gyrus dentatus; spDG: suprapyramidaler Gyrus dentatus; ipDG: infrapyramidaler Gyrus dentatus; CA3: Cornu ammonis 3; CA3a: Cornu ammonis 3 a; ns: nicht signifikant; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,0005$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$

### **3.6.4 Einfluss der Reexploration eines Kontextes und der Erkundung zweier verschiedener Kontexte auf den Ähnlichkeits-Score und die Reaktivierungsraten**

Der Ähnlichkeits-Score setzte die Anteile an doppelt aktivierten Zellen mit den Anteilen insgesamt aktivierter Neuronen ins Verhältnis. Eine vollständige Reaktivierung aller in einem Kontext aktivierten Neurone entspricht einem Ähnlichkeits-Score von 1,0. Zwei komplett unterschiedliche Neuronensembles werden durch einen Ähnlichkeits-Score von 0,0 beschrieben.

Der Ähnlichkeits-Score präsentierte ein sehr einheitliches Bild für alle Subregionen des DG und des CA3 (Abbildung 19). Bereits bei der Auswertung des gesamten DG und des gesamten CA3 lagen signifikant höhere Ähnlichkeits-Scores für die Gruppe AA im Vergleich zu AB vor ( $F(1, 14) = 122,8$ ;  $p < 0,0001$ ). Für den DG lag dieser bei  $0,54 \pm 0,04$  SD für die Gruppe AA sowie bei  $0,35 \pm 0,05$  SD für die Gruppe AB bei  $p = 0,0005$ . Im CA3 war für Gruppe AA ein Ähnlichkeits-Score von  $0,61 \pm 0,03$  SD zu finden, während dieser für die Gruppe AB bei  $0,36 \pm 0,04$  SD lag. Der p-Wert betrug hier weniger als 0,0001. Derartige Unterschiede traten sowohl für den spDG und den ipDG ( $F(1, 14) = 33,25$ ;  $p < 0,0001$ ; spDG:  $p < 0,0001$ ; ipDG:  $p = 0,0223$ ) als auch für das CA3c, CA3b und CA3a auf ( $F(1, 21) = 144,7$ ;  $p < 0,0001$ ; CA3c:  $p = 0,0079$ ; CA3b:  $p < 0,0001$ ; CA3a:  $p = 0,0007$ ). Ein Maximum erreichte der Score dabei im CA3b mit bis zu 0,68.

Vergleichbare Ergebnisse ergab eine Auswertung der RR 1 und 2. Bei einer stärkeren Aussagekraft des Ähnlichkeits-Scores und dessen bereits etablierter Anwendung in der Literatur, sollen die Ergebnisse der Reaktivierungsraten hier jedoch nicht näher ausgeführt werden und können dem Anhang entnommen werden (Abbildung 30). Hervorzuheben sei lediglich, dass keine signifikant höhere RR 2 für die Gruppe AA im Vergleich zu Gruppe AB in der Subregion CA3c nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz hierzu war die RR 2 für alle anderen Subregionen für die Gruppe AA signifikant höher als in für Gruppe AB, ebenso wie die RR 1 für alle Subregionen des DG und des CA3.



**Abbildung 19 Ähnlichkeits-Score**

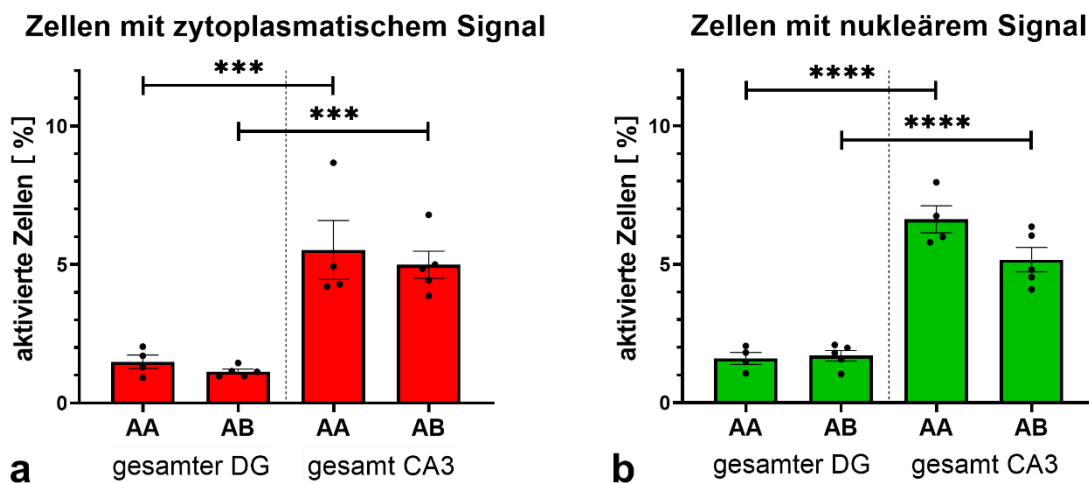
Dargestellt ist der Ähnlichkeits-Score für den gesamten DG und für das gesamte CA3 mit Vergleich zwischen den Gruppen AA und AB in (a). Die Darstellung des Ähnlichkeits-Scores für den spDG und ipDG mit Vergleich zwischen den Gruppen AA und AB erfolgte in (b) sowie für das CA3c, CA3b und CA3a in (c).

Aufgeführt ist für jede Region der Vergleich zwischen der Gruppe AA und der Gruppe AB. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. DG: Gyrus dentatus; spDG: suprapyramidaler Gyrus dentatus; ipDG: infrapyramidaler Gyrus dentatus; CA3: Cornu ammonis 3; CA3c: Cornu ammonis 3 c; CA3b: Cornu ammonis 3 b; CA3a: Cornu ammonis 3 a; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,0005$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$



### 3.7 Vergleich der neuronalen Aktivität zwischen dem DG und dem CA3

Wie es in Kapitel 3.6.3 bereits für den Anteil an doppelt aktivierten Neuronen aufgeführt wurde, soll an dieser Stelle nochmals der Blick auf die Verhältnisse zwischen dem Anteil aktivierter Zellen im DG und dem CA3 gelegt werden. In Abbildung 17 fallen deutlich höhere Werte für den Anteil an Zellen mit nukleärer als auch für den Anteil an Zellen mit zytoplasmatischer Signalausprägung im CA3 verglichen mit dem DG auf. Ein statistischer Vergleich dieser Anteile zeigte, dass im CA3 ein signifikant größerer Anteil an Zellen aktiviert wurde als im DG (Abbildung 20). Dies galt sowohl für den Anteil an Zellen mit zytoplasmatischem Signal (AA:  $p = 0,0005$ ; AB:  $p = 0,0003$ ) als auch für den Anteil an Zellen mit nukleärem Signal (AA:  $p < 0,0001$ ; AB:  $p < 0,0001$ ). Zytoplasmatische Signale wurden im DG im Mittel bei  $1,49\% \pm 0,49\%$  SD der Neurone von Gruppe AA und bei  $1,14\% \pm 0,19\%$  SD der Neurone von Gruppe AB detektiert, wohingegen dies im CA3  $5,52\% \pm 2,13\%$  SD in Gruppe AA und  $4,99\% \pm 1,10\%$  SD in der Gruppe AB waren. Nukleäre Signale wurden im DG im Mittel bei  $1,61\% \pm 0,43\%$  SD der Neurone der Gruppe AA und bei  $1,70\% \pm 0,42\%$  SD der von Gruppe AB detektiert, wohingegen diese im CA3 bei  $6,63\% \pm 0,98\%$  SD in der Gruppe AA und bei  $5,17\% \pm 0,98\%$  SD in der Gruppe AB registriert wurden. Zusammengefasst wurde somit unabhängig vom Kontext ein größerer Teil der Neurone des CA3 aktiviert als dies im DG der Fall war.

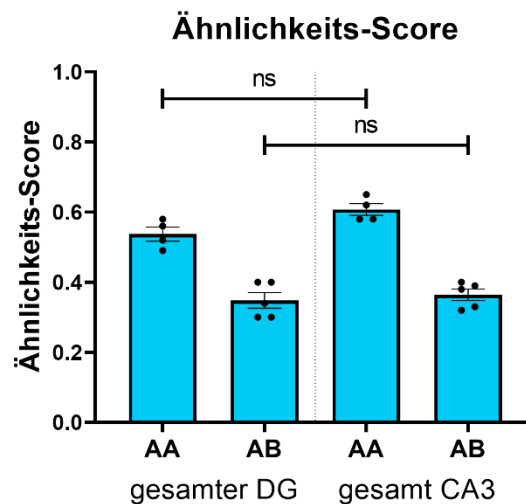


**Abbildung 20 Vergleich der neuronalen Aktivität zwischen dem DG und dem CA3**

Rekrutierte Neurone im gesamten DG und im gesamten CA3 während der Erkundung des ersten (a) und des zweiten Kontextes (b).

Aufgeführt ist innerhalb jeder Gruppe der Vergleich zwischen dem DG und dem CA3. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. DG: Gyrus dentatus; CA3: Cornu ammonis 3; \*\*\*:  $p \leq 0,0005$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$

Ein Vergleich des Ähnlichkeits-Scores zwischen dem gesamten DG und dem gesamten CA3 innerhalb beider Gruppen erbrachte keine signifikanten Unterschiede ( $F(1, 14) = 4,844$ ;  $p = 0,0450$ ; DG vs. CA3 für AA und AB jeweils  $p > 0,05$ ), wobei innerhalb der Gruppe AA das Signifikanzniveau nur knapp verfehlt wurde ( $p = 0,0613$ ). Der Ähnlichkeits-Score für die Gruppe AA lag hierbei im DG bei  $0,53 \pm 0,04$  SD sowie im CA3 bei  $0,61 \pm 0,03$  SD (Abbildung 21).



**Abbildung 21 Vergleich des Ähnlichkeits-Scores zwischen dem DG und dem CA3**

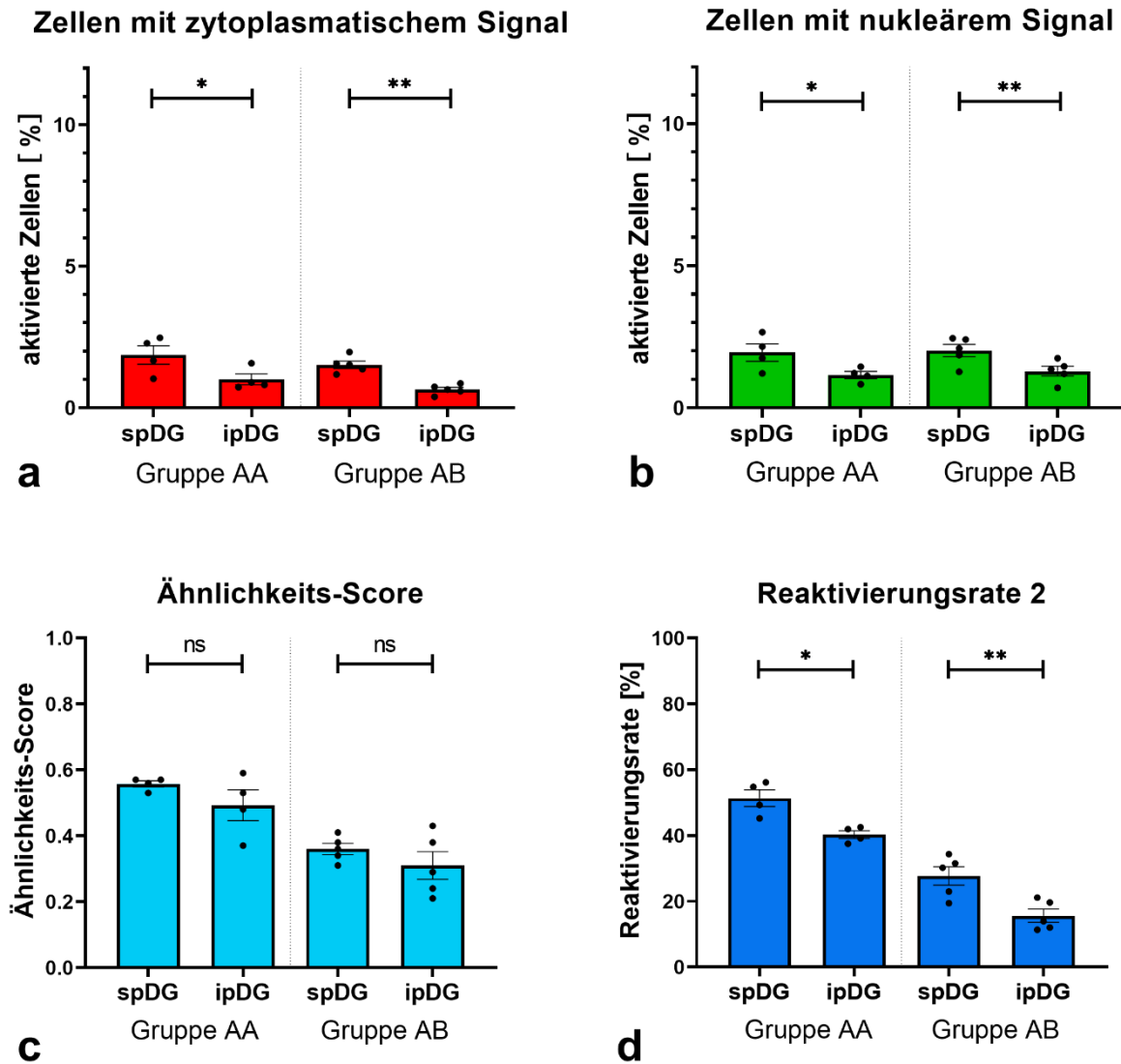
Ähnlichkeits-Score für den gesamten Gyrus dentatus (DG) und die Region des gesamten Cornu ammonis 3 (CA3) für die Gruppen AA und AB mit jeweiligem Vergleich des Ähnlichkeits-Scores zwischen beiden Regionen innerhalb der Gruppen.

Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. ns: nicht signifikant

### 3.8 Vergleich der neuronalen Aktivität zwischen dem spDG und dem ipDG

Bei Betrachtung der neuronalen Aktivität innerhalb des DG fielen markante Unterschiede zwischen dem spDG und dem ipDG auf. Sowohl innerhalb der Gruppe AA als auch in der Gruppe AB wurden bei Erkundung des ersten Kontextes signifikant mehr Zellen im spDG aktiviert als im ipDG ( $F(1, 14) = 21,23$ ;  $p = 0,0004$ ; AA:  $p = 0,0300$ ; AB:  $p = 0,0017$ ). Hier war bei durchschnittlich  $1,86 \pm 0,65$  % der Neurone des spDG in AA und bei  $1,52 \pm 0,39$  % in AB ein zytoplasmatisches Signal zu detektieren, während dies im ipDG lediglich  $1,01 \pm 0,39$  % in der Gruppe AA und nur  $0,65 \pm 0,17$  % in der Gruppe AB waren (Abbildung 22a). Entsprechend verhielt es sich bei der Erkundung des zweiten Kontextes (Abbildung 22b). Auch hier konnten mit  $1,95 \pm 0,61$  % der Neurone des spDG der Gruppe AA und mit  $2,02 \pm 0,48$  % der Neurone des spDG der Gruppe AB signifikant mehr Zellen mit nukleärem Signal registriert werden als im jeweiligen ipDG ( $F(1, 14) = 12,55$ ;  $p = 0,0032$ ; AA:  $p = 0,0408$ ; AB:  $p = 0,0016$ ). In diesem lag die Zellaktivität nur bei  $1,16 \pm 0,25$  % für die Gruppe AA und bei  $1,29 \pm 0,38$  % für die Gruppe AB.

Wurde nicht nur die Zellaktivität verglichen, sondern auch der Ähnlichkeits-Score und die Reaktivierungsraten, so waren hier unterschiedliche Ergebnisse zu beobachten. Sowohl beim Ähnlichkeits-Score als auch bei der RR 1 konnten keine Unterschiede ausgemacht werden (Ähnlichkeits-Score:  $F(1, 14) = 3,045$ ;  $p = 0,1029$ ; RR 1:  $F(1, 14) = 3,808$ ;  $p = 0,0713$ ; exemplarisch Abbildung 22c). Ein Vergleich der RR 2 lieferte hingegen sowohl für die Gruppe AA als auch für die Gruppe AB einen deutlich höheren Anteil an reaktivierten Neuronen im spDG als im ipDG ( $F(1, 14) = 25,39$ ;  $p = 0,0002$ ; AA:  $p = 0,0120$ ; AB:  $p = 0,0029$ ; Abbildung 22d). Im spDG wurden in der Gruppe AA  $51,36 \pm 5,06$  % der Zellen, welche im zweiten Kontext aktiviert wurden, auch schon im ersten Kontext aktiviert. Im ipDG waren dies hingegen nur  $40,27 \pm 2,36$  % der Zellen. Für die Gruppe AB lagen die Werte bei  $27,70 \pm 6,23$  % im spDG und bei  $15,61 \pm 4,48$  % im ipDG.



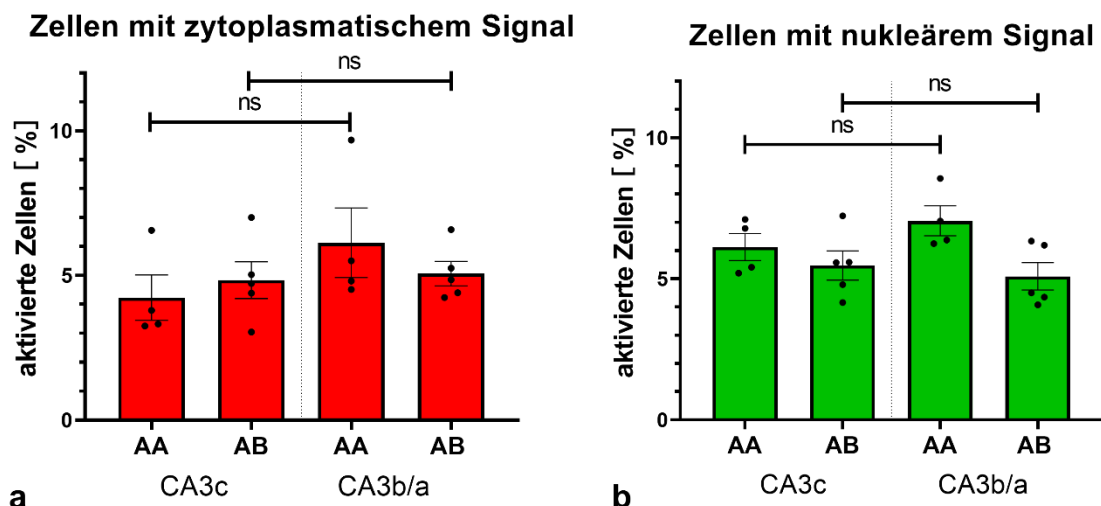
**Abbildung 22 Vergleich zwischen dem spDG und dem ipDG**

Rekrutierte Neurone im suprapyramidalen Gyrus dentatus (spDG) und im infrapyramidalen Gyrus dentatus (ipDG) der Gruppen AA und AB während der Erkundung des ersten (a) und des zweiten Kontextes (b). Aufgeführt sind außerdem der Ähnlichkeits-Score (c) und die Reaktivierungsrate 2 (d) für den spDG und den ipDG der Gruppen AA und AB.

Aufgeführt ist für jede Gruppe der Vergleich zwischen dem spDG und dem ipDG. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. ns: nicht signifikant; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,005$

### 3.9 Vergleich der neuronalen Aktivität zwischen den Subregionen des CA3

Für den Vergleich der Subregionen vom CA3 wurden die Bereiche CA3b und CA3a zusammengefasst. Diese Entscheidung basierte auf den vermuteten funktionellen Unterschieden zwischen dem CA3c auf der einen Seite und dem CA3b und CA3a auf der anderen Seite bezogen auf die Zuordnung zu Prozessen der Musterdifferenzierung sowie der Musterkomplettierung, ebenso wie der Verarbeitung lokaler oder globaler Hinweise (Kapitel 1.2.7). Entsprechend sind diese in der nachfolgenden Statistik als gemeinsamer Bereich des CA3b/a aufgeführt und werden durch die Mittelwerte beider Bereiche pro Maus repräsentiert. Bei Betrachtung der Zellaktivität während der Erkundung des ersten Kontextes fielen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Subregionen auf (Abbildung 23a). Weder innerhalb der Gruppe AA noch innerhalb der Gruppe AB waren in einer der Subregionen mehr Zellen mit zytoplasmatischem Signal zu detektieren als in der jeweils anderen ( $F(1, 14) = 1,928$ ;  $p = 0,1867$ ). Auch bei einem Vergleich der Zellaktivität während der Erkundung des zweiten Kontextes konnte keine vermehrte oder verminderte Zellaktivität in einer der Subregionen registriert werden ( $F(1, 14) = 0,2908$ ;  $p = 0,5982$ ; Abbildung 23b). Bei letzterer wurden in der Gruppe AA im Mittel  $7,05 \pm 1,06$  % SD der Zellen im CA3b/a aktiviert, während dies im CA3c  $6,12 \pm 0,96$  % SD waren, was lediglich eine leichte Tendenz zu einer höheren Aktivität im CA3b/a anzeigen könnte. Ein entsprechender Vergleich für die Gruppe AB ergab diese Tendenz hingegen nicht.

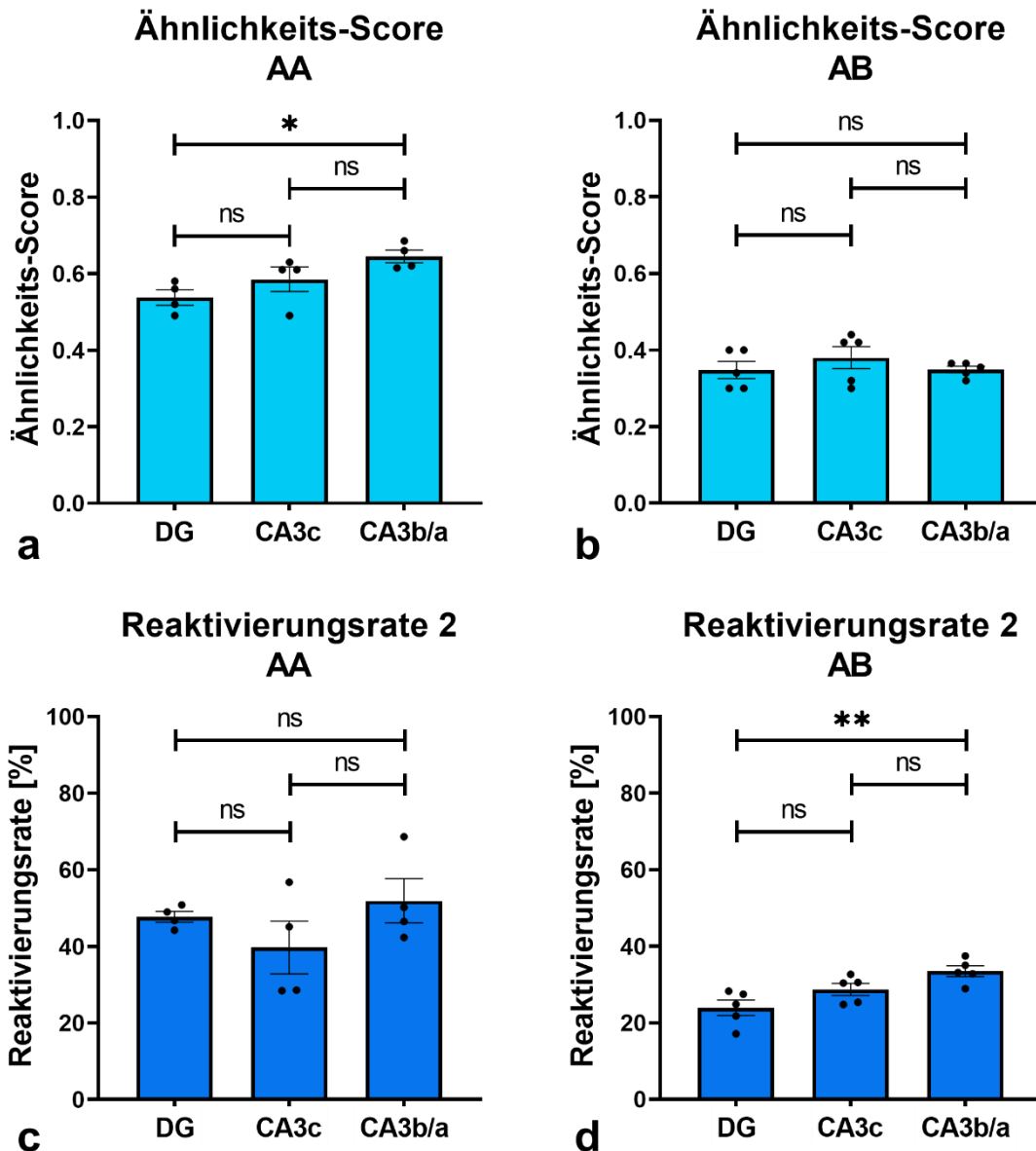


**Abbildung 23 Vergleich der Zellaktivität zwischen den Subregionen des CA3**

Rekrutierte Neurone im Cornu ammonis 3 c (CA3c) und 3 b/a (CA3b/a) der Gruppen AA und AB während der Erkundung des ersten (a) und des zweiten Kontextes (b). Aufgeführt ist innerhalb jeder Gruppe der Vergleich zwischen dem CA3c und CA3b/a. Die Darstellung erfolgte unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. ns: nicht signifikant

Der Vergleich der Ähnlichkeits-Scores sowie der Reaktivierungsraten zwischen den Subregionen erfolgte jeweils zwischen dem CA3b/a und dem CA3c sowie zwischen dem CA3b/a und dem gesamten DG beziehungsweise zwischen dem CA3c und dem gesamten DG. Wurde zunächst nur der Ähnlichkeits-Score betrachtet, so war bei diesem kein relevanter Unterschied zwischen dem CA3b/a und CA3c festzustellen ( $p > 0,05$ ; Abbildung 24a, b). Auch ein Vergleich des gesamten DG mit dem CA3c erbrachte keine markanten Differenzen ( $p > 0,05$ ). Innerhalb der Gruppe AA war jedoch ein deutlich höherer Ähnlichkeits-Score im CA3b/a wahrzunehmen als im gesamten DG ( $H_2 = 6,865$ ;  $p = 0,0197$ ; CA3b/a vs. DG:  $p = 0,0273$ ). Dieser lag im CA3b/a bei  $0,65 \pm 0,03$  SD und bei  $0,54 \pm 0,04$  SD im gesamten DG. Für die Gruppe AB war dieser Unterschied nicht zu registrieren ( $F(2, 12) = 0,7005$ ;  $p = 0,5155$ ). Die Betrachtung der RR 1 ergab insgesamt keine signifikanten Unterschiede (AA:  $H_2 = 5,115$ ;  $p = 0,0741$ ; AB:  $F(2, 12) = 0,6690$ ;  $p = 0,5303$ ).

Die Auswertung der RR 2 erbrachte hingegen ein umgekehrtes Bild bezogen auf die Gruppen (Abbildung 24c, d). Anstelle eines signifikanten Unterschiedes zwischen dem CA3b/a und dem gesamten DG innerhalb der Gruppe AA ( $F(2, 9) = 1,382$ ;  $p = 0,2997$ ) lag dieser für die Gruppe AB vor ( $F(2, 12) = 8,015$ ;  $p = 0,0062$ ; DG vs. CA3a/b:  $p = 0,0053$ ). Im CA3b/a lag die RR 2 bei  $33,45 \pm 3,16$  % SD, wohingegen sie im gesamten DG nur bei  $23,88 \pm 4,57$  % SD lag. Zwischen dem CA3c und dem gesamten DG konnten jedoch weiterhin keine Unterschiede festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 24 Vergleich des Ähnlichkeits-Scores und der Reaktivierungsrate 2 zwischen den Subregionen des CA3 und dem DG**

Ähnlichkeits-Score der Gruppe AA (a) und der Gruppe AB (b) sowie Reaktivierungsrate 2 für die Gruppe AA (c) und die Gruppe AB (d) für den Gyrus dentatus (DG), das Cornu ammonis 3 c (CA3c) und 3 b/a (CA3b/a) der Gruppen AA und AB.

Aufgeführt ist für jede Gruppe der Vergleich zwischen dem CA3b/a und dem CA3c sowie zwischen dem CA3b/a und dem gesamten DG beziehungsweise zwischen dem CA3c und dem gesamten DG. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. ns: nicht signifikant; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,005$

### **3.10 Seitendifferenzen zwischen rechtshemisphäraler und linkshemisphäraler Hippocampusformation**

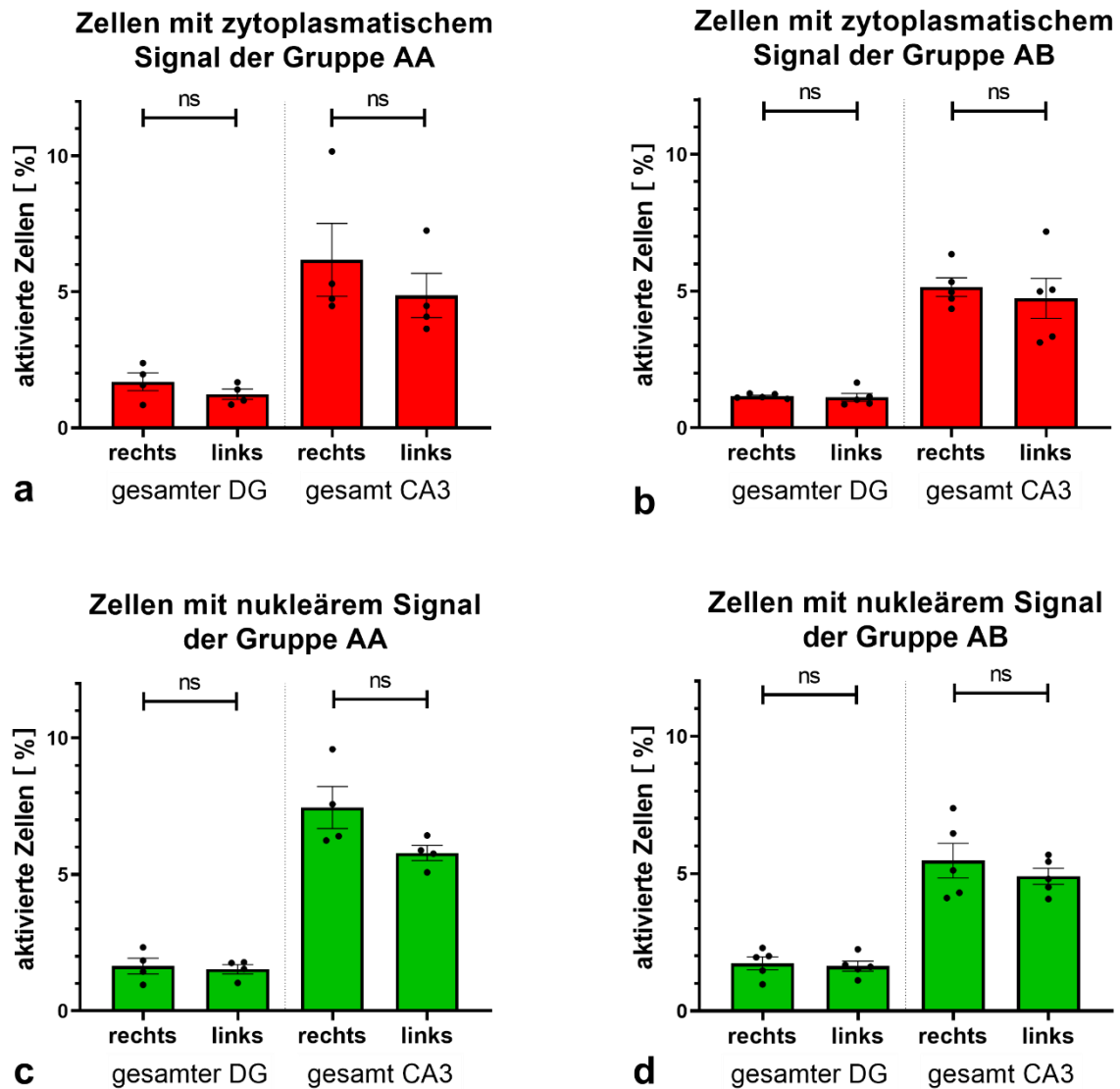
Ein Vergleich der neuronalen Aktivität zwischen den Anteilen der Hippocampusformationen der rechten und linken Hemisphäre erfolgte weiterhin unterteilt in die jeweiligen Experimentengruppen. So sollte ausgeschlossen werden, dass mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen in einer gemeinsamen Auswertung verloren gingen und signifikante Unterschiede maskiert wurden. Entsprechend werden die Ergebnisse in den folgenden Kapiteln weiterhin nach Gruppen aufgeteilt dargestellt.

#### **3.10.1 Allgemeine neuronale Aktivität**

Nach seitengetrennter Auswertung der Anteile an Neuronen mit zytoplasmatischen beziehungsweise nukleären Signalen waren weder für die Gruppe AA noch für die Gruppe AB signifikante Unterschiede zwischen rechtem und linkem DG sowie zwischen rechtem und linkem CA3 nachweisbar (DG:  $F(1, 14) = 0,6335$ ;  $p = 0,4394$ ; CA3:  $F(1, 14) = 1,661$ ;  $p = 0,2184$ ; Abbildung 25). Auch nach Unterteilung in die einzelnen Subregionen wurde in keiner von diesen ein signifikanter Unterschied registriert (für alle Subregionen:  $p > 0,05$ ). Exemplarisch wurden hier im ersten Kontext rechtsseitig  $1,16\% \pm 0,09\%$  SD der Neurone des CA3 in der Gruppe AB aktiviert, während linksseitig  $1,13\% \pm 0,32\%$  SD der Neurone des CA3 aktiviert wurden.

Die Verarbeitung von Informationen schien damit die Aktivierung seitengleicher Anteile von Neuronen der Regionen zu bewirken.





**Abbildung 25 Seitenvergleich der allgemeinen neuronalen Aktivität**

Rekrutierte Neurone im gesamten DG und im gesamten CA3 während der Erkundung des ersten (a) und des zweiten Kontextes (c) bei Mäusen der Gruppe AA sowie rekrutierte Neurone in denselben Regionen während der Erkundung des ersten (b) und des zweiten Kontextes (d) bei Mäusen der Gruppe AB.

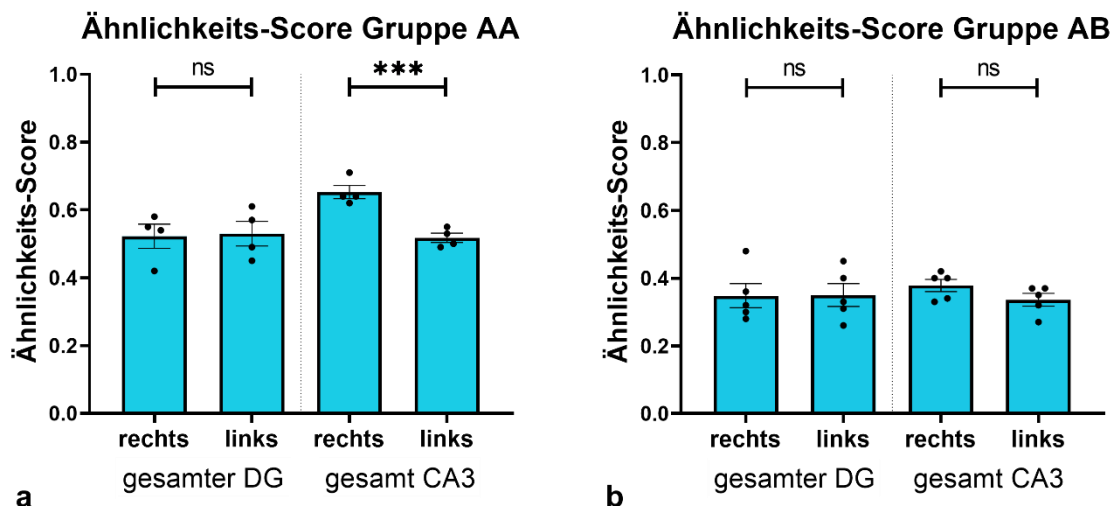
Aufgeführt ist für jede Gruppe der Vergleich zwischen dem rechten und linken Anteil des DG und des CA3. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. DG: Gyrus dentatus; CA3: Cornu ammonis 3; ns: nicht signifikant

### 3.10.2 Rechtsseitig führende Reaktivierung hippocampaler Neurone

Obwohl die Größe der Neuronensembles, welche bei der Erkundung von Umgebungen aktiviert wurden, bihemisphäral annähernd gleich zu sein schien, lieferte die Auswertung des Ähnlichkeits-Scores interessante und von der allgemeinen Aktivität abweichende Ergebnisse (Abbildung 26).

Für die Gruppe AA lag ein signifikant höherer Ähnlichkeits-Score im rechtsseitigen CA3 gegenüber dem linksseitigen vor ( $F(1, 14) = 23,71$ ;  $p = 0,0002$ ; rechts vs. links: AA:  $p = 0,0004$ ). Dieser betrug für die Gruppe AA rechtsseitig  $0,65 \pm 0,04$  SD und linksseitig  $0,52 \pm 0,03$  SD. Für die Gruppe AB lagen die Werte im CA3 bei  $0,38 \pm 0,04$  SD rechts und bei  $0,34 \pm 0,04$  SD links, womit kein relevanter Unterschied festgestellt werden konnte (rechts vs. links AB:  $p = 0,2100$ ). Aufgeteilt in die einzelnen Subregionen des CA3 war dieser Unterschied im CA3b und CA3a der Gruppe AA zu detektieren (CA3c:  $F(1, 14) = 3,0002$ ;  $p = 0,1051$ ; CA3b:  $F(1, 14) = 7,863$ ;  $p = 0,0141$ ; rechts vs. links: AA:  $p = 0,0263$ ; AB:  $p = 0,6385$ ; CA3a:  $F(1, 14) = 12,31$ ;  $p = 0,0035$ ; rechts vs. links: AA:  $p = 0,0043$ ; AB:  $p = 0,6111$ ). Im Gegensatz hierzu lagen weder im gesamten DG noch in einzelnen seiner Subregionen signifikante Unterschiede zwischen dem rechtsseitigen und dem linksseitigen Ähnlichkeits-Score vor (jeweils  $p > 0,05$ ).

Entsprechend des höheren Ähnlichkeits-Scores wurden somit scheinbar mehr Neurone rechts im CA3 reaktiviert als links, wenn eine Umgebung wiederholt erkundet wurde.



**Abbildung 26** Seitenvergleich des Ähnlichkeits-Scores

Ähnlichkeits-Score für den gesamten DG und das gesamte CA3 für die Gruppe AA (a) und die Gruppe AB (b).

Aufgeführt ist für jede Gruppe der Vergleich zwischen dem rechten und linken Anteil des DG und des CA3. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. DG: Gyrus dentatus; CA3: Cornu ammonis 3; ns: nicht signifikant; \*\*\*:  $p \leq 0,0005$

### 3.11 Rostrokaudaler Gradient neuronaler Aktivität

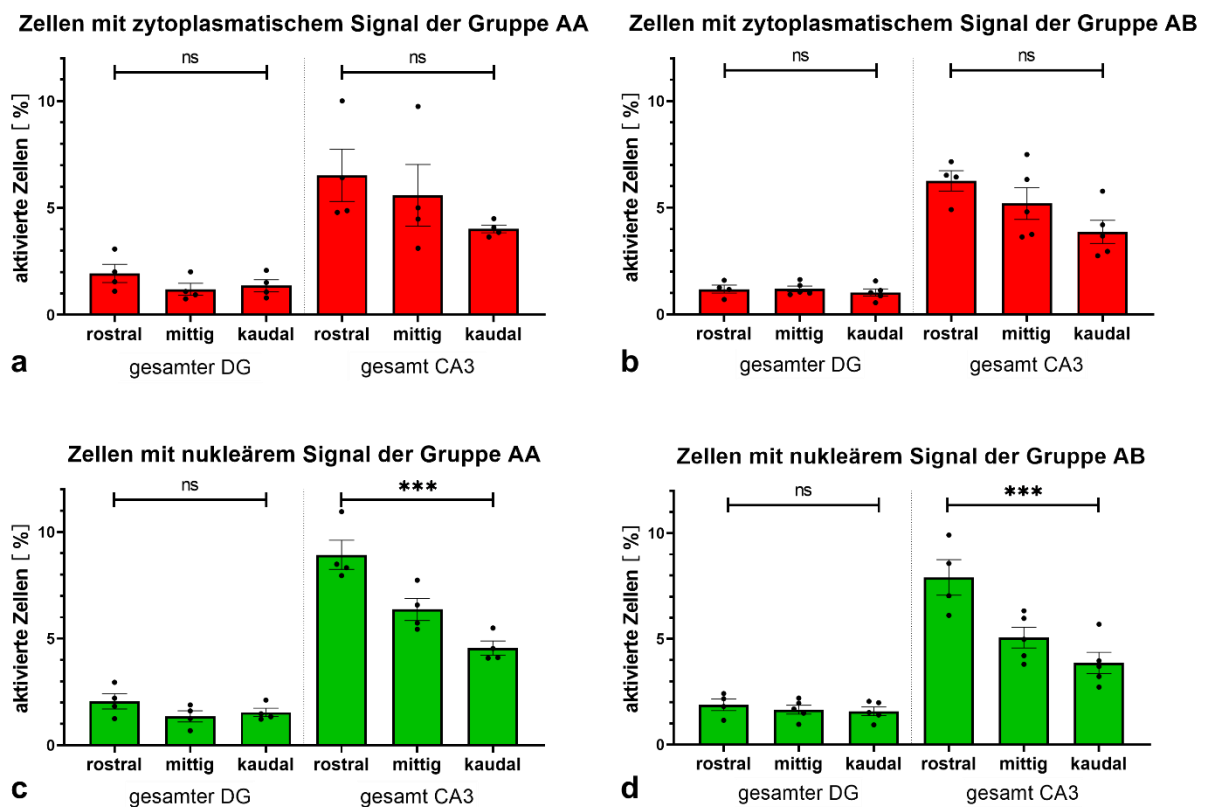
An dieser Stelle ist nochmals anzumerken, dass für jede Subregion zwar die absoluten Zahlen an Zellen mit einem nukleären oder zytoplasmatischen Signal erhoben wurden, in der Statistik jedoch durchgehend mit dem Anteil dieser Zellen von der erfassten Gesamtzellzahl gearbeitet wurde. Die unterschiedliche Größe des DG und des CA3 auf den verschiedenen rostrokaudalen Ebenen der dorsalen Hippocampusformation stellte daher keinen beeinflussenden Faktor für die Auswertung dar und die Daten konnten weiterhin ordnungsgemäß zwischen den verschiedenen Schnittebenen verglichen werden.

#### 3.11.1 Allgemeine neuronale Aktivität

Für die aktivierten Neurone bei der Erkundung des ersten Kontextes, welche auch hier durch diejenigen Zellen mit zytoplasmatischer Signallokalisation repräsentiert wurden, wurden weder für den gesamten DG noch für das gesamte CA3 signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen rostrokaudalen Ebenen gefunden (DG:  $F(2, 20) = 1,359$ ;  $p = 0,2796$ ; CA3:  $F(2, 20) = 4,071$ ;  $p = 0,0329$ ; post-hoc-Test jeweils  $p > 0,05$ ; Abbildung 27a, b). Hier ließen sich nur in einzelnen Subregionen und zudem nur in einer der Gruppen gewisse Unterschiede nachweisen. So wurde bei der Gruppe AA ein signifikant größerer Anteil an Zellen mit zytoplasmatischem Signal in rostralen Ebenen des CA3a nachgewiesen als in kaudalen Ebenen ( $F(2, 20) = 6,523$ ;  $p = 0,0066$ ; rostral vs. kaudal: AA:  $p = 0,0440$ ; AB:  $p = 0,0738$ ). Hier lag der Anteil an aktivierten Zellen bei  $8,43\% \pm 2,36\%$  SD in rostralen Ebenen und bei  $4,46\% \pm 0,72\%$  SD in kaudalen Ebenen. Weiterhin wurde in beiden Gruppen ein signifikant größerer Anteil an aktivierten Zellen in rostralen Ebenen des ipDG verglichen mit kaudalen Ebenen nachgewiesen ( $F(2, 20) = 10,30$ ;  $p = 0,0008$ ; rostral vs. kaudal: AA:  $p = 0,0083$ ; AB:  $p = 0,0332$ ). Hier betrug der Anteil an aktivierten Neuronen exemplarisch für die Gruppe AB  $1,13\% \pm 0,20\%$  SD in rostralen Ebenen und  $0,27\% \pm 0,21\%$  SD in kaudalen Ebenen. Die weiteren Subregionen des DG und des CA3 beider Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 31).

Für diejenigen Neurone, welche bei der Erkundung des zweiten Kontextes rekrutiert wurden, war in der Gruppe AB erneut ein signifikant größerer Anteil in den rostralen Ebenen des ipDG verglichen mit dessen kaudalen Ebenen zu registrieren ( $F(2, 20) = 6,540$ ;  $p = 0,0065$ ; rostral vs. kaudal: AA:  $p = 0,1179$ ; AB:  $p = 0,0393$ ). Darüber hinaus lagen keine Unterschiede für die Subregionen des DG in Gruppe AA oder Gruppe AB vor, wodurch weder für den gesamten DG in der Gruppe AA noch für den in der Gruppe AB ein signifikanter Unterschied

vorlag ( $F(2, 20) = 1,957$ ;  $p = 0,1674$ ; Abbildung 27c, d). Im CA3 ließ sich hingegen in verschiedenen Subregionen ein rostral größerer Anteil an aktivierten Neuronen nachweisen (Abbildung 32), was sich auch auf das Ergebnis bezogen auf das gesamte CA3 auswirkte ( $F(2, 20) = 26,80$ ;  $p < 0,0001$ ; rostral vs. kaudal: AA:  $p = 0,0002$ ; AB:  $p = 0,0002$ ). So fand sich sowohl in Gruppe AA als auch in Gruppe AB ein signifikanter Unterschied für die Subregion CA3b ( $F(2, 20) = 16,89$ ;  $p < 0,0001$ ; rostral vs. kaudal: AA:  $p = 0,0004$ ; AB:  $p = 0,0071$ ). Die Mittelwerte lagen dabei für Gruppe AA rostral bei  $10,53\% \pm 2,31\%$  SD und kaudal bei  $4,31\% \pm 1,90\%$  SD sowie für Gruppe AB rostral  $7,52\% \pm 2,24\%$  SD und kaudal  $3,15\% \pm 0,73\%$  SD. Ebenso wurde in rostralen Ebenen ein signifikant größerer Anteil an Neuronen des CA3c in beiden Gruppen rekrutiert als in kaudalen Ebenen ( $F(2, 20) = 16,82$ ;  $p < 0,0001$ ; rostral vs. kaudal: AA:  $p = 0,0067$ ; AB:  $p = 0,0008$ ).



**Abbildung 27 Rostrokaudaler Vergleich der allgemeinen neuronalen Aktivität**

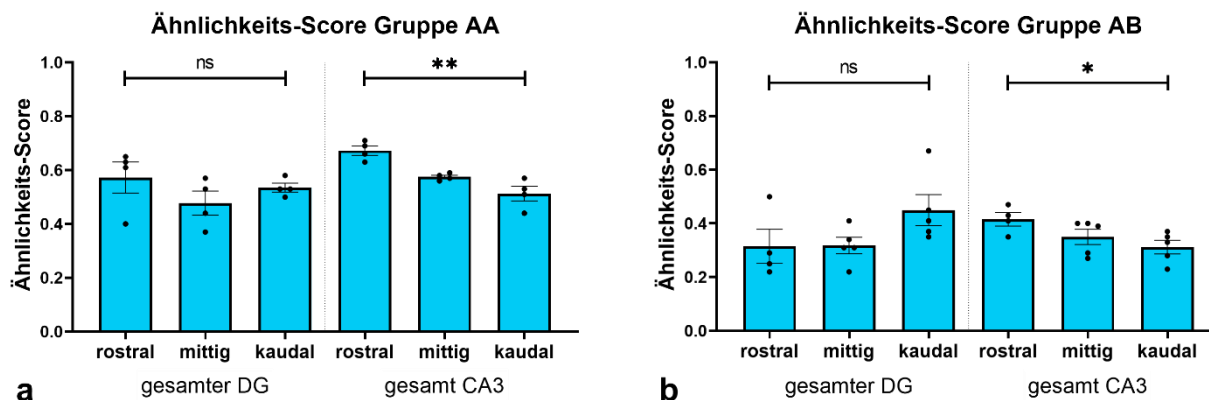
Rekrutierte Neurone im gesamten DG und im gesamten CA3 während der Erkundung des ersten Kontextes bei Mäusen der Gruppe AA (a) und AB (b) sowie rekrutierte Neurone bei Mäusen der Gruppe AA (c) und der Gruppe AB (d) in denselben Regionen während der Erkundung des zweiten Kontextes.

Aufgeführt ist für jede Gruppe der Vergleich zwischen den rostralen und kaudalen Ebenen des DG und des CA3. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. DG: Gyrus dentatus; CA3: Cornu ammonis 3; ns: nicht signifikant; \*\*\*:  $p \leq 0,0005$

### 3.11.2 Rostral führende Reaktivierung hippocampaler Neurone

Auch der Ähnlichkeits-Score wurde für die verschiedenen Ebenen der Hippocampusformation berechnet. Weder für den gesamten DG noch für seine Subregionen waren hierbei signifikante Unterschiede wahrzunehmen (DG:  $F(2, 20) = 1,983$ ;  $p = 0,1638$ ; Abbildung 28).

Für das gesamte CA3 konnte hingegen ein rostral höherer Ähnlichkeits-Score innerhalb beider Gruppen nachgewiesen werden ( $F(2, 20) = 14,72$ ;  $p = 0,0001$ ; rostral vs. kaudal: AA:  $p = 0,0006$ ; AB:  $p = 0,0181$ ). Sein Mittelwert lag bei der Gruppe AA in den rostralen Ebenen exemplarisch bei  $0,67 \pm 0,04$  SD und bei  $0,51 \pm 0,05$  SD für die kaudalen Ebenen. Bei einer Untersuchung der einzelnen Subregionen des CA3 ließen sich wiederum keine Unterschiede finden (jeweils  $p > 0,05$ ). Gleichzeitig ist der Ähnlichkeits-Score für alle Ebenen in CA3 in der Gruppe AA höher als in der Gruppe AB ( $F(1, 20) = 133,2$ ;  $p < 0,0001$ ; rostral:  $p < 0,0001$ ; mittig:  $p < 0,0001$ ; kaudal:  $p < 0,0001$ ). Zusammengefasst ist also bei Betrachtung des gesamten CA3 eine rostral und in der Gruppe AA führende Reaktivierung von Neuronen zu beobachten.



**Abbildung 28 Rostrokaudaler Vergleich des Ähnlichkeits-Scores**

Ähnlichkeits-Score für den gesamten DG und für das gesamte CA3 bei Mäusen der Gruppe AA (a) und bei Mäusen der Gruppe AB (b).

Aufgeführt ist für jede Gruppe der Vergleich zwischen den rostralen und kaudalen Ebenen des DG und des CA3. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. DG: Gyrus dentatus; CA3: Cornu ammonis 3; ns: nicht signifikant; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,005$

## 4 Diskussion

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente legen dar, dass diese Studie nicht nur bisherige Daten zur Zellaktivität in unterschiedlichen Regionen der Hippocampusformation bestätigt hat, sondern auch in verschiedener Hinsicht neue wissenschaftliche Erkenntnisse zu ihrer funktionellen Heterogenität erbracht hat. Neben der Etablierung der Verwendung der prä-mRNA-Sonde *egr-1* und der Bestätigung ihrer Funktionalität im Rahmen der catFISH wurden aufgrund der dezidierten Aufteilung in die Subregionen des DG und des CA3 bei Nutzung der gleichen Sonden zahlreiche neue Erkenntnisse zu der funktionellen Zuordnung dieser zu Prozessen der Musterdifferenzierung und der Musterkomplettierung sowie zu ihrer funktionalen Zusammenarbeit gewonnen. Es wurde einerseits bestätigt, dass die Größe einer aktivierten Neuronenpopulation nicht abhängig von den Charakteristika oder der Neuheit einer Umgebung ist, sondern in verschiedenen unbekannten Kontexten gleicher Größe in etwa auch gleich viele Neurone aktiviert werden (Nakamura et al., 2010). Gleichzeitig wurde ebenso eine nur spärliche Aktivität der Neurone des DG verglichen mit denen des CA3 aufgezeigt, von der angenommen wird, dass sie zum Prozess der Musterdifferenzierung sowie zu dessen Kapazität beiträgt (Leutgeb et al., 2007, Schmidt et al., 2012a).

Neben diesen bekannten Aspekten hat sich jedoch auch ein einheitliches Bild des CA3 als Reaktion auf die erneute Erkundung einer Umgebung und die Erkundung zweier verschiedener Umgebungen gezeigt, während gleichzeitig auch geringe Unterschiede zwischen dessen Subregionen nachgewiesen werden konnten. Die einheitliche Reaktion steht nun teilweise im Gegensatz zu den in der Literatur genannten Hypothesen und stellt einige der bisherigen Annahmen in Frage (Lee et al., 2015). Über diese in der Wissenschaft teils umfassend diskutierten Aspekte hinaus, wurden Hinweise auf eine seitendifferente Verarbeitung von Informationen sowie zu einer unterschiedlichen Einbeziehung verschiedener rostrokaudaler Ebenen des dorsalen Hippocampus in die genannten Prozesse gefunden.

Auf diese bekannten sowie neuartigen Erkenntnisse soll nun in den nachfolgenden Kapiteln näher eingegangen und diese mit Blick auf die bis dato bestehenden Hypothesen diskutiert werden.

## **4.1 Diskussion der Methodik**

### **4.1.1 Nutzbarkeit des IEG zif268/egr-1 für den DG und das CA3 im Rahmen der catFISH**

In den meisten vorangegangenen Studien wurde zur Detektion einer neuronalen Aktivität das IEG Arc verwendet. Der Grund hierfür bestand darin, dass bereits früh nachgewiesen wurde, dass Arc eine verlässliche Transkription bei Plastizitäts-abhängigen Prozessen innerhalb der Hippocampusformation aufweist (Gheidi et al., 2012, Guzowski et al., 1999, Hoang et al., 2018, Kubik et al., 2007). In erster Linie wurde Arc jedoch genutzt, um die Aktivität von Pyramidenzellen im CA3 und CA1 zu untersuchen, da sich für Arc eine prolongierte Transkription in Körnerzellen des DG nachweisen ließ und hiermit eine Verwendung von Arc für die catFISH deutlich eingeschränkt wurde (Maple et al., 2017, Ramirez-Amaya et al., 2013). Für die catFISH im Bereich des DG wurde so unter anderem zif268/egr-1 verwendet (Gheidi et al., 2013, Marrone et al., 2011, Satvat et al., 2011). In den meisten Fällen wurden jedoch entweder der DG oder das CA3 bzw. das CA1 untersucht und nur selten fand eine kombinierte Untersuchung beider Regionen statt. Wurden beide Regionen gleichzeitig betrachtet, so erfolgte die Detektion der Zellaktivität abhängig von der Region dennoch mit Arc für das CA3 und mit zif268/egr-1 für den DG und nicht einheitlich mit einem der beiden IEGs (Grella et al., 2019). Bisher lagen somit noch keine Studien vor, welche den DG und das CA3 einheitlich mit zif268/egr-1 untersucht haben. Die generelle Nutzbarkeit von zif268/egr-1 für die Analyse des CA3 und des DG wurde zuvor jedoch schon angedeutet und im gleichen Schritt konnte gezeigt werden, dass zif268/egr-1 einen direkten Einfluss auf die Transkription von Arc besitzt (Li et al., 2005). Hierdurch waren wiederum verlässliche Ergebnisse für den Nachweise der neuronalen Aktivität, wie sie es mit Arc waren, zu erwarten. Um erstmals eine entsprechende Vergleichbarkeit vom DG und CA3 zu schaffen, sollte in dieser Arbeit schließlich nur das IEG zif268/egr-1 genutzt werden.

Betrachten wir die Ergebnisse der Kontrollgruppen dieser Arbeit, so wurde in Kapitel 3.4.3 bereits erörtert, dass wir sowohl im DG als auch im CA3 plausible Ergebnisse mit der Sonde zif268 erhalten haben. Gleichzeitig wurde in dieser Arbeit die prä-mRNA-Sonde egr-1 verwendet, um eine zusätzliche Kontrolle der nukleären Signalausprägung zu erhalten. Da 30 Minuten nach Exposition zytoplasmatisch kein Nachweis von egr-1 möglich war und die nukleäre Zellaktivität, basierend auf der gleichzeitigen nukleären Detektion von zif268 und egr-1, anschauliche Ergebnisse lieferte, wurde auch die Funktionalität von egr-1 bestätigt.

Ein in Kapitel 3.4.3 angemerkt Punkt ist jedoch der deutlich höhere Anteil an Zellen mit einem nukleären Signal in der Gruppe A5 als der Anteil an Zellen mit einem zytoplasmatischem Signal in der Gruppe A30, welche prinzipiell übereinstimmen müssten (Abbildung 13). Ein Vergleich dieser Zahlen lieferte sowohl für den DG als auch für das CA3 einen signifikant größeren Anteil an Zellen, welche ein nukleäres Signal aufwiesen (gesamter DG:  $p = 0.0027$ ; gesamtes CA3:  $p = 0.0174$ ). Geht man davon aus, dass bei der Erkundung einer Umgebung immer ein gleicher Anteil der Neurone des DG und des CA3 aktiviert wird, wie es in Kapitel 3.5.1 für die Gruppen AA und AB sowie auch in anderen Studien gezeigt wurde (Chawla et al., 2005), so dürfte dieser Unterschied hier nicht nachweisbar gewesen sein. Ein möglicher Ansatz, diese Verhältnisse der Zellaktivität zu erklären, wäre eine nicht ausreichend sensible Detektion beziehungsweise Auszählung der zytoplasmatischen Signale. Beachtet man, dass mittels zif268 sowohl die nukleäre als auch die zytoplasmatische mRNA nachgewiesen wird, so lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die mRNA in der anschließenden Mikroskopie nukleär leichter und somit bei einem niedrigen Grenzwert der Fluoreszenzintensität zu detektieren ist, da die mRNA hier noch gesammelt im Kern vorliegt. Wird diese anschließend ins Zytoplasma transportiert, so wird die mRNA auf ein größeres Volumen verteilt und die detektierbare Fluoreszenzintensität sinkt. Demzufolge könnte die Behauptung aufgestellt werden, dass für die Detektion der zytoplasmatischen Signale ein niedrigerer Grenzwert der Signalintensität verwendet werden müsste als für die nukleären. In den hier verwendeten Einstellungen wäre demzufolge bei Zellen, welche möglicherweise eine etwas schwächere Transkription von mRNA aufgewiesen hätten, noch eine nukleäre Signaldetektion möglich gewesen, während diese zytoplasmatisch nicht mehr gelungen wäre. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass derartige Unterschiede bei allen ausgewerteten Gruppen vorgelegen haben müssten, hätten diese auf dem hypothetischen, eben aufgeführten Methodenfehler beruhen. Vergleichen wir die Anteile an aktivierten Zellen des DG und des CA3 der Gruppen AA und AB mit denen der Gruppen A5 und A30, so lagen diese im gleichen Bereich wie diejenigen der Gruppe A30. Sowohl die Anteile an Neuronen mit nukleärem als auch die mit zytoplasmatischem Signal befanden sich hier bei 1 – 2 % für den DG und bei 5 – 6 % für das CA3, während die Anteile an Zellen mit nukleärem Signal in der Gruppe A5 bei 7 – 8 % für den DG und bei 8 – 9 % für das CA3 lagen. Demzufolge muss die Fehlerquelle bei der Gruppe A5 gelegen haben und nicht bei der Detektion der zytoplasmatischen Signale.

Eine mögliche Erklärung für derart hohe Werte bei der Gruppe A5 wäre hingegen eine fehlerhafte und von denen der anderen Gruppen abweichende Handhabung der Versuchstiere



gewesen. So besteht hier die Möglichkeit, dass der Untersucher, welcher die Tiere in die Arenen gesetzt und anschließend dekapitiert hat, bei den Mäusen der Gruppe A5 noch keine ausreichende praktische Erfahrung oder Routine hatte, da die Mäuse der Gruppe A5 die ersten waren, welche die Arenen erkundet haben und dekapitiert wurden. Eine Verzögerung der Dekapitation durch Probleme der Handhabung oder der nicht ausreichenden Übung der Dekapitation kann bei dieser Gruppe zu zusätzlichen Erfahrungen und Eindrücken bei gleichzeitig auch möglicher Angst der Mäuse geführt haben, die zu einer verstärkten neuronalen Aktivität beigetragen haben könnte. Demzufolge hätte hier ein größerer Anteil an Neuronen sowohl im DG als auch im CA3 eine nukleäre Signalausprägung gezeigt. Eine andere Erklärung für die abweichenden Ergebnisse der Gruppe A5 im Vergleich zu allen anderen Gruppen, basierend auf der weiteren Methodik kann letztlich nicht vorgelegt werden, da die Einstellungen für alle weiteren Arbeitsschritte konstant gehalten und so dokumentiert wurden. Gleichzeitig wurde die FISH bei Gewebeschnitten verschiedener Mäuse gleichzeitig durchgeführt und kann somit auch keine Abweichungen nur von dieser Gruppe erklären. Auch wenn die Werte für die Gruppe A5 etwas höher waren, bestätigen deren Ergebnisse in Zusammenschau mit denen der anderen Gruppen dennoch die Funktionalität der Methode und lassen keinen Zweifel an einer Verwertbarkeit der Ergebnisse aufkommen.

## **4.2 Die Zellaktivität bei der Erkundung gleicher oder verschiedener Kontexte**

### **4.2.1 Einheitliche Aktivierung von Neuronensembles unabhängig von der Bekanntheit einer Umgebung**

Eines der auffälligsten Charakteristika des DG, weshalb ihm bereits früh die Rolle der Musterdifferenzierung zugeschrieben wurde, ist die nur spärliche Zellaktivität, welche er auch bei der Erkundung neuer Umgebungen demonstriert (Alme et al., 2010, Jung und McNaughton, 1993, Leutgeb et al., 2007, Schmidt et al., 2012a). Betrachten wir diese spärliche Zellaktivität in den verschiedenen hier präsentierten Situationen, so fällt auf, dass die Größe der rekrutierten Neuronensembles immer in etwa konstant war. Wir haben diesbezüglich keine Unterschiede im Anteil aktivierter Neurone des DG und des CA3 zwischen der ersten und der zweiten Erkundung von Kontext A registriert, ebenso wie zwischen der Erkundung von Kontext A und der von Kontext B für beide Regionen (Kapitel 3.5). Wie es bereits von Chawla et al. (2005) für den DG beschrieben wurde, scheint damit sowohl im DG als auch im CA3 unabhängig von der Neuheit oder der Bekanntheit eines Kontextes immer eine in etwa gleich große Neuronenpopulation aktiviert zu werden. Wie es sich anteilig aus den Ergebnissen von Nakamura et al. (2010) für das CA1 ableiten lässt, scheint der Anteil an rekrutierten Neuronen damit eher von der Größe einer Umgebung abzuhängen. Inwieweit dies jedoch auch für den DG und das CA3 zutrifft, gilt es noch konkreter in weiteren Studien herauszufinden.

Zusammengefasst lässt sich jedoch behaupten, dass die Größe einer im DG oder im CA3 rekrutierten Neuronenpopulation damit unabhängig von der Neuheit, der Bekanntheit oder von der Form beziehungsweise der Art von Objekten ist, welche in einer Umgebung vorhanden sind. Lediglich, ob gleiche oder neue Neurone aktiviert werden, scheint von diesen Parametern abzuhängen.

### **4.2.2 Die Zellaktivität innerhalb des DG**

Dem DG wird bereits seit vielen Jahrzehnten der Prozess der Musterdifferenzierung zugewiesen (Kesner, 2018, Knierim und Neunuebel, 2016, Marr, 1971, Meyer und Radulovic, 2021, Treves und Rolls, 1994). Bisher wurde jedoch das CA1 am gründlichsten auf Unterschiede seiner Subregionen entlang der transversalen Achse vom CA2 zum Subiculum

untersucht und erst wenige Studien haben sich mit Unterschieden und Gemeinsamkeiten zwischen den Subregionen des DG beschäftigt. Sowohl die Ergebnisse dieser Arbeit als auch diejenigen einiger weniger Arbeiten der letzten Jahre lassen jedoch vermuten, dass der spDG und der ipDG unterschiedlich an der Prozession von Informationen beteiligt sind (Chawla et al., 2005, Meyer und Radulovic, 2021). Ursächlich dafür, dass derartige Unterschiede über längere Zeit nicht entdeckt oder untersucht wurden, könnte unter anderem gewesen sein, dass viele Studien eine vergleichbare Innervation des spDG und ipDG durch den MEC und LEC beschrieben haben, wodurch primär keine Hinweise für Differenzen zwischen diesen ersichtlich waren (van Groen et al., 2003, Witter et al., 1989, Witter, 1993). Lediglich in einzelnen Studien wurde eine führende Innervation des spDG vom LEC beschrieben, welche jedoch in einer Metaanalyse von 21 Tracer-Experimenten nicht bestätigt werden konnte (Tamamaki, 1997, Witter, 2007b, Wyss, 1981).

Vor allem haben Chawla et al. (2005) Unterschiede nachgewiesen, welche konkret darin bestanden, dass nach der Erkundung einer Umgebung zwar eine deutlich vermehrte Expression des IEGs Arc im spDG zu registrieren war, eine derartige Zellaktivität im ipDG allerdings nicht nachgewiesen werden konnte. In diesem lag die Anzahl an Zellen, welche eine Transkription von Arc aufwiesen, nur im gleichen Bereich wie die der Kontrollgruppe, die keine Umgebung erkundet hatte. Entsprechend wurde davon ausgegangen, dass nur der spDG an der Verarbeitung und damit der Musterdifferenzierung räumlicher Informationen beteiligt wäre. Eine Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit legt jedoch dar, dass sowohl der spDG als auch der ipDG bei der Erkundung räumlicher Umgebungen aktiviert werden und beide einen Beitrag zur Musterdifferenzierung leisten. Ein Vergleich der Zellaktivitäten unter den Kontrollgruppen zeigte bereits, dass nicht nur im gesamten DG, sondern in beiden Subregionen eine vermehrte neuronale Aktivität vorlag, wenn Mäuse eine Umgebung erkundet haben (Abbildung 29). Bei einer Betrachtung des Ähnlichkeits-Scores wurde außerdem deutlich, dass beide Subregionen an der Musterdifferenzierung beteiligt waren, da beide einen merklich höheren Score in der Gruppe AA aufwiesen als in der Gruppe AB (Abbildung 19). Gleiches wurde durch die deutlich höheren Anteile an doppelt aktivierten Neuronen bei der Gruppe AA im Vergleich zur Gruppe AB deutlich (Abbildung 18). Es fand somit sowohl im spDG als auch im ipDG eine Differenzierung zwischen beiden Kontexten statt, welche in AB durch zunehmend unterschiedliche Zellensembles repräsentiert wurde, die in den jeweiligen Kontexten aktiv waren.

Dass der Ähnlichkeits-Score innerhalb der Gruppe AA in diesem Rahmen nicht 1 betrug, ist plausibel und durch mehrere Aspekte zu erklären. Einerseits ist die Wahrscheinlichkeit sehr

gering, dass eine Maus den exakt selben Weg nimmt, um eine begrenzte Umgebung erneut zu erkunden, weshalb sie diese auch aus anderen Blickwinkeln betrachtet, was ihre Eindrücke verändert. Gleichzeitig ist ihr der Kontext bei einer zweiten Erkundungsphase schon bekannt, wodurch ihre Zeit, die sie mit den einzelnen Objekten verbringt, anders ausfallen wird als bei einer ersten Erkundung. Neben diesen Aspekten, wurde zudem nachgewiesen, dass der dorsale DG auch an der Verarbeitung zeitlicher Informationen beteiligt ist (Kesner, 2018). Da in dieser Arbeit für die Gruppen AA und AB eine Zeitspanne von 25 Minuten zwischen der Erkundung der beiden Kontexte lag, wird vermutlich auch dies einen Einfluss auf die rekrutierten Neuronensembles gehabt haben. Auf Basis dieser Aspekte sowie der nicht sicher auszuschließenden Verarbeitung weiterer Eindrücke der Mäuse durch den dorsalen DG ist nicht von einer vollständigen Reaktivierung exakt derselben Neuronensembles auszugehen, sondern nur von einer Reaktivierung von mehr Neuronen bei einer erneuten Erkundung einer Umgebung als bei der Erkundung einer sich von dieser unterscheidenden Umgebung. Demzufolge ist nicht mit einem Ähnlichkeits-Score von 1 zu rechnen gewesen auch wenn dieselbe Umgebung erneut erkundet wurde.

Vergleichen wir die grundsätzliche Zellaktivitäten nun zwischen dem spDG und dem ipDG, so fallen einem trotz der Beteiligung beider Subregionen an der Musterdifferenzierung dennoch deutliche Unterschiede auf. In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass der spDG sowohl in der Gruppe AA als auch in der Gruppe AB einen deutlich größeren Anteil an Neuronen mit nukleärem als auch mit zytoplasmatischem Signal aufgewiesen hat. Es wurden also mehr Neurone im spDG zur Musterdifferenzierung eingesetzt als im ipDG. Diese Ergebnisse passen in gewisser Weise wieder zu den Ergebnissen von Chawla et al. (2005), die nur im spDG und damit entsprechend mehr aktivierte Neurone in diesem detektiert haben. Ein statistischer Vergleich beider Bereiche erfolgte in der genannten Arbeit jedoch nicht, so dass die Aussagekraft hierzu eingeschränkt blieb. Ähnliche Ergebnisse lieferten ebenfalls Snyder et al. (2009), die nachgewiesen haben, dass bei der Erkundung des Morris-Wasserlabyrinth mehr Zellen im spDG als im ipDG aktiviert wurden.

Während ein Vergleich des Ähnlichkeits-Scores sowie der RR 1 beider Subregionen hier keine Unterschiede aufzeigte, ist bei der RR 2 hingegen in beiden Gruppen eine höhere Reaktivierungsrate im spDG zu verzeichnen gewesen als im ipDG (Abbildung 22). Es bestand also ein Trend dahingehend, dass im spDG ein größerer Anteil der im zweiten Kontext aktivierten Neurone, auch schon im ersten Kontext genutzt wurde. Da laut dieser eine geringere Überschneidung der Zellpopulationen, die in den beiden Kontexten aktiviert wurden, im ipDG vorlag, könnten diese Daten eher für eine effektivere Musterdifferenzierung

im ipDG sprechen. Aufgrund der fehlenden Korrelate im Ähnlichkeits-Score und der RR 1 ist eine artifizielle Genese dieses Trends allerdings nicht auszuschließen. Welche beziehungsweise ob eine Subregion des DG einen relevanteren Einfluss auf die Musterdifferenzierung hat, wird aus diesen Daten letztendlich nicht vollkommen ersichtlich. In der Literatur wurde bereits in unterschiedlicher Hinsicht die Funktion der Subregionen diskutiert, auch hier liegt jedoch keine einheitliche Meinung vor (Kesner, 2018, Meyer und Radulovic, 2021). Basierend auf anatomischen Untersuchungen der Faserverbindungen wurde bereits ausgeführt, dass der MEC und LEC als primäre Afferenzen des DG beide Subregionen gleichermaßen innervieren (Witter, 2007b). In weiteren Untersuchungen viel jedoch auf, dass einige Kerngebiete, wie der Nucleus supramammillaris, eine asymmetrische Innervation des DG aufweisen, bei der der spDG eine doppelt so dichte Innervation erhält wie der ipDG (Wyss et al., 1979). Für diese Projektionen des Nucleus supramammillaris wurde gezeigt, dass sie eine essenzielle Rolle bei der Generierung von Reaktionen des DG auf neue Reize spielen und primär eine Dysinhibition von Körnerzellen hervorrufen (Chawla et al., 2005, Chen et al., 2020). Dies könnte die stärkere Aktivität des spDG erklären. Gleichzeitig wurde eine Asymmetrie bei der Innervation von Körnerzellen durch hiläre Interneurone nachgewiesen, welche im spDG dichter erscheint als im ipDG, ebenso wie ein vermehrtes Vorkommen von Interneuronen in der Körnerzellschicht des spDG (Meyer und Radulovic, 2021). Durch diese scheint wiederum eine Inhibition von Körnerzellen des spDG leicht zu dominieren. Es sind somit deutliche Unterschiede bezüglich der Innervation und internen Vernetzung beider Subregionen bekannt, welche prinzipiell eine vermehrte Zellaktivität im spDG erklären würden, aber weiterhin keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Rolle beider Subregionen im Rahmen der Musterdifferenzierung zulassen. Würden wir den Grad der Komplexität an Vernetzung und den Einfluss von Interneuronen als Maß für die Relevanz einer Region bei der Ausführung komplexer Aufgaben betrachten, so würde dem spDG eine größere Bedeutsamkeit zugesprochen werden.

Zusammengefasst kann der DG als Ort der primären, kombinierten Verarbeitung von Reizen unterschiedlichen Informationsgehaltes charakterisiert werden, in dem erstmals räumliche Informationen über den MEC und objektbezogene sowie egozentrische Informationen über den LEC zusammengeführt werden (Lee et al., 2020), für die laut der hier vorliegenden Ergebnisse sowohl im spDG als auch im ipDG eine Musterdifferenzierung durchgeführt wird. Ob eine von beiden Subregionen eine größere Relevanz bei diesem Prozess besitzt oder ob eine getrennte Verarbeitung dieser Informationsqualitäten innerhalb des dorsalen DG stattfindet, bleibt jedoch in weiteren Studien zu evaluieren.

### **4.2.3 Die Zellaktivität innerhalb des CA3**

Für das CA3 lässt sich behaupten, dass sie die Region ist, über welche in der Literatur die am wenigsten einheitlichen Ansichten bestehen. Nachdem in den anfänglichen Theorien, in denen das CA3 nur als eine homogene Region angesehen wurde, welche ohne Unterscheidung verschiedener Subregionen für die Musterkomplettierung verantwortlich sein sollte, hat man sich zunehmend von dieser Ansicht distanziert und das CA3 als anatomisch und funktionell inhomogene Station innerhalb der Verschaltungen der Hippocampusformation betrachtet (Kapitel 1.2.6.4). Trotz der wachsenden Zahl an Studien in den letzten Jahren und Jahrzehnten, welche eine derartige Heterogenität des CA3 annahmen, waren die Ansätze, diese Region zu untersuchen, sowie deren Ergebnisse jedoch sehr unterschiedlich. Wie in vorangegangenen Kapiteln bereits erwähnt, wurde beispielsweise dem CA3c eine gemeinsame Rolle mit dem DG für die Musterdifferenzierung zugeschrieben, während das CA3b/a eher der Musterkomplettierung dienen sollte. Ebenso wurde allerdings abweichend von dieser grundlegenden Ansicht diskutiert, ob an Stelle zwischen einer Musterdifferenzierung und einer Musterkomplettierung nicht eher zwischen einer anatomisch getrennten Verarbeitung verschiedener Informationsqualitäten unterschieden werden sollte. So wurde erwogen, ob nicht lokale und globale Ziele unterschiedlich von den jeweiligen Subregionen verarbeitet werden, ob zwischen positionellen und direktionalen Hinweisen unterschieden werden muss oder ob nur das proximale CA3 räumliche Informationen verarbeitet, während das distale CA3 eher die zeitlichen Komponenten erfasst (Flasbeck et al., 2018, Hoang et al., 2018, Lee et al., 2015). Für die lokalen Ziele konnte eine Verarbeitung im gesamten CA3 gezeigt werden, während globale eher über direkte Verbindungen vom MEC zum CA1 prozessiert werden sollen (Knierim und Neunuebel, 2016). In Zusammenschau der meisten Studien ergaben sich jedoch keine ausreichenden Belege für die weiteren Konzepte. Um in dieser Arbeit die Kofaktoren, welche Einfluss auf die Reizverarbeitung hätten nehmen können, so gering wie möglich zu halten und damit eine präzise Analyse von Differenzierungs- und Komplettierungsprozessen zu ermöglichen, haben wir die Unterschiede zwischen den Umgebungen so gering wie möglich, aber ausreichend für eine Unterscheidung gehalten. Die Expositionszeit wurde auf ein Minimum reduziert und nicht repetitiv über mehrere Stunden oder Tage ausgedehnt, um zeitliche Aspekte möglichst zu eliminieren. Zugleich wurde für beide Kontexte der gleiche Raum verwendet, um nur eine Verarbeitung lokaler und nicht globaler Hinweise zu gewährleisten. An dieser Stelle sei jedoch

anzumerken, dass noch nicht vollständig geklärt ist, welche Aspekte konkret die lokalen und globalen Hinweise definieren. So haben einige Studien auch einen Wechsel der Arenen als Änderung der globalen Hinweise charakterisiert, während die meisten Studien dies jedoch als Änderung der lokalen Hinweise aufgefasst haben und stattdessen ein Wechsel des Raums, in dem in einigen Fällen die zweite Arena platziert war, als Änderung der globalen Hinweise definiert wurde (Chawla et al., 2018, GoodSmith et al., 2017, Hunsaker et al., 2008, Marrone et al., 2014). Wie letztere wurde die Definition auch in dieser Arbeit aufgefasst, wodurch bei einem Wechsel von Kontext A in Kontext B nur eine Veränderung der lokalen Hinweise erfolgte. Die folgende Interpretation der Ergebnisse soll sich damit primär auf die Musterdifferenzierung und -komplettierung bei Veränderung lokaler Hinweise konzentrieren. Ebenfalls sei an dieser Stelle anzumerken, dass wir für die nachfolgende Diskussion davon ausgehen müssen, dass Kontext B eine ausreichende Abweichung von Kontext A für eine Musterdifferenzierung darstellt und gleichzeitig keine zu großen Veränderungen enthält, um als neuer Kontext wahrgenommen zu werden.

Betrachten wir zunächst nur die grundsätzliche Zellaktivität in den verschiedenen Subregionen des CA3, so ist hier eine gleichmäßige Beteiligung sowohl des CA3c als auch des CA3b und CA3a bei der Verarbeitung der Informationen zu registrieren (Abbildung 23). Vor allem bei einem Vergleich der Anteile an Zellen mit zytoplasmatischem Signal zwischen den Subregionen, welche bei beiden Gruppen die Zellaktivität im gleichen Kontext repräsentierten, war kein Unterschied wahrzunehmen. Diese Beobachtung widerspricht bereits den Ergebnissen von beispielsweise Hoang et al. (2018), welche nur eine Aktivitätssteigerung des proximalen CA3 beobachten konnten, als auch denen von Beer et al. (2018), welche eine stärkere Beteiligung des distalen CA3 bei der Verarbeitung räumlicher Informationen aufgeführt haben. Weiter bekräftigt wird unser Ergebnis durch die nicht vorhandenen Unterschiede innerhalb der einzelnen Subregionen zwischen dem Anteil an Zellen mit zytoplasmatischer Signalausprägung und dem Anteil an Zellen mit nukleärer Signalausprägung in beiden Gruppen. Egal ob eine unbekannte oder bekannte Umgebung erkundet wird, scheinen somit alle Subregionen des CA3 gleichermaßen miteinbezogen zu werden. Der einzige Unterschied, welcher beim Anteil an Neuronen mit nukleärem Signal auszumachen war, war eine leicht vermehrte Zellaktivität im CA3b für die Gruppe AA verglichen mit AB (Abbildung 17). Bezogen auf den aktuellen Stand zur Abgrenzung zwischen Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung, wie er in Kapitel 1.2.7 dargelegt wurde, kann dieser Unterschied gegebenenfalls als leichter Hinweis auf eine vermehrte Musterkomplettierung innerhalb dieser Region angesehen werden. Da wir bei wiederholter

Erkundung einer Umgebung, wie in der Gruppe AA erfolgt, von einer Musterkomplettierung ausgehen würden, könnte hier auch eine leicht vermehrte neuronale Aktivität in den dafür zuständigen Bereichen auftreten. Allein auf dieser Grundlage sollte diesem Gedanken jedoch kein zu großer Wert beigemessen werden, insbesondere da ein derartiger Unterschied nicht auch für das CA3a beobachtet werden konnte, von dem auch eine vermehrte Beteiligung an der Musterkomplettierung vermutet wird. Eine weitere schlüssige Erklärung dieses Unterschiedes in CA3b lässt sich aktuell nicht herleiten, so dass lediglich eine artifizielle Natur dieses Ergebnisses noch zu erwägen wäre.

Auch bei Betrachtung des Ähnlichkeits-Scores fiel erneut eine sehr einheitliche Reaktion aller Subregionen sowohl innerhalb der Gruppe AA als auch innerhalb der Gruppe AB auf. Wie in Kapitel 3.6.4 und 3.9 aufgeführt bestand in allen Subregionen ein signifikant höherer Ähnlichkeits-Score für die Gruppe AA verglichen mit der Gruppe AB (Abbildung 19), wobei keine Unterschiede zwischen dem CA3c und CA3b/a auszumachen waren (Abbildung 24a, b). Demzufolge bestand neben einer grundsätzlichen Aktivierung auch eine Reaktivierung ähnlicher Anteile von Neuronen in allen Subregionen, welche nur abhängig von der Bekanntheit beziehungsweise Neuheit einer Umgebung war. Diesen Ergebnissen zufolge muss also in gewisser Weise eine ähnliche Funktion aller Subregionen des CA3 vorliegen, aufgrund derer die einheitliche Reaktivierung von Neuronen zustande kam. Basierend auf den starken Unterschieden des Ähnlichkeits-Scores zwischen der Gruppe AA und der Gruppe AB ist dabei entweder von einer erfolgten Musterkomplettierung bei der Gruppe AA oder von einer erfolgten Musterdifferenzierung bei der Gruppe AB auszugehen. Durch letztere könnte es zu einer deutlich geringeren Überlappung der aktivierten Neuronenensembles in dieser Gruppe gekommen sein. Wäre es in der Gruppe AB stattdessen zu einer einheitlichen Prozessierung der Informationen im Rahmen einer Musterkomplettierung gekommen, wäre von höheren Werten des Ähnlichkeits-Scores in der Gruppe AB auszugehen gewesen, welche mehr denen der Gruppe AA geähnelt hätten. Dass in Gruppe AB dennoch ein Ähnlichkeits-Score von 0,3 bis 0,4 in allen Subregionen des CA3 zu registrieren war, dürfte an der Lokalisation beider Arenen im gleichen Raum gelegen haben sowie am grundsätzlich ähnlichen Aufbau dieser. So wurden die globalen Hinweise, wie oben erwähnt konstant gehalten, wodurch weiterhin eine Ähnlichkeit zwischen beiden Umgebungen geschaffen wurde. Es scheint also eher eine einheitliche Musterdifferenzierung von allen Subregionen des CA3 bei der Erkundung zweier Kontexte mit unterschiedlichen lokalen Hinweisen durchgeführt zu werden.



Das homogene Erscheinungsbild passt hierbei sehr gut zu den einheitlichen Ergebnisse von Grella et al. (2019). Dort wurde ebenfalls die Zellaktivität in den verschiedenen Subregionen des CA3 analysiert, jedoch nicht gegeneinander verglichen, da die Ergebnisse nur als Ausgangsbefund für weitere Versuche dienen sollten. Anhand der aufgeführten Ergebnisse lag jedoch auch hier eine sehr ähnliche Zellaktivität in allen Subregionen vor. Auf der anderen Seite stehen unsere Ergebnisse in einem Widerspruch zu denen von Hunsaker et al. (2008), welche eine stärkere Verarbeitung räumlicher Informationen durch das CA3c als durch das CA3b/a mittels Läsionsstudien beschrieben haben, als auch im Widerspruch zu denen von Flasbeck et al. (2018). Letztere haben eine Verarbeitung räumlicher Informationen lediglich durch das distale CA3 beschrieben, nicht jedoch durch das proximale. Abschließend wird die Stimmigkeit unserer hier aufgeführten Ergebnisse durch jene von Marrone et al. (2014) unterstützt, deren ebenfalls verwendeter Ähnlichkeits-Score annähernd die gleichen Ergebnisse hervorbrachte, wie in dieser Arbeit, wenn auch die verschiedenen Subregionen dort nicht statistisch miteinander verglichen wurden. Die offene Position aus Kapitel 1.2.6.4, welche Subregionen an der Verarbeitung räumlicher Informationen beteiligt sind, kann somit nicht nur durch unsere, sondern auch durch andere Ergebnisse so zu beantworten zu sein, dass alle Subregionen des CA3 hieran teilhaben, wenn auch in teils unterschiedlichem Ausmaß, wie es nachfolgend erörtert werden soll.

Hinweise auf diese unterschiedlich starke Partizipation an Prozessen der Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung innerhalb des CA3 lassen sich in dieser Arbeit finden, wenn wir die Anteile an doppelt aktivierten Neuronen in den verschiedenen Subregionen betrachten. Obwohl wir derart homogene Ergebnisse für den Ähnlichkeits-Score registriert haben, war, wie in Abbildung 18c dargestellt, im CA3b und CA3a ein signifikant größerer Anteil an doppelt aktivierten Neuronen in der Gruppe AA als in der Gruppe AB vorzufinden, als dies im CA3c der Fall gewesen ist. Vergleichen wir die Anteile zwischen diesen Subregionen, so scheint dies eher an einem geringeren Anteil an doppelt aktivierten Neuronen innerhalb der Gruppe AA im CA3c gelegen zu haben als an Unterschieden bei den Anteilen doppelt aktivierten Neurone innerhalb der Gruppe AB. Letztere zeigten in allen Subregionen im Vergleich zur Gruppe AA sehr ähnliche Werte bei gleichzeitig nur geringen Standardfehlern. Diese Ergebnisse sprechen somit eher für eine geringere Reaktivierung von Neuronen im CA3c als in den weiteren Subregionen, wodurch auf funktionelle Unterschiede zwischen diesen Subregionen geschlossen werden muss. Es könnte somit eine vermehrte Musterdifferenzierung oder eine verminderte Musterkomplettierung des CA3c vermutet werden. Zusammengefasst konnte auf der einen Seite damit ein sehr homogenes

Erscheinungsbild der Subregionen des CA3 beobachtet werden und auf der anderen Seite leichte Inhomogenitäten im Sinne etwas geringerer Anteile doppelt aktivierter Neurone im CA3c. In welche Richtung diese zuletzt aufgeführten Inhomogenitäten weiter interpretiert werden können, soll im nachfolgenden Kapitel in Zusammenschau mit dem Vergleich von DG und CA3 erfolgen.

#### **4.2.4 Die Zellaktivität im Vergleich zwischen dem DG und dem CA3**

Sowohl der DG an sich als auch die einzelnen Subregionen des CA3 wurden nun in ausreichender Weise für sich isoliert thematisiert und ihre Funktionen diskutiert. Doch inwiefern verarbeitet das CA3 vorverarbeitete Informationen des DG und in welchem Ausmaß arbeiten beide Regionen oder zumindest Anteile von ihnen zusammen? Exakt für diese Fragestellung wurde die einheitliche Analyse beider Regionen mittels des IEG *zif268/egr-1* durchgeführt. Wie in den einleitenden Kapiteln ausgeführt, wird eine starke Kooperation des DG mit dem CA3c angenommen, während das CA3b/a funktionell eher von diesen abgegrenzt wird. Hierfür spräche auch die im vorangegangenen Kapitel erwähnte Möglichkeit einer vermehrten Musterdifferenzierung durch das CA3c, wie es auch der DG ausführt. Ob sich derartige Beziehungen auch aus dem Vergleich der gewonnenen Daten des DG mit denen des CA3 herleiten lassen, soll im Folgenden diskutiert werden.

Ein Vergleich der allgemeinen Zellaktivität bringt bereits starke Unterschiede zwischen beiden Regionen der Hippocampusformation hervor, bei denen im CA3 eine signifikant höhere Zellaktivität zu verzeichnen ist. Dies gilt sowohl bei der Erkundung eines unbekannten Kontextes, wie in Abbildung 20a an der Anzahl an Zellen mit zytoplasmatischem Signal zu sehen ist, als auch bei der Erkundung eines bekannten oder teilweise bekannten Kontextes, wie in Abbildung 20b zu erkennen ist. Die neuronale Aktivität ist im CA3 bezogen auf den Anteil an aktiven Neuronen dabei um das bis zu vierfache höher als im DG. Durch diesen Unterschied wird bereits die spärliche neuronale Rekrutierung von maximal 2 – 4 % innerhalb des DG betont, welche als ein spezielles Charakteristikum von diesem angesehen wird und als Grundlage für den Prozess der Musterdifferenzierung dienen soll (Schmidt et al., 2012a).

Vergleichen wir die weiteren erhobenen Parameter, so fällt ein deutlich größerer Anteil an doppelt aktivierten Neuronen in allen drei Subregionen des CA3 verglichen mit dem DG auf (Abbildung 18). Während der Anteil im DG bei maximal 1,0 % lag, betrug der Mittelwert für das CA3 in der Gruppe AA etwas mehr als 3,0 %. Auch dieser Unterschied spricht für eine stärkere Separation der neuronalen Aktivität im DG als im CA3. Da dieser Unterschied

ebenfalls für den Vergleich des DG mit dem CA3c bestand, für den ja keine signifikanten Unterschiede im Anteil doppelt aktivierter Neuronen zwischen den Gruppen nachgewiesen werden konnten, scheint trotz einer prinzipiellen gemeinsamen Zuordnung beider Regionen zur Musterdifferenzierung dennoch ein Unterschied zwischen diesen beiden vorzuliegen. Indem der Anteil an doppelt aktivierten Neuronen im DG erheblich kleiner war, erscheint die Musterdifferenzierung im DG deutlich effektiver ausgeführt zu werden als im CA3c. Diese Annahme wurde auch von Hunsaker et al. (2008) bereits aufgestellt, welche größere Defizite bei Ratten beobachtet hatten, die Läsionen des DG erhalten hatten, als bei solchen mit Läsionen des CA3c. Hierfür wird mit hoher Wahrscheinlichkeit bereits die zuvor angesprochene, deutlich größere Zellzahl im DG verantwortlich sein, auf die die Informationen verteilt werden können.

Während wir nun signifikante Unterschiede im Ähnlichkeits-Score zwischen dem CA3b/a und dem DG innerhalb der Gruppe AA finden konnten sowie signifikante Unterschiede in der RR 2 zwischen den gleichen Regionen innerhalb der Gruppe AB, konnten derartige Differenzen in keinem der Parameter zwischen dem CA3c und dem DG nachgewiesen werden (Abbildung 24). Dies könnte im Grunde für eine Kooperation von DG und CA3c sprechen. Gleichzeitig lag allerdings auch kein Unterschied zwischen dem CA3c und dem CA3b/a vor, was auch hier eine Kooperation vermuten lassen könnte. Die Funktion des CA3c kann hier also weder eindeutig der gleichen wie der des CA3b/a zugeordnet werden, noch der des DG, sondern schlägt stattdessen einen Mittelweg ein. Der Unterschied im Ähnlichkeits-Score kann damit nur als Zeichen einer stark divergenten Funktion des DG und des CA3b/a bei wiederholter Erkundung eines Kontextes interpretiert werden. Dass in der RR 2 hingegen nur in der Gruppe AB ein signifikanter Unterschied zwischen dem DG und dem CA3b/a registriert werden konnte, welcher für den Ähnlichkeits-Score nicht vorlag, kann dabei als Trend in Richtung einer stärkeren Musterdifferenzierung im DG bei Erkundung verschiedener Umgebungen gedeutet werden, welcher durch die Normalisierung der Ergebnisse im Rahmen des Scores nicht mehr nachzuweisen war.

Bleiben wir vorerst bei dem Blickwinkel, dass eine Kooperation des DG und des CA3c bei der Musterdifferenzierung vorliegt, würde diese im Einklang mit den bereits anfänglich in Kapitel 1.1.2.5 aufgeführten anatomischen Charakteristika und ihrer funktionellen Deutung stehen und eine gemeinsame Funktion bei führender Effizienz der Musterdifferenzierung im DG bekräftigen. Entsprechend der starken Innervation des CA3c durch die Mossyfasern der Körnerzellen bei gleichzeitig nur geringer Innervation durch Afferenzen aus dem EC, welche primär das CA3b/a innervieren, besteht eine primäre Beeinflussung der Zellaktivität im CA3c

durch den DG (Lee et al., 2020). Aufgrund der ausgeprägten rekurrenten Kollateralen der Pyramidenzellen des CA3c zurück zu Mossyzellen und weiteren Interneuronen des Hilus, die wiederum die Körnerzellen des DG kontrollieren, hat das CA3c gleichzeitig starken Einfluss auf die Zellaktivität des DG und damit auch wieder auf seine eigene. Durch dieses Wechselspiel der gegenseitigen Beeinflussung wurde hier auf anatomischer Grundlage die Zusammenarbeit beider Regionen im Rahmen der Musterdifferenzierung vermutet (Goodsmith et al., 2019, Lee et al., 2020, Meyer und Radulovic, 2021, Shi et al., 2019). Bei in dieser Arbeit sehr ähnlichen Ergebnissen des Ähnlichkeits-Scores und der Reaktivierungsraten für den DG und das CA3c scheint diese Annahme der starken Kooperation hier nicht widerlegt werden zu können. Ebenso wird durch die Unterschiede im Ähnlichkeits-Score und der RR 2 zwischen dem DG und dem CA3b/a die Vermutung bestärkt, dass die Innervation des CA3b/a durch direkte Eingänge aus dem EC einen Einfluss auf die Funktion dieser Subregionen bei der Musterkomplettierung haben könnte. Aufgrund der fehlenden Differenzen des CA3c und CA3b/a im Ähnlichkeits-Score und der RR2 kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass das CA3c auch einen Anteil am Prozess der Musterkomplettierung wie das CA3b/a hat.

Eine gemeinsame Betrachtung des DG und des CA3 führt damit zu einer weiteren Festigung der Hypothese, dass der DG primär für die Musterdifferenzierung zuständig ist. Für das CA3 ergibt die gemeinsame Betrachtung mit dem DG erneut das Bild einer funktionellen Inhomogenität, bei dem das CA3b/a deutlich mehr Abstand zur Funktion des DG einnimmt und das CA3c eine Mittelposition zwischen den jeweils anderen verkörpert.

Die nun noch zu beantwortende Frage ist, wie sich auf der einen Seite die einheitliche Reaktion der Subregionen des CA3, wie sie im vorherigen Kapitel beschrieben wurde, und die zuletzt beschriebenen Unterschiede innerhalb des CA3 auf der anderen Seite in Einklang bringen lassen. Das einheitliche Bild des CA3 würde prinzipiell zu der Annahme von Knierim und Neunuebel (2016) passen, die dem CA3 abhängig von seinen Eingängen eine homogene Musterdifferenzierung oder homogene Musterkomplettierung zugeschrieben haben. Würden wir nun von einer gemeinsamen Musterdifferenzierung ausgehen, für die die starken Unterschiede des Ähnlichkeits-Scores in allen Subregionen zwischen den Gruppen sprechen, würden die Unterschiede im CA3 eine verminderte Musterdifferenzierung im CA3b/a bei wiederholter Erkundung von Kontext A darstellen, da der Anteil doppelt aktivierter Neurone hier höher als im CA3c war. Die Neuronenpopulationen im CA3b/a wurden demzufolge nicht so weit voneinander separiert wie im CA3c. Wie bereits im vorherigen Kapitel angedeutet, kann diese stärkere Reaktivierung von Neuronen im CA3b/a innerhalb der Gruppe AA aber

auch als das Ergebnis einer Musterkomplettierung gedeutet werden, die dort stärker ausgeführt wurde als im CA3c. Wie bereits erläutert würde bei einer Musterkomplettierung ein großer Teil und im theoretischen Idealzustand die gesamte im ersten Kontext bereits aktivierte Neuronenpopulation bei wiederholter Erkundung einer Umgebung reaktiviert werden, wodurch es zu einer Erinnerung der Umgebung kommen würde. Entsprechend war speziell innerhalb der Gruppe AA eher von einer Musterkomplettierung als von einer Musterdifferenzierung auszugehen und die stärkere Reaktivierung von Neuronen im CA3b/a entspräche eher einer stärkeren Musterkomplettierung als im CA3c. In dieser Art haben bereits mehrere Studien den Prozess der Musterkomplettierung eher dem distalen CA3 zugewiesen, welches weitgehend dem CA3b/a entspricht (Kesner, 2013, Lee et al., 2015, Meyer und Radulovic, 2021). In Abgleich mit diesen würden wir die Ergebnisse damit eher als stärkere Musterkomplettierung anstatt als verminderten Musterdifferenzierung deuten. In diesem Zusammenhang haben Lee et al. (2020) einen weiteren Hinweis für die Zuständigkeit des CA3b/a für die Musterkomplettierung herausgearbeitet. So führen diese auf, dass es im distalen CA3 eine andere Art von Pyramidenzellen zu registrieren gibt, deren Funktion für eine solche spricht. Die am weitesten verbreitete Art von Pyramidenzellen im CA3 wird durch sogenannte dornige Auswüchse (*thorny excrescences*) charakterisiert, die den postsynaptischen Erhebungen entsprechen und denen ausgesprochene Plastizitätsmöglichkeiten zugeschrieben werden. Die im CA3b/a lokalisierten Pyramidenzellen weisen jedoch zu einem großen Teil nicht-dornige Auswüchse auf, denen die Funktion einer Aktivitätssynchronisation im Rahmen der Musterkomplettierung nachgesagt wird und die die Funktionsunterscheidung innerhalb des CA3 damit bekräftigen. Zugleich könnten die in Kapitel 1.2.5.2 aufgeführten elektrophysiologischen Ergebnisse von Leutgeb et al. (2005) in einer hierzu passenden Weise gedeutet werden. Von diesen wurde bei Ratten, welche unterschiedlichen lokalen Hinweisen ausgesetzt wurden, die Reaktivierung der gleichen Neurone beschrieben, welche auch bei den ersten lokalen Hinweisen aktiviert wurden. Der einzige Unterschied lag hier lediglich in einer Frequenz-Umkartierung. In dieser Situation konnte nun angenommen werden, dass entweder eine Musterdifferenzierung lediglich auf Basis einer Änderung der Feuerrate der Neurone vorlag oder dass es zu einer Musterkomplettierung gekommen war, bei welcher lediglich noch Unterschiede in der Feuerrate zu registrieren waren. Diese Rekrutierung einer konstanten Neuronenpopulation bei Veränderung lokaler Hinweise scheint nun eher zu einer Musterkomplettierung zu passen. Letztlich lässt sich bei den aufgeführten Ergebnissen nicht sicher herausarbeiten, für welchen der beiden Prozesse das CA3 nun eindeutig zuständig ist. Genau dieser Aspekt lässt jedoch

die Hypothese aufkommen, dass nicht nur einer dieser beiden Prozesse abläuft, sondern eine gleichzeitige Ausführung beider Prozesse stattfindet, die sich in den Ergebnissen überlagern. Hinterfragen wir die Annahmen von Knierim und Neunuebel (2016) und überführen ihre Gedanken in eine Beispielsituation, so wäre ein Individuum bei der Erkundung einer Umgebung in der Lage, sich entweder an die Umgebung zu erinnern oder diese als neu wahrzunehmen. Würde die Umgebung einer zuvor besuchten sehr stark ähneln, so würde dies den Prozess der Musterkomplettierung bewirken und die Erinnerung an die bekannte Umgebung würde abgerufen werden. Würde sich der nun erkundete Kontext jedoch ausreichend von dem zuvor inspizierten unterscheiden, so würde dies den Prozess der Musterdifferenzierung einleiten und die nun in der Umgebung gesammelten Eindrücke würden als eigenständige Erinnerung ohne Bezug zu vorherigen abgespeichert werden. Doch wie soll laut diesem Ablauf der Vergleich mit bekannten Umgebungen erfolgen, wenn die Eindrücke direkt von anderen separiert werden würden und das Individuum sich gar nicht erst an die andere erinnern würde? An dieser Stelle sollte die Überlegung betrachtet werden, ob nicht in jeder Situation eine unterschiedlich starke Musterkomplettierung ausgeführt wird, durch welche ein Individuum sich an die gemachten Erfahrungen erinnert, von denen die derzeitige Situation wiederum abgegrenzt werden soll. Sind die beiden Kontexte vollständig unterschiedlich, so ist nachvollziehbar, dass keine Eindrücke vorliegen, über welche eine Erinnerung zu einer bekannten Umgebung abgerufen werden könnte. Liegen jedoch geringe Ähnlichkeiten zwischen zwei Umgebungen vor, so wäre es nur logisch, dass diese Gemeinsamkeiten ein Erinnern an die zuerst besuchte Umgebung bewirken würden. Würde diese Erinnerung vorliegen, so wäre es möglich im Sinne einer Musterdifferenzierung die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Umgebungen durch eine entsprechende Überlappung der Neuronenensembles herauszuarbeiten. Würde der erste Schritt des Erinnerns beziehungsweise der Musterkomplettierung nicht durchgeführt werden, so würde auch kein spezifisches Neuronenensemble selektiert werden, von dem die im zweiten Kontext rekrutierte Gruppe von Neuronen abgegrenzt werden könnte. Eine variable Ausprägung des Grades der Musterkomplettierung wäre in diesem Rahmen ebenfalls vorstellbar, um entweder nur einzelne Aspekte einer Umgebung abzurufen oder letztlich ein Gesamtbild dieser zu erinnern. Dies würde jedoch erneut von der Ähnlichkeit beider Umgebungen abhängen. Eine derartige Kombination aus Musterkomplettierung und Musterdifferenzierung würde auf der einen Seite die aus dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse mit Gemeinsamkeiten und Unterschieden innerhalb des CA3 erklären. Auf der anderen Seite würde diese jedoch auch

die teils unterschiedlichen Ergebnisse vorheriger Studien erklären, indem hier unterschiedlich starke Komplettierungs- und Differenzierungsprozesse vorgelegen haben könnten.

Gegen eine solche Hypothese würden allerdings Ergebnisse wie von Hunsaker et al. (2008) sprechen, bei denen Läsionen des DG und des CA3c zu deutlichen Beeinträchtigungen der Detektion von Neuheiten geführt haben, Läsionen des CA3b und CA3a jedoch nur zu sehr geringen Problemen. Dies würde eine nicht so essenzielle Rolle des CA3b/a ausdrücken und den Regionen des CA3c und des DG mit ihrem Prozess der Musterdifferenzierung eine größere Bedeutung zuweisen. Inwiefern jedoch bei dieser Studie wirklich ein Defizit der Prozesse auf neuronaler Ebene bestand, ist weiterhin nicht geklärt, da hier nur die Verhaltensauswertungen als indirekte Kriterien herangezogen wurden und die Unterbrechung der neuronalen Aktivität durch die Läsionen nicht kontrolliert wurde. Als Kriterien dienten hierbei lediglich die Zeit, die die Ratten mit den einzelnen Objekten verbracht haben, die Anzahl an Erkundungen eines Objekts sowie die Anzahl an Durchquerungen jeder Region der Kontexte. Es ist daher durchaus möglich, dass der DG und das CA3c relevanter zur Unterscheidung von Umgebungen sind, jedoch kann die Notwendigkeit einer Erinnerung an Erfahrungen mittels einer Musterkomplettierung durch das CA3b/a und anteilig vielleicht auch das CA3c für die sichere Differenzierung nicht ausgeschlossen werden.

Zusammengefasst erscheint somit die Hypothese am plausibelsten, dass parallel von allen Subregionen des CA3 eine Musterdifferenzierung durchgeführt wird, während im CA3b/a ebenfalls eine parallele Musterkomplettierung abläuft.

Inwiefern hierbei der spDG und der ipDG einen unterschiedlichen Einfluss auf das CA3 haben, bleibt weiterhin nicht vollständig geklärt. Da die RR 2 in beiden Gruppen signifikant niedriger für den ipDG als für den spDG ausfiel, könnte hier die Vermutung aufgestellt werden, dass ersterer eine effizientere Musterdifferenzierung ausführt als sein suprapyramidales Gegenstück. Unter der Kenntnis, dass der ipDG vor allem das proximale Drittel des CA3 und damit in etwa das CA3c innerviert, während der spDG Efferenzen an das gesamte CA3 entsendet, könnte angenommen werden, dass vor allem der ipDG einen Einfluss auf die Beteiligung des CA3c an der Musterdifferenzierung hat. Da es hierzu jedoch keine weiteren aussagekräftigen Studien gibt und die Ergebnisse der RR 2 hier nicht durch die des Ähnlichkeits-Scores oder der RR 1 bestätigt werden konnten, bleibt dieser Aspekt reine Spekulation und stellt nur eine mögliche Verknüpfung beider Subregionen dar.

### **4.3 Seitendifferenzen in Bezug auf die Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung**

Seitenunterschiede bezogen auf die neuronale Aktivität innerhalb der Hippocampusformation wurden bis dato nur in wenigen Studien zu Tierexperimenten untersucht (El-Gaby et al., 2015, Jake et al., 2019, Martin et al., 2019, Shipton et al., 2014). In einigen der weiteren in dieser Arbeit aufgeführten Studien wurde zwar berichtet, dass lediglich unilaterale histologische Präparate untersucht wurden, bei welchen meist die rechte Großhirnhemisphäre verwendet wurde, doch gab es keine weiterführenden Studien, welche die Ergebnisse mit denen der jeweils anderen Hemisphäre verglichen haben (Gheidi et al., 2012, Lee et al., 2015, Marrone et al., 2011, Satvat et al., 2011, Schmidt et al., 2012b). Ein konkreter Grund, warum in diesen Fällen nur der eine Hippocampus untersucht wurde, wurde nicht genannt. Auch bereits bekannte Hinweise für eine Lateralisation der hippocampalen Funktion wurden hier nicht als Grund genannt und können zum Zeitpunkt dieser Studien noch nicht ausreichend für das murine Gehirn vorgelegen haben.

Im Gegensatz dazu wurde beim Menschen bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass im Seitenvergleich eine deutliche Lateralisation der hippocampalen Funktion vorliegt (Hou et al., 2013, Motley und Kirwan, 2012). In entsprechenden Experimenten zur Musterdifferenzierung, welche mittels funktioneller Magnetresonanztomographie durchgeführt wurden, konnte so unter anderem nachgewiesen werden, dass der rechtsseitige Hippocampus sich im Allgemeinen mehr mit räumlichen Informationen befasst, während der linke zum Beispiel mehr für das semantische Gedächtnis zuständig zu sein scheint (Motley und Kirwan, 2012). Zwar ist das humane Gehirn deutlich komplexer aufgebaut als das murine, doch lassen diese Unterschiede beim Menschen bereits vermuten, dass auch bei der Maus eine Asymmetrie der Funktion bestehen kann.

In dieser Arbeit wurde sowohl die Zellaktivität im Seitenverhältnis betrachtet als auch die Reaktivierung der Neurone mit Berechnung des Ähnlichkeits-Scores. Hiermit konnte nachgewiesen werden, dass die allgemeine Zellaktivität in den betrachteten Anteilen der Hippocampusformation beider Seiten gleich war. Sowohl bei der wiederholten Erkundung eines Kontextes als auch bei der Erkundung zweier verschiedener Umgebungen wurde kein Unterschied in der Größe der aktivierten Neuronenpopulationen im DG oder im CA3 beider Seiten beobachtet (Abbildung 25). Hieraus lässt sich ableiten, dass die betrachteten Anteile der Hippocampusformation in dieser Studie zu gleichen Anteilen an der Verarbeitung der



Informationen beteiligt waren. Solche Ergebnisse stehen nun in einem gewissen Widerspruch zu denen von Jake et al. (2019), welche die Expression des IEGs c-Fos im DG in verschiedenen Situationen untersucht haben. Sowohl Kontrolltiere, welche lediglich ihren normalen Käfig kannten, als auch solche, die im Dunkeln in einem Laufrad gerannt sind, haben keine Lateralisierung der Zellaktivität im DG gezeigt. Wurde Mäusen jedoch ein unbekanntes Objekt in ihre Käfige gestellt, so wurde eine linksseitig vermehrte Expression von c-Fos beobachtet. Diese Ergebnisse belegen einerseits die Relevanz einer seitengetrennten Betrachtung der hippocampalen Aktivität. Andererseits sprechen sie im DG für eine linksseitig führende Verarbeitung von Informationen bei der Erkundung neuer Objekte, was in der hier vorliegenden Arbeit nicht herausgearbeitet werden konnte. Sowohl an dieser Studie als auch an der von Jake et al. (2019) lassen sich jedoch Aspekte ausmachen, welche eine Vergleichbarkeit der Daten etwas erschweren. In der genannten Studie wurden die Mäuse nach der Erkundung des Objekts für mehr als eine Stunde ruhen gelassen, anschließend narkotisiert und die Gehirne mit Paraformaldehyd perfundiert, bevor ihnen diese entnommen wurden. Möglicherweise hatten die zusätzlichen Eindrücke, welche die Mäuse in der Ruhephase sowie bei der Narkotisierung gesammelt haben, einen weiteren Einfluss auf die seitendifferente Zellaktivität. Auf der anderen Seite haben die Mäuse in meiner Arbeit nicht bloß ein neues Objekt in ihrem Käfig erkundet, sondern mehrere Objekte in einer neuen Arena ausgekundschaftet. So könnte auch in dieser Arbeit eine primär linksseitige Verarbeitung der objektbezogenen Informationen stattgefunden haben, welche jedoch durch die Verarbeitung weiterer Eindrücke wie beispielsweise der räumlichen Informationen rechtsseitig maskiert worden sein könnte. Bereits in einer Verhaltensstudie konnte gezeigt werden, dass Mäuse ein rechtsseitig dominantes räumliches Gedächtnis besitzen (Shinohara et al., 2012). Auch wenn dort keine Auswertung einer spezifischen Zellaktivität vorlag und wir somit nicht wissen, welche Gehirnregionen explizit an der Verarbeitung der räumlichen Informationen beteiligt waren, so wissen wir dennoch aus den in Kapitel 1.2.3 aufgeführten Läsionsstudien, dass vor allem der DG für die Verarbeitung dieser verantwortlich ist. Eine Maskierung einer unterschiedlich lateralisierten Zellaktivität kann in dieser Arbeit also nicht ausgeschlossen werden. Ungeachtet dessen, ob die Ergebnisse in dieser Arbeit und jene von Jake et al. (2019) sich widersprechen oder ob sie in einer möglichen Kongruenz stehen, betonen diese jedoch die Relevanz einer seitengetrennten Betrachtung der Verarbeitung räumlicher und objektbezogener Informationen durch den Hippocampus in zukünftigen Studien. Ebenfalls wird hierdurch die Aussagekraft der oben genannten Studien, bei welchen lediglich der rechtsseitige Hippocampus ausgewertet wurde, deutlich eingeschränkt. Eine

Generalisierung der erhaltenen Rückschlüsse aus diesen Studien auf die Funktion der einzelnen Regionen des Hippocampus beider Seiten kann somit nicht erfolgen. Die Deutung der Ergebnisse ermöglicht lediglich, Aussagen über die rechtsseitigen hippocampalen Funktionen zu treffen.

Ein Blick auf Studien der letzten Jahre, welche sich mit der seitendifferenten Funktion des CA3 und seiner Verbindung zum CA1 beschäftigt haben, liefert bereits mehr Informationen über mögliche Unterschiede als es sie bisher für den DG gibt. Zwar gibt es hierzu bisher keine Studien, welche IEGs zur Analyse der Zellaktivität auf Populationsebene angewendet haben, doch wurden verschiedene Funktionsausfälle in Läsionsstudien beobachtet, ebenso wie seitenabhängige Differenzen in Subgruppen spezifischer synaptischer Rezeptoren (El-Gaby et al., 2015, Jordan et al., 2022, Shinohara et al., 2012, Shipton et al., 2014).

Während bei Ratten keine Unterschiede bezüglich einer synaptischen Langzeitpotenzierung beobachtet werden konnten, waren diese bei Mäusen deutlich ersichtlich (Martin et al., 2019, Shipton et al., 2014). Die Langzeitpotenzierung beschreibt eine Modulation von Synapsen, durch welche die Amplitude exzitatorischer postsynaptischer Potenziale deutlich erhöht wird (Pape et al., 2014, S. 833-835). Sie ist hierbei eingangsspezifisch und findet nur an Synapsen statt, an denen das präsynaptische Neuron vereinfacht gesagt zuvor besonders stark oder hochfrequent aktiv war. Solch eine Potenzierung kann schließlich für Stunden bis Wochen anhalten und spielt vor allem wegen ihrer Eingangsspezifität eine wichtige Rolle im Rahmen der Gedächtnisbildung und des Lernens. Sie wurde von Shipton et al. (2014) an der Verbindung vom CA3 zum CA1 näher untersucht, wo sie nach hochfrequenter elektrischer Stimulation einzelner Neurone des CA3 nur dann eine Langzeitpotenzierung an Synapsen zu Neuronen des CA1 beobachten konnten, wenn die Stimulation im linken CA3 stattgefunden hat. Erfolgte diese hingegen im rechten CA3, konnten keine verstärkten postsynaptischen Potenziale registriert werden. Passend zu diesen Daten wurde eine Beeinträchtigung bei Aufgaben, welche das assoziative räumliche Langzeitgedächtnis betrafen, in der gleichen Studie nur dann beobachtet, wenn zuvor das linke CA3 ausgeschaltet wurde, nicht jedoch bei Ausschaltung des rechten. Bekräftigt wurden diese Ansichten in weiteren Studien, die nachgewiesen haben, dass in Neuronen des CA1 linksseitig eine höhere Dichte an bestimmten Subgruppen postsynaptischer Rezeptoren für Neurotransmitter vorliegt, die eine robustere Langzeitpotenzierung durch eingehende Signale aus dem CA3 ermöglichen (Kawakami et al., 2003, Kohl et al., 2011, Shinohara et al., 2008). Kombiniert sprechen diese Resultate für eine größere Relevanz des linksseitigen CA3 bei der Verarbeitung und Speicherung neuer Gedächtnisinhalte. Ebenso haben El-Gaby et al. (2015) in einer Übersichtsarbeit

herausgearbeitet, dass die rechtsseitigen, eher beständigen Synapsen zwischen dem CA3 und dem CA1 eine Konnektivität vorkonfigurierter Zellverbände bilden, welche der räumlichen Repräsentation verschiedener Umgebungen dienen. Eine Verarbeitung neuer Assoziationen mit diesen Repräsentationen würde dann vermehrt durch die plastischeren linksseitigen Synapsen erfolgen.

Übertragen wir solche Schlussfolgerungen auf die Ergebnisse in dieser Arbeit, so lässt sich ein gewisses Korrelat finden. Obwohl sich die allgemeine neuronale Aktivität im CA3 auf beiden Seiten nicht sonderlich unterschieden hat, war rechtsseitig ein deutlich höherer Ähnlichkeits-Score nachweisbar als auf der linken Seite. Dieser Unterschied lag jedoch nur bei wiederholter Erkundung einer Umgebung vor (Gruppe AA; Abbildung 26). Es wurde rechtsseitig also eine ausgeprägtere Reaktivierung von Neuronensembles in einer Situation registriert, in der wir von der Durchführung des Prozesses einer Musterkomplettierung ausgehen. Linksseitig wurden hingegen mehr Neurone aktiviert, die in der zuvor erkundeten Umgebung noch nicht aktiv gewesen waren und damit am ehesten die Verarbeitung neuer Aspekte des zuletzt besuchten Kontextes repräsentieren. Diese könnten in der Gruppe AA beispielsweise durch den anderen Zeitpunkt und eine veränderte Laufstrecke mit anderen Blickwinkeln als bei der ersten Erkundung verkörpert werden. Auf der einen Seite passen diese Ergebnisse damit zur oben beschriebenen, beständigeren neuronalen Aktivität im rechten Hippocampus sowie zur plastischeren und damit vermehrt neue Informationen einbindenden Aktivität im linken Hippocampus. Auf der anderen Seite spiegelt dies die rechts-hemisphärale Dominanz des räumlichen Gedächtnisses wider (Shinohara et al., 2012). Übertragen wir diese Erkenntnisse auf die Theorie von Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung, so entspräche dieser Ansatz einer führenden Musterkomplettierung mit Abrufen bereits bekannter Informationen im rechten CA3 und einer führenden Musterdifferenzierung zur Einbindung neuer Informationen im linken CA3.

Dieses Konzept würde auch den zuvor teils widersprüchlichen Ergebnissen verschiedener Studien gerecht werden, welche dem CA3 entweder eine Musterdifferenzierung oder eine Musterkomplettierung zuschreiben (Knierim und Neunuebel, 2016). Aufgrund einer hier seitendifferenten, parallelen Durchführung beider Funktionen, könnte zum Teil die eine und zum Teil die andere Funktion überwogen haben, was abhängig davon wäre, von welcher Hemisphäre in den jeweiligen Studien mehr Daten zur Auswertung herangezogen wurden.

## **4.4 Rostrokaudale Unterschiede der Zellaktivität und Zellreaktivierung**

Die rostrokaudale Achse des Hippocampus, welche auch als dorsoventrale oder septotemporale Achse bezeichnet wird, zeigt sowohl anatomisch als auch funktionell deutliche Unterschiede in den bis dato durchgeführten Studien. Wie in Kapitel 1.2.1 ausgeführt, bestehen hier starke Gradienten der Zelldichte im DG und dem CA3 mit rostral stark führender Zahl an Körnerzellen im Verhältnis zu Pyramidenzellen des CA3 (Andersen, 2007, S. 55f). Ebenso haben Läsionsstudien, wie in Kapitel 1.2.3.3 beschrieben, sowie einzelne Studien, welche die catFISH verwendet haben, bereits zeigen können, dass vor allem die rostrale im Gegensatz zur kaudalen Hippocampusformation an der Verarbeitung räumlicher Informationen beteiligt ist (Nakamura und Sauvage, 2016). Die hierzu aufgeführten Studien haben jedoch das Charakteristikum gemeinsam, dass sie lediglich die kaudalsten Anteile mit den am weitesten rostral gelegenen verglichen haben. Innerhalb dieser Bereiche fand keine genauere Analyse entlang der jeweiligen Achse statt. In der hier vorliegenden Arbeit wurden nun erstmals die Unterschiede entlang der rostrokaudalen Achse des dorsalen/rostralen Hippocampus untersucht, wodurch weitaus genauere Einblicke in die Differenzen der dortigen Zellaktivität ermöglicht wurden. Um die Ergebnisse nochmal zusammenzufassen, wurden entlang dieser Achse keine nennenswerten Unterschiede der Zellaktivität innerhalb des DG nachgewiesen. Für das CA3 ergab sich jedoch eine deutlich führende Zellaktivität in den am weitesten rostral gelegenen Anteilen (Abbildung 27c, d) sowie ein signifikant höherer Ähnlichkeits-Score im rostralen CA3 (Abbildung 28). Beide Aspekte konnten sowohl in der Gruppe AA als auch in der Gruppe AB registriert werden. Vergleichbare Studien liegen bisher nur sporadisch vor, weshalb ein Vergleich der Daten sich als äußerst schwierig erweist. Lediglich von Maurer et al. (2005) wurde von Ergebnissen berichtet, bei welchen eine vom rostralen zum kaudalen Hippocampus abnehmende Zellaktivität nach Erkundung einer Umgebung nachgewiesen wurde. Ein derartiger Gradient der Zellaktivität wurde hierbei sowohl für den DG als auch für das CA3 und das CA1 beschrieben. Zwar wurde dieser Gradient über die gesamte rostrokaudale Achse nachgewiesen, doch unterstützen die Ergebnisse die Überlegungen aus dieser Arbeit, dass auch innerhalb des rostralen CA3 ein Gradient einer nach kaudal hin abnehmenden neuronalen Aktivität bei räumlichen Gedächtnisprozessen besteht. So untermauern die hier

vorliegenden Ergebnisse nur die Stärke des Gradienten, da er sogar innerhalb eines nur kleinen Anteils der rostrokaudalen Achse nachzuweisen war.

Auch elektrophysiologische Studien wurden zur Ergründung von Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen rostral und kaudal durchgeführt (Long et al., 2015, Maurer et al., 2005, Patel et al., 2013). So wurden in diesen Studien unter anderem die Eigenschaften der bereits in Kapitel 1.2.5.1 und 1.2.5.3 genannten Ortszellen untersucht. Eine Analyse der Zellaktivität ergab, dass die Bereiche, in denen eine Ortszelle aktiv ist, in den rostralen Anteilen des DG, des CA3 und des CA1 deutlich kleiner sind als in den kaudalen. Es besteht hier somit eine bemerkenswert höhere Auflösung der Umgebung, welche nach kaudal im Sinne eines linearen Gefälles immer niedriger wird (Maurer et al., 2005). Darüber hinaus konnten Long et al. (2015) nachweisen, dass die kaudal gelegenen Neurone des DG, CA3 und CA1 bei wiederholter Erkundung einer Umgebung habituieren und ihre Zellaktivität nachlässt. Rostral bleibt die Zellaktivität jedoch weiterhin stark erhöht, was von den Autoren als ständige Verarbeitung der Details einer Umgebung aufgefasst wurde. Inwiefern sich derartige Ergebnisse mit dem signifikant höheren Ähnlichkeits-Score im rostralen CA3 in Einklang bringen lassen, bleibt jedoch unklar. Derzeit gibt es noch keine Studien, welche sich mit der Abgrenzung zwischen Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung innerhalb des rostralen DG und CA3 befassen haben. Wenn wir hier die Höhe des Ähnlichkeits-Scores erneut als Korrelat der Musterkomplettierung bzw. Musterdifferenzierung ansehen, so deuten die Ergebnisse dieser Arbeit erstmalig darauf hin, dass die Musterkomplettierung bevorzugt in den rostralen Anteilen des CA3 im Vergleich zu den kaudalen ausgeführt wird bzw. dass die Musterdifferenzierung bevorzugt in den kaudalen Anteilen verglichen mit den rostralen ausgeführt wird. Dass die Prozesse aber weiterhin alle rostrokaudalen Abschnitte betreffen, auch wenn Gradienten vorzuliegen scheinen, ist an den einheitlich höheren Ähnlichkeits-Scores der Gruppe AA verglichen mit Gruppe AB auf allen Ebenen zu erkennen. Diese sprechen für eine einheitliche Durchführung einer Musterkomplettierung in der Gruppe AA bzw. eine einheitliche Musterdifferenzierung in der Gruppe AB. Hinweise auf Gradienten auf der Basis anatomischer Verbindungen lassen sich aktuell allerdings keine finden. Ob dies also der Wahrheit entspricht und weiter bekräftigt werden kann oder ob es möglicherweise ein Zufall bei nur geringer Fallzahl an Mäusen in dieser Arbeit ist, bleibt in weiteren Studien zu evaluieren. Festhalten lässt sich jedoch, dass die rostral höhere Zellaktivität im CA3 bei Gedächtnisprozessen zu räumlichen Informationen durch die Ergebnisse meiner Arbeit weiter untermauert wird, während im DG im Gegensatz zu den genannten Studien keine Variabilität der Zellaktivität vorlag.

## 4.5 Limitationen

Trotz der zahlreichen interessanten Ergebnisse und den vielen Übereinstimmungen der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen anderer veröffentlichter Studien bleiben auch hier gewisse Einschränkungen ihrer Aussagekraft nicht aus. Wie in Kapitel 1.3 bereits angesprochen, stellt diese Arbeit einen detaillierten Blick auf die Zellaktivität in den einzelnen Regionen des DG und des CA3 dar. Diese beiden Regionen sind jedoch nur zwei einzelne Bereiche der Hippocampusformation, welche zwar Kernaufgaben der hippocampalen Funktionen zu übernehmen scheinen, jedoch kein Gesamtbild der Abläufe innerhalb der Formation betrachten lassen. Da die Musterdifferenzierung des DG und des CA3 eine Trennung der Informationen verschiedener Situationen bezweckt, wäre es ebenfalls von hohem Interesse gewesen, bereits die Zellaktivität des EC als Ausgangspunkt der neuronalen Verbindungen zu diesen Bereichen zu erfassen. Somit hätte die Beobachtung und Analyse der Veränderung der neuronalen Aktivität vom EC zum DG und CA3 eine Quantifizierung der Differenzierung der Ausgangsinformationen auf ihrem Weg erlaubt und damit eine Beurteilung der Effizienz der Musterdifferenzierung beider Bereiche ermöglicht. Gleichzeitig fehlt ebenfalls eine Erfassung der Zellaktivität in den nachgeschalteten Arealen wie dem CA1. So bleibt auch hier aus, Rückschlüsse auf die Weiterverarbeitung der Informationen aus dem DG und CA3 zu ziehen. Unter anderem kann auf diese Weise nicht beurteilt werden, ob im CA1 ebenfalls eine seitendifferente Verarbeitung der Informationen stattfindet oder ob die Informationen von rechtsseitigem und linksseitigem CA3 hier wieder zusammengeführt werden. Es wäre dementsprechend nötig gewesen, auch die Zellaktivität in weiteren Regionen der Hippocampusformation zu erfassen, um ein Gesamtbild zu erlangen. Für diese Bereiche ist die Erfassung der Zellaktivität mittels des IEGs *zif268/egr-1* jedoch noch nicht ausreichend erprobt, um mit validen Ergebnissen rechnen zu können. Somit müsste hier vorerst mit anderen IEGs gearbeitet werden, welche jedoch eine Vergleichbarkeit der dortigen Zellaktivität mit jener im DG und CA3 erschweren würde.

Gehen wir einen Schritt weiter ins Detail, so wurde nur die Zellaktivität im dorsalen DG und CA3 erfasst, während die ventralen Anteile beider Regionen nicht näher untersucht wurden. Zwar war genau dies auch das Ziel der Arbeit, da den dorsalen Anteilen der Hippocampusformation die Verarbeitung von räumlichen Informationen zugesagt wird. Dennoch ist noch nicht geklärt, in welchem Zusammenspiel von dorsalen und ventralen Anteilen möglicherweise die Verarbeitung der räumlichen und zeitlichen Informationen kombiniert mit den emotionalen Aspekten erfolgt, die eher dem ventralen DG und CA3

zugeordnet werden (Bannerman et al., 2002, Hunsaker und Kesner, 2008, Moser und Moser, 1998). Hätten die Ergebnisse dieser Arbeit mehr zu einem Gesamtbild beitragen sollen und nicht nur zu der Verarbeitung rein räumlicher Informationen, so hätten auch die ventralen Anteile untersucht werden müssen.

Betrachten wir die Methode der catFISH, welche hier angewendet wurde, so liefert diese eine sehr gute Auflösung der neuronalen Aktivität auf Zellebene, welche sich über zwei Situationen hinweg verfolgen lässt. Die Methode ermöglicht jedoch nur die Erkenntnis, welche Neurone in welcher Situation aktiv gewesen sind. Wie in Kapitel 1.2.5 ausführlich erläutert, gibt es neben der Musterdifferenzierung auf Populationsebene ebenfalls die Prozesse der Frequenz-Umkartierung bezogen auf die Feuerrate von Neuronen. Da diese in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst wurde, konnten derartigen Aspekte nicht in die Analyse der Prozesse der Musterdifferenzierung mit aufgenommen werden. Grundsätzlich lässt sich diese nur schwer umsetzen, da mit einer Elektrodenimplantation auch immer eine gewisse Schädigung der Strukturen verbunden ist und nicht derart viele Zellen mittels Elektroden erfasst werden, wie mittels der catFISH dargestellt werden können. Eine kombinierte Analyse der Zellaktivität mittels beider Methoden lässt sich damit nicht ermöglichen.

Ein Blick auf den Versuchsaufbau in dieser Arbeit lässt noch weitere kleine Aspekte erkennen, welche ihre Aussagen limitieren. Hierbei sind insbesondere zwei Punkte von Bedeutung. Diese sind die Anzahl der Versuchstiere und die Anzahl der verschiedenen Kontexte. Es wurden jeweils drei Mäuse für die drei Gruppen zur Kontrolle der Methode der catFISH genutzt, während die Versuchsgruppen AA und AB aus jeweils fünf Mäusen bestanden, von denen eine aus der Auswertung ausgeschlossen werden musste. Demzufolge konnten die Prozesse der Musterdifferenzierung und der Musterkomplettierung nur bei neun Versuchstieren analysiert werden, was letztlich nur eine kleine Versuchsgruppe darstellt. Da unsere Ergebnisse bereits hohe Signifikanzen aufgewiesen haben, ist davon auszugehen, dass diese auch bei größeren Gruppen zu beobachten sein würden. Insbesondere kann hier jedoch keine Sicherheit vorliegen, dass die nicht signifikanten Ergebnisse korrekt sind, da für diese evtl. keine ausreichende Power bei kleiner Fallzahl vorliegt. Schließlich muss in weiteren Studien mit entsprechend höherer Zahl an Versuchstieren untersucht werden, ob sich die Schlussfolgerungen aus dieser Arbeit bestätigen lassen. In gleichem Zuge sollte dann auch untersucht werden, ob möglicherweise Geschlechterdifferenzen bei den Prozessen vorliegen, da in dieser Arbeit nur männliche Tiere untersucht wurden, um einen Einfluss stärkerer hormoneller Schwankungen auf die Zellaktivität auszuschließen.

Im Kapitel 1.2.7 wurde neben der Abgrenzung zwischen den grundlegenden Prozessen der Musterdifferenzierung und -komplettierung auch auf ihre Variabilität innerhalb des CA3 hingewiesen, nach welcher sich seine Funktion laut Theorie von Knierim und Neunuebel (2016) je nach der Ähnlichkeit zweier Umgebungen unterschiedlich ausprägen kann. In meiner Arbeit bin ich ferner zu dem Schluss gekommen, dass beide Prozesse vermutlich gleichzeitig in unterschiedlichen Anteilen des CA3 stattfinden können. Aufgrund des Versuchsaufbaus sind hier jedoch nur zwei verschiedene Situationen beurteilbar gewesen. Zum einen war dies die wiederholte Erkundung einer Umgebung. Zum anderen war dies die Erkundung zweier Umgebungen, welche sich zu einem gewissen Grad in ihren lokalen Hinweisen unterschieden haben. Wir haben jedoch keine Informationen darüber erhalten können, ab welcher Ähnlichkeit zweier Kontexte sich diese Aufteilung von Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung einstellt. Es lässt sich bezogen auf die Gruppe AB damit keine Aussage machen, ob der Prozess der Musterdifferenzierung hier bereits zu einer starken Separation beider Neuronensembles geführt hat oder ob sich die Kontexte noch so ähnlich waren, dass diese Gruppen von aktivierten Neuronen bisher nur in geringem Maß voneinander getrennt wurden. Möglicherweise hätte sich bei nur geringen weiteren Unterschieden zwischen Kontext A und Kontext B eine deutlich stärkere Musterdifferenzierung beobachten lassen, welche womöglich noch weitere neue Erkenntnisse offenbart hätte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit bereits detaillierte Einblicke in die Zellaktivität im DG und CA3 geboten hat, in weiteren Studien jedoch mit mehr Versuchstieren und mehreren Kontexten verschiedener Ähnlichkeit gearbeitet werden muss. Zudem wäre es für das Gesamtbild der Funktion der Hippocampusformation wünschenswert auch die vor- und nachgeschalteten Hirnregionen in die Auswertung einzubeziehen und damit mehrere Abschnitte der Informationsprozession beurteilen zu können.



## 4.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Wie in den einleitenden Kapiteln zusammengefasst, ist die Hippocampusformation das zentrale Element der Gedächtnisbildung, -konsolidierung und des Wiederabrufens von Erinnerungen. Die Theorien hierhinter, welche Regionen der Formation beziehungsweise welche Subregionen von diesen für welche Prozesse zuständig sind, hat sich in den vergangenen Jahrzehnten mehrmals gewandelt. Dennoch bleiben die Kernelemente der Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung die elementaren Vorgänge, um Eindrücke und Erinnerungen voneinander zu unterscheiden und diese wieder aufzurufen.

Auch in dieser Arbeit lassen sich als Resümee sowohl die Ergebnisse zahlreicher Studien zur Musterdifferenzierung und Musterkomplettierung bestätigen, was die Zuständigkeit und die Zellaktivität im DG und CA3 angeht, als auch neue Aspekte herausarbeiten, welche in zukünftigen Arbeiten beachtet werden müssen. Es konnte bestätigt werden, dass der DG eine starke Musterdifferenzierung durchführt, welche vor allem durch seine hohe Zellzahl und zeitgleich nur spärliche neuronale Aktivität in einer Situation ermöglicht wird (Rolls, 2016). Ebenso konnte, wie in den vorangegangenen Kapiteln erläutert, eine führende Zellaktivität im spDG im Vergleich zum ipDG nachgewiesen werden. Dennoch belegen die Ergebnisse, dass nicht nur, wie von Chawla et al. (2005) behauptet, der spDG an der Musterdifferenzierung beteiligt ist, sondern auch der ipDG. Welche Stellung die beiden jeweiligen Regionen zueinander und zum nachgeschalteten CA3 besitzen, bleibt allerdings weiterhin unklar.

Nachdem anfänglich nur dem DG die Musterdifferenzierung zugesprochen worden war und das CA3 lediglich der Musterkomplettierung dienen sollte, wurde auch diese Ansicht verlassen und eine deutlich stärkere Kooperation der beiden Bereiche vermutet. Dem DG bleibt weiterhin nur die erstere zuzuordnen. Dem CA3 lassen sich inzwischen jedoch verschiedene Theorien zuordnen, in denen entweder unterschiedliche seiner Anteile verschiedene Aufgaben übernehmen oder es abhängig von der Situation entweder eine Musterdifferenzierung oder eine Musterkomplettierung ausführen kann (Hunsaker et al., 2008, Knierim und Neunuebel, 2016). Letztere stellt die aktuellere Hypothese dar und beschreibt eine Abhängigkeit des auszuführenden Prozesses von der Ähnlichkeit zweier Situationen oder Umgebungen. Der Interpretation der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit zufolge könnten jedoch sowohl die Musterdifferenzierung als auch die Musterkomplettierung zeitgleich stattfinden, was auch mit dem Ablauf des Wahrnehmens einer Situation deutlich besser zu vereinbaren wäre. So findet beim Erleben zweier ähnlicher Umgebungen eine Musterkomplettierung statt, durch welche sich ein Individuum an die zuerst erfahrene

erinnert, und ebenso eine parallele Musterdifferenzierung, durch welche das Individuum dazu in der Lage ist, die zweite von der ersten Umgebung zu unterscheiden und sowohl die Gemeinsamkeiten als auch die Differenzen zu definieren. Dieser parallelen Verarbeitung ungeachtet bleibt es dennoch bei unterschiedlichen Funktionen der Subregionen des CA3, bei denen bestätigt werden konnte, dass das CA3c auch an der Musterdifferenzierung des DG partizipiert. Hingegen distanziert sich das CA3b/a zunehmend von der Funktion des DG und dient der dargelegten parallelen Durchführung beider Prozesse mit führender Musterkomplettierung.

Eine weitere der neuen Erkenntnisse liegt schließlich darin, dass diese parallelen Prozesse möglicherweise seitengetrennt in den Hippocampusformationen oder zumindest in Anteilen von ihnen durchgeführt werden. Nachdem bereits beim Menschen eine seitenunterschiedliche Aufgabenzuordnung beobachtet werden konnte und es auch bei Maus und Ratte erste Hinweise auf hemisphärale Unterschiede gab, konnte in dieser Arbeit erstmals eine seitendifferente Funktion des CA3 auf Ebene der Zellaktivität nachgewiesen werden (El-Gaby et al., 2015, Motley und Kirwan, 2012, Shipton et al., 2014). Demzufolge findet im rechtsseitigen CA3 eine führende Musterkomplettierung statt, während linksseitig die Musterdifferenzierung unter betonten Plastizitätsvorgängen dominiert.

Neben diesen hemisphäralen Unterschieden sind seit Jahrzehnten verschiedene Aufgaben der dorsalen und ventralen Anteile der Hippocampusformation bekannt, was in unterschiedlichen Studien bereits belegt wurde (Bannerman et al., 2002, Bannerman et al., 2004, Moser und Moser, 1998). Laut diesen findet in den dorsalen Anteilen vornehmlich eine Verarbeitung räumlicher Informationen statt, während ventral vor allem emotionale Aspekte prozessiert werden. Den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit zufolge bestehen jedoch selbst innerhalb des dorsalen CA3 Unterschiede bezogen auf die Zellaktivität und die Aufgabenverteilung. So wurde eine rostrale Betonung der Zellaktivität sowie eine rostral führende Musterkomplettierung im Verhältnis zu den kaudaleren Anteilen des dorsalen CA3 nachgewiesen.

In Zusammenschau dieser teils neuen und teils bekannten Aspekte scheint es, dass eine deutlich feinere Differenzierung zwischen den Aufgaben der einzelnen Subregionen des DG und des CA3 erfolgen muss. Hierbei darf jedoch nicht einfach unterschieden werden, welche Region fest welchem Prozess zuzuordnen ist. Vielmehr muss in zukünftigen Studien untersucht werden, wie variabel die Funktion vor allem des distalen CA3 ist oder auch zu welchem Zeitpunkt beziehungsweise bei welchen räumlichen Informationen die einzelnen Regionen welchen Prozess zu welchem Grad ausführen und welche Prozesse zeitgleich

ablaufen. Darüber hinaus gilt es zukünftig zu beachten, dass eine äußerst feine Differenzierung zwischen den rostrokaudalen Ebenen der einzelnen Bereiche erfolgen muss, ebenso wie eine Unterscheidung zwischen den Subregionen des Hippocampus beider Seiten. Diese Erkenntnisse stellen zwar nur einen kleinen Aspekt bei der Ergründung der Funktionsweise des murinen und erst recht des menschlichen Gehirns dar, doch zeigt uns diese Arbeit, wie stark die kleinsten Regionen des Gehirns vernetzt sind und mit wie viel Feingefühl und Präzision die weitere Forschung an diesen erfolgen muss.

## 5 Zusammenfassung

Die Hippocampusformation verkörpert die zentralen Hirnregionen, welche für die Gedächtnisbildung, -konsolidierung und das Abrufen von Erinnerungen zuständig sind. Zentrale Prozesse der Regionen des Gyrus dentatus (DG) und des Cornu ammonis 3 (CA3) sind in diesem Rahmen die Musterdifferenzierung und die Musterkomplettierung. Erstere beschreibt die Unterscheidung bekannter und unbekannter Informationen wie auch Umgebungen durch die Aktivierung verschiedener, sich je nach Ähnlichkeit der Informationen stärker oder weniger überlappender Gruppen von Neuronen. Sie wird in erster Linie dem DG zugewiesen. Die Musterkomplettierung hingegen beschreibt das Wiederabrufen einer Erinnerung durch die Reaktivierung der entsprechenden Gruppe von Neuronen vornehmlich im CA3, auch wenn nicht alle dieser Eindrücke erneut präsentiert werden. Eine Debatte der letzten Jahrzehnte besteht jedoch um die genaue Zuordnung dieser Prozesse zu den Subregionen des DG und des CA3.

Das Ziel dieser Arbeit bestand nun in der einheitlichen und detaillierten Analyse der Zellaktivität auf der Ebene von Neuronenpopulationen in den dorsalen Anteilen eben dieser Subregionen, wenn Mäuse zwei sich zu einem gewissen Grad unterscheidenden Umgebungen ausgesetzt wurden. Besonderer Fokus lag hierbei auf der Analyse der Kooperation und differentiellen Verarbeitung von Informationen von einzelnen Subregionen. Ebenso sollten konkrete Seitenunterschiede zwischen den Regionen beider Hemisphären sowie zwischen verschiedenen rostrokaudalen Ebenen untersucht werden.

Für dieses Experiment wurden verschiedene Gruppen von Mäusen entweder wiederholt der gleichen Umgebung oder nacheinander zwei sich anteilig ähnelnden Umgebungen ausgesetzt. Die Zellaktivität wurde anschließend mittels der zellulären Kompartimentanalyse der zeitlichen Aktivität mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (catFISH) an Gewebeschnitten der entsprechenden Hirnbereiche detektiert. Für diese sollte erstmals einheitlich über beide Regionen hinweg das unmittelbar exprimierte Gen (immediate-early gene) *zif268/egr-1* verwendet werden, um eine Vergleichbarkeit der Daten zwischen dem DG und dem CA3 zu erreichen. Hierbei sollte die gleichzeitige Anwendung einer prä-mRNA-Sonde und einer Sonde für die gesamte Länge der mRNA von *zif268/egr-1* getestet werden, um eine Kontrolle der jeweils anderen Sonde zu etablieren. Aufbauend auf dieser Methode konnte zwischen Neuronen, welche ca. 30 min vor dem Exitus einer Maus, und solchen, die 5 min vor diesem aktiv waren, unterschieden werden. Die Auswertung der Daten erfolgte anhand des Anteils

aktivierter Zellen an allen detektierten Neuronen sowie durch die Anwendung eines in der Literatur etablierten Ähnlichkeits-Scores.

Die Auswertungen ergaben, dass sowohl die Subregionen des DG (suprapyramidaler und infrapyramidaler Schenkel; spDG und ipDG) als auch die des CA3 (CA3c; CA3b; CA3a) an einer deutlichen Separation der aktiven Neuronensembles bei der Erkundung verschiedener Umgebungen beigetragen haben. So konnte hier in allen ein niedrigerer Ähnlichkeits-Score nachgewiesen werden, als es der Fall war, wenn wiederholt der gleiche Kontext erkundet wurde (spDG:  $p < 0.0001$ ; ipDG:  $p = 0.0223$ ; CA3c:  $p = 0.0079$ ; CA3b:  $p < 0.0001$ ; CA3a:  $p = 0.0007$ ). Die Größe der Neuronensembles zeigte in keiner der Situationen eine relevante Veränderung ( $p > 0.05$ ). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in einer Umgebung im CA3 etwa ein vierfach höherer Anteil der Neurone im Vergleich zum DG aktiviert wurde. Ein weiterer Vergleich zwischen dem DG und dem CA3 brachte außerdem hervor, dass für das CA3b/a ( $p = 0.0273$ ), nicht aber für das CA3c ( $p > 0.05$ ) ein signifikant höherer Ähnlichkeits-Score für eine Reexploration vorlag als für den DG. Betrachtet man die Ergebnisse aufgetrennt nach Hemisphären, so war die allgemeine Zellaktivität im DG und CA3 gleich ( $p > 0.05$ ), die Ähnlichkeits-Scores waren für das CA3 bei einer Reexploration einer Umgebung für die rechte Seite deutlich höher (Gruppe AA:  $p = 0.0004$ ). Ähnlich konnte eine rostral betonte Zellaktivität in einzelnen Subregionen und ein rostral höherer Ähnlichkeits-Score für das CA3 (AA:  $p = 0.0006$ ; AB:  $p = 0.0181$ ) in beiden Gruppen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend demonstrieren diese Ergebnisse, dass nicht nur der DG, sondern auch alle Subregionen des CA3 an einer Musterdifferenzierung teilnehmen können. Besonders zu betonen ist hierbei, dass entgegen der bisherigen Literatur nicht nur der spDG, sondern auch der ipDG diesen Prozess auszuführen vermag. Der DG allgemein scheint in diesem Rahmen auch mit dem CA3c zu kooperieren, was durch die analogen Werte des Ähnlichkeits-Scores ausgesagt wird. Gleichzeitig scheint das CA3 mit Betonung des CA3b/a jedoch nicht nur eine Musterdifferenzierung, sondern auch eine Musterkomplettierung durchzuführen. Insbesondere die Seitenunterschiede lassen darauf schließen, dass laut unseren Ergebnissen eine rechtsseitig führende Musterkomplettierung und entgegengesetzt eine linksseitig führende Musterdifferenzierung im CA3 stattfindet. Dies eröffnet eine völlig neue Sichtweise auf die Verarbeitung räumlicher Informationen, da bisher davon ausgegangen wurde, dass vom CA3 immer nur einer dieser Prozesse zu einem Zeitpunkt ausgeführt wird. Auch die Unterschiede innerhalb der rostrokaudalen Achse des dorsalen CA3 demonstrieren, mit wie viel mehr Genauigkeit in zukünftigen Studien die hippocampale Funktion in den einzelnen Subregionen untersucht werden muss, als es in der bisherigen Literatur meist der Fall gewesen ist.

## 6 Literaturverzeichnis

- ACSADY, L., KAMONDI, A., SIK, A., FREUND, T. & BUZSAKI, G. (1998) GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the rat hippocampus. *J Neurosci*, 18, 3386-403.
- ALME, C. B., BUZZETTI, R. A., MARRONE, D. F., LEUTGEB, J. K., CHAWLA, M. K., SCHANER, M. J., BOHANICK, J. D., KHOBOKO, T., LEUTGEB, S., MOSER, E. I., MOSER, M. B., MCNAUGHTON, B. L. & BARNES, C. A. (2010) Hippocampal granule cells opt for early retirement. *Hippocampus*, 20, 1109-23.
- AMARAL, D. G. (1978) A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J Comp Neurol*, 182, 851-914.
- AMARAL, D. G. & WITTER, M. P. (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31, 571-91.
- ANDERSEN, P. 2007. *The hippocampus book*, Oxford ; New York, Oxford University Press.
- BANNERMAN, D. M., DEACON, R. M., OFFEN, S., FRISWELL, J., GRUBB, M. & RAWLINS, J. N. (2002) Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. *Behav Neurosci*, 116, 884-901.
- BANNERMAN, D. M., RAWLINS, J. N., MCHUGH, S. B., DEACON, R. M., YEE, B. K., BAST, T., ZHANG, W. N., POTHUIZEN, H. H. & FELDON, J. (2004) Regional dissociations within the hippocampus--memory and anxiety. *Neurosci Biobehav Rev*, 28, 273-83.
- BEER, Z., VAVRA, P., ATUCHA, E., RENTZING, K., HEINZE, H. J. & SAUVAGE, M. M. (2018) The memory for time and space differentially engages the proximal and distal parts of the hippocampal subfields CA1 and CA3. *PLoS Biol*, 16, e2006100.
- BLACKSTAD, T. W. (1956) Commissural connections of the hippocampal region in the rat, with special reference to their mode of termination. *J Comp Neurol*, 105, 417-537.
- BRAMHAM, C. R., WORLEY, P. F., MOORE, M. J. & GUZOWSKI, J. F. (2008) The Immediate Early Gene Arc/Arg3.1: Regulation, Mechanisms, and Function. *Journal of Neuroscience*, 28, 11760-11767.
- CHAWLA, M. K., GUZOWSKI, J. F., RAMIREZ-AMAYA, V., LIPA, P., HOFFMAN, K. L., MARRIOTT, L. K., WORLEY, P. F., MCNAUGHTON, B. L. & BARNES, C. A. (2005) Sparse, environmentally selective expression of Arc RNA in the upper blade of the rodent fascia dentata by brief spatial experience. *Hippocampus*, 15, 579-86.
- CHAWLA, M. K., SUTHERLAND, V. L., OLSON, K., MCNAUGHTON, B. L. & BARNES, C. A. (2018) Behavior-driven arc expression is reduced in all ventral hippocampal subfields compared to CA1, CA3, and dentate gyrus in rat dorsal hippocampus. *Hippocampus*, 28, 178-185.

- CHEN, S., HE, L., HUANG, A. J. Y., BOEHRINGER, R., ROBERT, V., WINTZER, M. E., POLYGALOV, D., WEITEMIER, A. Z., TAO, Y., GU, M., MIDDLETON, S. J., NAMIKI, K., HAMA, H., THERREAU, L., CHEVALEYRE, V., HIOKI, H., MIYAWAKI, A., PISKOROWSKI, R. A. & MCHUGH, T. J. (2020) A hypothalamic novelty signal modulates hippocampal memory. *Nature*, 586, 270-274.
- DANIELSON, N. B., KAIFOSH, P., ZAREMBA, J. D., LOVETT-BARRON, M., TSAI, J., DENNY, C. A., BALOUGH, E. M., GOLDBERG, A. R., DREW, L. J., HEN, R., LOSONCZY, A. & KHEIRBEK, M. A. (2016) Distinct Contribution of Adult-Born Hippocampal Granule Cells to Context Encoding. *Neuron*, 90, 101-12.
- DANIELSON, N. B., TURI, G. F., LADOW, M., CHAVLIS, S., PETRANTONAKIS, P. C., POIRAZI, P. & LOSONCZY, A. (2017) In Vivo Imaging of Dentate Gyrus Mossy Cells in Behaving Mice. *Neuron*, 93, 552-559 e4.
- DOSSANI, R. H., MISSIOS, S. & NANDA, A. (2015) The Legacy of Henry Molaison (1926-2008) and the Impact of His Bilateral Mesial Temporal Lobe Surgery on the Study of Human Memory. *World Neurosurg*, 84, 1127-35.
- DUCLOT, F. & KABBAJ, M. (2017) The Role of Early Growth Response 1 (EGR1) in Brain Plasticity and Neuropsychiatric Disorders. *Front Behav Neurosci*, 11, 35.
- EL-GABY, M., SHIPTON, O. A. & PAULSEN, O. (2015) Synaptic Plasticity and Memory. *The Neuroscientist*, 21, 490-502.
- FLASBECK, V., ATUCHA, E., NAKAMURA, N. H., YOSHIDA, M. & SAUVAGE, M. M. (2018) Spatial information is preferentially processed by the distal part of CA3: Implication for memory retrieval. *Behav Brain Res*, 354, 31-38.
- FREUND, T. F. & BUZSAKI, G. (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6, 347-470.
- GHEIDI, A., AZZOPARDI, E., ADAMS, A. A. & MARRONE, D. F. (2013) Experience-dependent persistent expression of zif268 during rest is preserved in the aged dentate gyrus. *BMC Neurosci*, 14, 100.
- GHEIDI, A., SATVAT, E. & MARRONE, D. F. (2012) Experience-dependent recruitment of Arc expression in multiple systems during rest. *Journal of Neuroscience Research*, 90, 1820-1829.
- GILBERT, P. E., KESNER, R. P. & LEE, I. (2001) Dissociating hippocampal subregions: double dissociation between dentate gyrus and CA1. *Hippocampus*, 11, 626-36.
- GOODRICH-HUNSAKER, N. J., HUNSAKER, M. R. & KESNER, R. P. (2008) The interactions and dissociations of the dorsal hippocampus subregions: how the dentate gyrus, CA3, and CA1 process spatial information. *Behav Neurosci*, 122, 16-26.

- GOODSMITH, D., CHEN, X., WANG, C., KIM, S. H., SONG, H., BURGALOSS, A., CHRISTIAN, K. M. & KNIERIM, J. J. (2017) Spatial Representations of Granule Cells and Mossy Cells of the Dentate Gyrus. *Neuron*, 93, 677-690 e5.
- GOODSMITH, D., LEE, H., NEUNUEBEL, J. P., SONG, H. & KNIERIM, J. J. (2019) Dentate Gyrus Mossy Cells Share a Role in Pattern Separation with Dentate Granule Cells and Proximal CA3 Pyramidal Cells. *The Journal of Neuroscience*, 39, 9570-9584.
- GRELLA, S. L., NEIL, J. M., EDISON, H. T., STRONG, V. D., ODINTSOVA, I. V., WALLING, S. G., MARTIN, G. M., MARRONE, D. F. & HARLEY, C. W. (2019) Locus Coeruleus Phasic, But Not Tonic, Activation Initiates Global Remapping in a Familiar Environment. *The Journal of Neuroscience*, 39, 445-455.
- GRIMM, R., SCHICKNICK, H., RIEDE, I., GUNDELFINGER, E. D., HERDEGEN, T., ZUSCHRATTER, W. & TISCHMEYER, W. (1997) Suppression of c-fos induction in rat brain impairs retention of a brightness discrimination reaction. *Learn Mem*, 3, 402-13.
- GUZOWSKI, J. F., LYFORD, G. L., STEVENSON, G. D., HOUSTON, F. P., MCGAUGH, J. L., WORLEY, P. F. & BARNES, C. A. (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci*, 20, 3993-4001.
- GUZOWSKI, J. F., MCNAUGHTON, B. L., BARNES, C. A. & WORLEY, P. F. (1999) Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci*, 2, 1120-4.
- GUZOWSKI, J. F., SETLOW, B., WAGNER, E. K. & MCGAUGH, J. L. (2001) Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci*, 21, 5089-98.
- HOANG, T.-H., ALIANE, V. & MANAHAN-VAUGHAN, D. (2018) Novel encoding and updating of positional, or directional, spatial cues are processed by distinct hippocampal subfields: Evidence for parallel information processing and the “what” stream. *Hippocampus*, 28, 315-326.
- HORN, F. 2018. Biochemie des Menschen. 7., korr. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- HOU, G., YANG, X. & YUAN, T. F. (2013) Hippocampal asymmetry: differences in structures and functions. *Neurochem Res*, 38, 453-60.
- HUNSAKER, M. R. & KESNER, R. P. (2008) Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. *Neurobiol Learn Mem*, 89, 61-9.
- HUNSAKER, M. R., ROSENBERG, J. S. & KESNER, R. P. (2008) The role of the dentate gyrus, CA3a,b, and CA3c for detecting spatial and environmental novelty. *Hippocampus*, 18, 1064-73.



- ISHIZUKA, N., WEBER, J. & AMARAL, D. G. (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol*, 295, 580-623.
- JAKE, M & CAROLYN (2019) Behavioral state-dependent lateralization of dorsal dentate gyrus c-Fos expression in mice. *Neuronal Signaling*, 3, NS20180206.
- JONES, M. W., ERRINGTON, M. L., FRENCH, P. J., FINE, A., BLISS, T. V., GAREL, S., CHARNAY, P., BOZON, B., LAROCHE, S. & DAVIS, S. (2001) A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat Neurosci*, 4, 289-96.
- JORDAN, J. T., TONG, Y. & PYTTE, C. L. (2022) Transection of the ventral hippocampal commissure impairs spatial reference but not contextual or spatial working memory. *Learn Mem*, 29, 29-37.
- JUNG, M. W. & MCNAUGHTON, B. L. (1993) Spatial selectivity of unit activity in the hippocampal granular layer. *Hippocampus*, 3, 165-82.
- KAWAKAMI, R., SHINOHARA, Y., KATO, Y., SUGIYAMA, H., SHIGEMOTO, R. & ITO, I. (2003) Asymmetrical allocation of NMDA receptor epsilon2 subunits in hippocampal circuitry. *Science*, 300, 990-4.
- KESNER, R. P. (2007) Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learning & Memory*, 14, 771-781.
- KESNER, R. P. (2013) A process analysis of the CA3 subregion of the hippocampus. *Front Cell Neurosci*, 7, 78.
- KESNER, R. P. (2018) An analysis of dentate gyrus function (an update). *Behav Brain Res*, 354, 84-91.
- KESNER, R. P. & ROLLS, E. T. (2015) A computational theory of hippocampal function, and tests of the theory: new developments. *Neurosci Biobehav Rev*, 48, 92-147.
- KNIERIM, J. J. & NEUNUEBEL, J. P. (2016) Tracking the flow of hippocampal computation: Pattern separation, pattern completion, and attractor dynamics. *Neurobiology of Learning and Memory*, 129, 38-49.
- KOHL, M. M., SHIPTON, O. A., DEACON, R. M., RAWLINS, J. N., DEISSEROTH, K. & PAULSEN, O. (2011) Hemisphere-specific optogenetic stimulation reveals left-right asymmetry of hippocampal plasticity. *Nat Neurosci*, 14, 1413-5.
- KUBIK, S., MIYASHITA, T. & GUZOWSKI, J. F. (2007) Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn Mem*, 14, 758-70.
- LEE, H., GOODSMITH, D. & KNIERIM, J. J. (2020) Parallel processing streams in the hippocampus. *Curr Opin Neurobiol*, 64, 127-134.

- LEE, H., WANG, C., DESHMUKH, S. S. & KNIERIM, J. J. (2015) Neural Population Evidence of Functional Heterogeneity along the CA3 Transverse Axis: Pattern Completion versus Pattern Separation. *Neuron*, 87, 1093-105.
- LEUTGEB, J. K., LEUTGEB, S., MOSER, M. B. & MOSER, E. I. (2007) Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus. *Science*, 315, 961-6.
- LEUTGEB, S., LEUTGEB, J. K., BARNES, C. A., MOSER, E. I., MCNAUGHTON, B. L. & MOSER, M. B. (2005) Independent codes for spatial and episodic memory in hippocampal neuronal ensembles. *Science*, 309, 619-23.
- LI, L., CARTER, J., GAO, X., WHITEHEAD, J. & TOURTELLOTT, W. G. (2005) The Neuroplasticity-Associated Arc Gene Is a Direct Transcriptional Target of Early Growth Response (Egr) Transcription Factors. *Molecular and Cellular Biology*, 25, 10286-10300.
- LI, X. G., SOMOGYI, P., YLINEN, A. & BUZSAKI, G. (1994) The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol*, 339, 181-208.
- LONG, L. L., BUNCE, J. G. & CHROBAK, J. J. (2015) Theta variation and spatiotemporal scaling along the septotemporal axis of the hippocampus. *Front Syst Neurosci*, 9, 37.
- LU, L., IGARASHI, K. M., WITTER, M. P., MOSER, E. I. & MOSER, M. B. (2015) Topography of Place Maps along the CA3-to-CA2 Axis of the Hippocampus. *Neuron*, 87, 1078-92.
- MAPLE, A., LACKIE, R. E., ELIZALDE, D. I., GRELLA, S. L., DAMPHOUSSE, C. C., XA, C., GALLITANO, A. L. & MARRONE, D. F. (2017) Attenuated Late-Phase Arc Transcription in the Dentate Gyrus of Mice Lacking Egr3. *Neural Plast*, 2017, 6063048.
- MARR, D. (1971) Simple memory: a theory for archicortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 262, 23-81.
- MARRONE, D. F., ADAMS, A. A. & SATVAT, E. (2011) Increased pattern separation in the aged fascia dentata. *Neurobiol Aging*, 32, 2317 e23-32.
- MARRONE, D. F., SATVAT, E., ODINTSOVA, I. V. & GHEIDI, A. (2014) Dissociation of spatial representations within hippocampal region CA3. *Hippocampus*, 24, 1417-20.
- MARTIN, S. J., SHIRES, K. L. & DA SILVA, B. M. (2019) Hippocampal Lateralization and Synaptic Plasticity in the Intact Rat: No Left-Right Asymmetry in Electrically Induced CA3-CA1 Long-Term Potentiation. *Neuroscience*, 397, 147-158.
- MAURER, A. P., VANRHOADS, S. R., SUTHERLAND, G. R., LIPA, P. & MCNAUGHTON, B. L. (2005) Self-motion and the origin of differential spatial scaling along the septotemporal axis of the hippocampus. *Hippocampus*, 15, 841-52.
- MCHUGH, T. J., JONES, M. W., QUINN, J. J., BALTHASAR, N., COPPARI, R., ELMQUIST, J. K., LOWELL, B. B., FANSELOW, M. S., WILSON, M. A. & TONEGAWA, S. (2007) Dentate

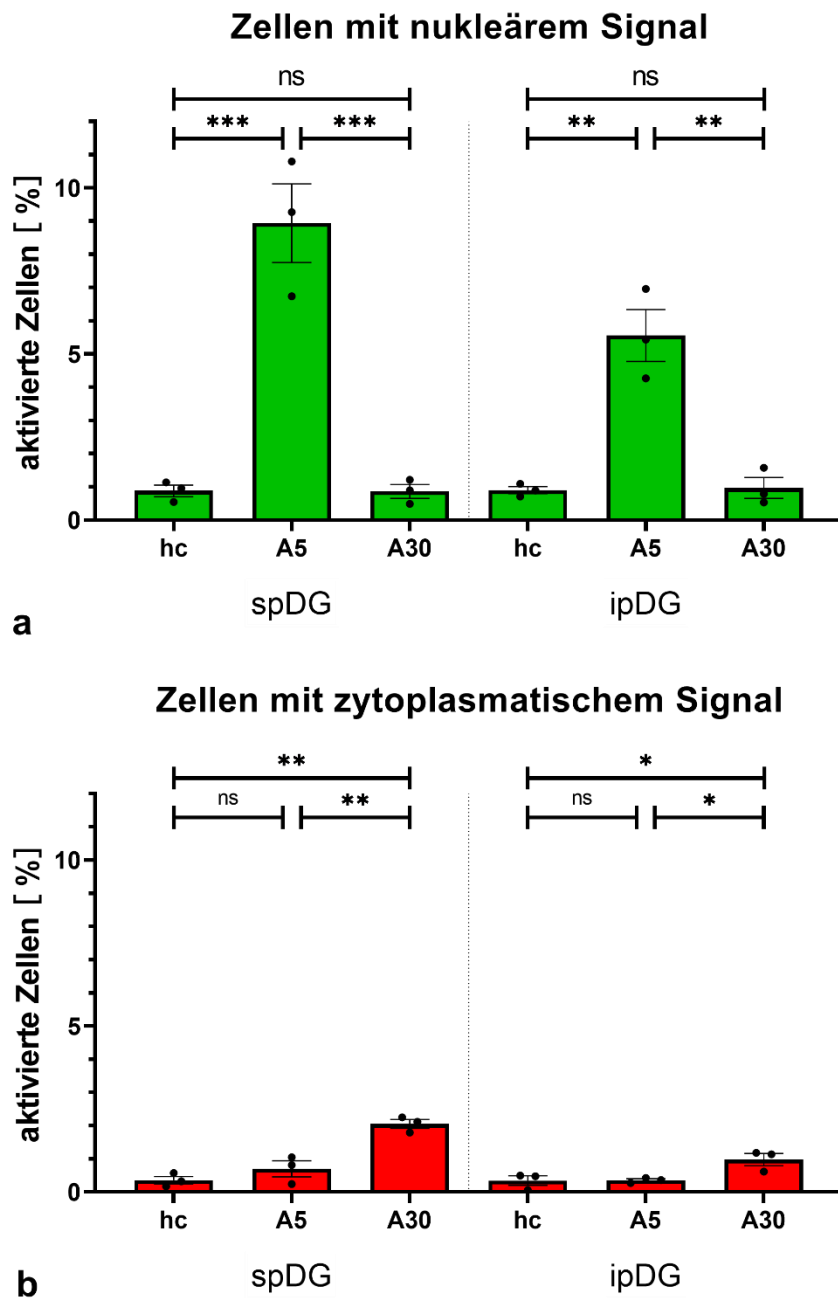
- gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science*, 317, 94-9.
- MEYER, M. A. A. & RADULOVIC, J. (2021) Functional differentiation in the transverse plane of the hippocampus: An update on activity segregation within the DG and CA3 subfields. *Brain Res Bull*, 171, 35-43.
- MINATOHARA, K., AKIYOSHI, M. & OKUNO, H. (2015) Role of Immediate-Early Genes in Synaptic Plasticity and Neuronal Ensembles Underlying the Memory Trace. *Front Mol Neurosci*, 8, 78.
- MOSER, E., MOSER, M. B. & ANDERSEN, P. (1993) Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci*, 13, 3916-25.
- MOSER, M. B. & MOSER, E. I. (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8, 608-19.
- MOSER, M. B., MOSER, E. I., FORREST, E., ANDERSEN, P. & MORRIS, R. G. (1995) Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9697-701.
- MOTLEY, S. E. & KIRWAN, C. B. (2012) A parametric investigation of pattern separation processes in the medial temporal lobe. *J Neurosci*, 32, 13076-85.
- NAKAMURA, N. H., FUKUNAGA, M., AKAMA, K. T., SOGA, T., OGAWA, S. & PAVLIDES, C. (2010) Hippocampal cells encode places by forming small anatomical clusters. *Neuroscience*, 166, 994-1007.
- NAKAMURA, N. H. & SAUVAGE, M. M. (2016) Encoding and reactivation patterns predictive of successful memory performance are topographically organized along the longitudinal axis of the hippocampus. *Hippocampus*, 26, 67-75.
- NAKAZAWA, K., QUIRK, M. C., CHITWOOD, R. A., WATANABE, M., YECKEL, M. F., SUN, L. D., KATO, A., CARR, C. A., JOHNSTON, D., WILSON, M. A. & TONEGAWA, S. (2002) Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science*, 297, 211-8.
- NEUNUEBEL, J. P. & KNIERIM, J. J. (2014) CA3 retrieves coherent representations from degraded input: direct evidence for CA3 pattern completion and dentate gyrus pattern separation. *Neuron*, 81, 416-27.
- NÓ, R. L. (1934) Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *Journal für Psychologie und Neurologie*, 46, 113-175.
- PAPE, H.-C., KLINKE, R., BRENNER, B. & SILBERNAGL, S. (2014) Physiologie. 7., vollst. überarb. und erw. *Georg Thieme Verlag KG., Stuttgart*.

- PATEL, J., SCHOMBURG, E. W., BERENYI, A., FUJISAWA, S. & BUZSAKI, G. (2013) Local generation and propagation of ripples along the septotemporal axis of the hippocampus. *J Neurosci*, 33, 17029-41.
- PAXINOS, G., FRANKLIN, K. & FRANKLIN, K. (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd edn Academic Press. *San Diego*.
- RAMIREZ-AMAYA, V., ANGULO-PERKINS, A., CHAWLA, M. K., BARNES, C. A. & ROSI, S. (2013) Sustained transcription of the immediate early gene Arc in the dentate gyrus after spatial exploration. *J Neurosci*, 33, 1631-9.
- ROLLS, E. T. (2016) Pattern separation, completion, and categorisation in the hippocampus and neocortex. *Neurobiol Learn Mem*, 129, 4-28.
- ROLLS, E. T. & KESNER, R. P. (2006) A computational theory of hippocampal function, and empirical tests of the theory. *Prog Neurobiol*, 79, 1-48.
- SATVAT, E., SCHMIDT, B., ARGRAVES, M., MARRONE, D. F. & MARKUS, E. J. (2011) Changes in task demands alter the pattern of zif268 expression in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 31, 7163-7.
- SCHARFMAN, H. E. (2007) The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 163, 627-37.
- SCHMIDT, B., MARRONE, D. F. & MARKUS, E. J. (2012a) Disambiguating the similar: the dentate gyrus and pattern separation. *Behav Brain Res*, 226, 56-65.
- SCHMIDT, B., SATVAT, E., ARGRAVES, M., MARKUS, E. J. & MARRONE, D. F. (2012b) Cognitive demands induce selective hippocampal reorganization: Arc expression in a place and response task. *Hippocampus*, 22, 2114-2126.
- SCHMILL, L. P., BOHLE, K., ROHRDANZ, N., SCHIFFELHOLZ, T., BALUEVA, K. & WULFF, P. (2023) Regional and interhemispheric differences of neuronal representations in dentate gyrus and CA3 inferred from expression of zif268. *Sci Rep*, 13, 18443.
- SCOVILLE, W. B. & MILNER, B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20, 11-21.
- SENZAI, Y. & BUZSAKI, G. (2017) Physiological Properties and Behavioral Correlates of Hippocampal Granule Cells and Mossy Cells. *Neuron*, 93, 691-704 e5.
- SHI, Y., GRIECO, S. F., HOLMES, T. C. & XU, X. (2019) Development of Local Circuit Connections to Hilar Mossy Cells in the Mouse Dentate Gyrus. *eneuro*, 6, ENEURO.0370-18.
- SHINOHARA, Y., HIRASE, H., WATANABE, M., ITAKURA, M., TAKAHASHI, M. & SHIGEMOTO, R. (2008) Left-right asymmetry of the hippocampal synapses with differential subunit allocation of glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 19498-503.

- SHINOHARA, Y., HOSOYA, A., YAMASAKI, N., AHMED, H., HATTORI, S., EGUCHI, M., YAMAGUCHI, S., MIYAKAWA, T., HIRASE, H. & SHIGEMOTO, R. (2012) Right-hemispheric dominance of spatial memory in split-brain mice. *Hippocampus*, 22, 117-121.
- SHIPTON, O. A., EL-GABY, M., APERGIS-SCHOUTE, J., DEISSEROTH, K., BANNERMAN, D. M., PAULSEN, O. & KOHL, M. M. (2014) Left–right dissociation of hippocampal memory processes in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 15238-15243.
- SNYDER, J. S., RADIK, R., WOJTOWICZ, J. M. & CAMERON, H. A. (2009) Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus*, 19, 360-70.
- TAMAMAKI, N. (1997) Organization of the entorhinal projection to the rat dentate gyrus revealed by Dil anterograde labeling. *Exp Brain Res*, 116, 250-8.
- TANIOUS, F. A., VEAL, J. M., BUCZAK, H., RATMEYER, L. S. & WILSON, W. D. (1992) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry*, 31, 3103-12.
- TREVES, A. & ROLLS, E. T. (1994) Computational analysis of the role of the hippocampus in memory. *Hippocampus*, 4, 374-91.
- VAN GROEN, T., MIETTINEN, P. & KADISH, I. (2003) The entorhinal cortex of the mouse: organization of the projection to the hippocampal formation. *Hippocampus*, 13, 133-49.
- VAZDARJANOVA, A. & GUZOWSKI, J. F. (2004) Differences in hippocampal neuronal population responses to modifications of an environmental context: evidence for distinct, yet complementary, functions of CA3 and CA1 ensembles. *J Neurosci*, 24, 6489-96.
- WITTER, M. P. (1993) Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus*, 3 Spec No, 33-44.
- WITTER, M. P. (2007a) Intrinsic and extrinsic wiring of CA3: indications for connectional heterogeneity. *Learn Mem*, 14, 705-13.
- WITTER, M. P. (2007b) The perforant path: projections from the entorhinal cortex to the dentate gyrus. *Prog Brain Res*, 163, 43-61.
- WITTER, M. P., DOAN, T. P., JACOBSEN, B., NILSEN, E. S. & OHARA, S. (2017) Architecture of the Entorhinal Cortex A Review of Entorhinal Anatomy in Rodents with Some Comparative Notes. *Front Syst Neurosci*, 11, 46.
- WITTER, M. P. & MOSER, E. I. (2006) Spatial representation and the architecture of the entorhinal cortex. *Trends Neurosci*, 29, 671-8.

- WITTER, M. P., VAN HOESEN, G. W. & AMARAL, D. G. (1989) Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J Neurosci*, 9, 216-28.
- WYSS, J. M. (1981) An autoradiographic study of the efferent connections of the entorhinal cortex in the rat. *J Comp Neurol*, 199, 495-512.
- WYSS, J. M., SWANSON, L. W. & COWAN, W. M. (1979) Evidence for an input to the molecular layer and the stratum granulosum of the dentate gyrus from the supramammillary region of the hypothalamus. *Anat Embryol (Berl)*, 156, 165-76.

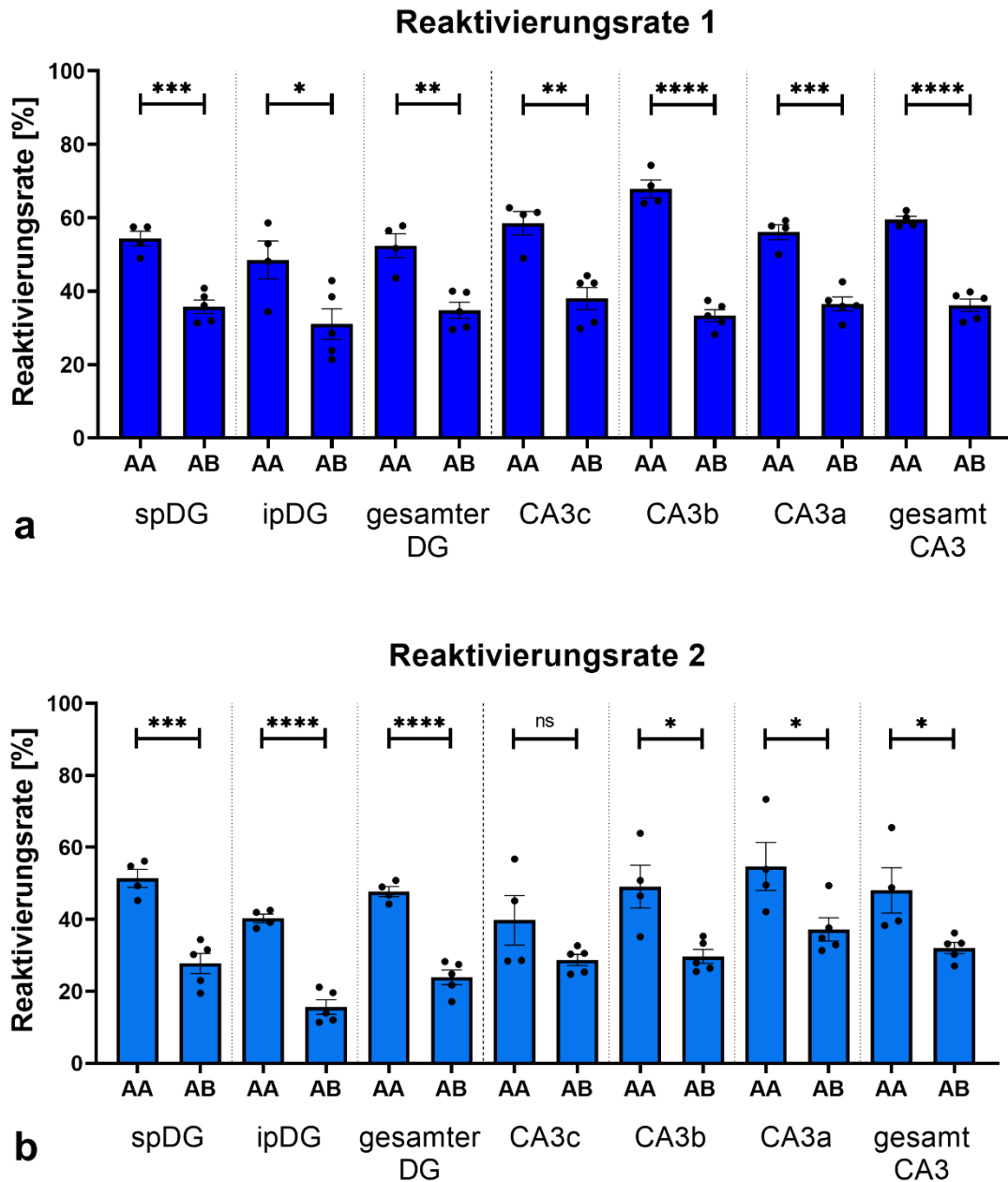
## 7 Anhang



**Abbildung 29 Kontrolle der Methode in den Subregionen des Gyrus dentatus**

Es sind die Ergebnisse der Anteile an Zellen mit nukleärem (a) und zytoplasmatischem (b) Signal von allen erfassten Zellen der jeweiligen Region im suprapyramidalen (spDG) und infrapyramidalen DG (ipDG) für die Gruppen hc, A5 und A30 gezeigt.

Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. ns: nicht signifikant; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,0005$

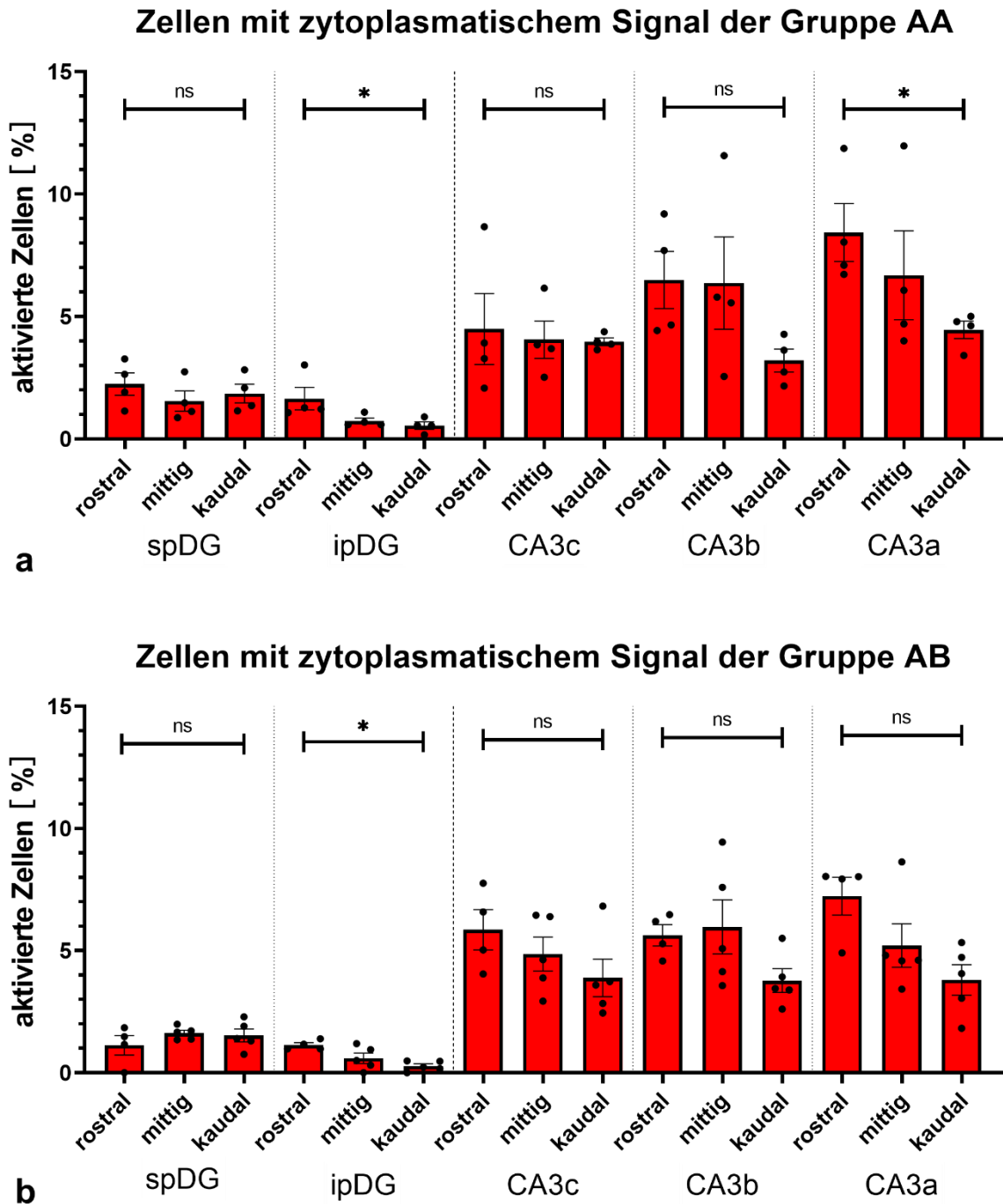


**Abbildung 30 Reaktivierungsraten**

Reaktivierungsrate 1 (a) und Reaktivierungsrate 2 (b) für alle Subregionen des DG und des CA3 mit Vergleich zwischen den Gruppen AA und AB.

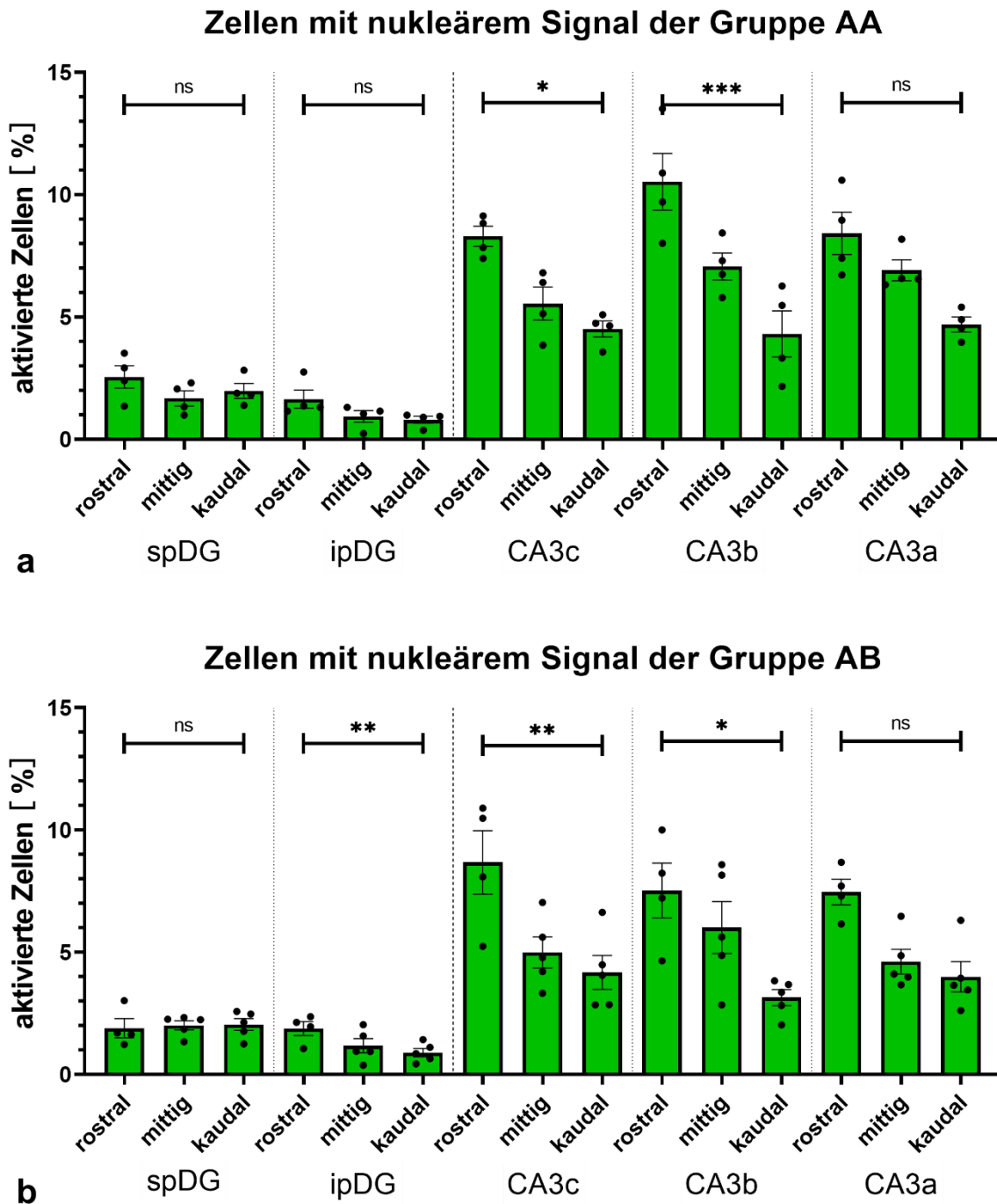
Aufgeführt ist für jede Region der Vergleich zwischen der Gruppe AA und der Gruppe AB. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. DG: Gyrus dentatus; spDG: suprapyramidaler Gyrus dentatus; ipDG: infrapyramidaler Gyrus dentatus; CA3: Cornu ammonis 3; CA3c: Cornu ammonis 3 c; CA3b: Cornu ammonis 3 b; CA3a: Cornu ammonis 3 a; ns: nicht signifikant; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,0005$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$





**Abbildung 31 Rostrokaudaler Vergleich der neuronalen Aktivität innerhalb des ersten Kontextes in allen Subregionen**

Rekrutierte Neurone in den Subregionen des Gyrus dentatus (DG) und des Cornu ammonis 3 (CA3) während der Erkundung des ersten Kontextes bei Mäusen der Gruppe AA (a) und der Gruppe AB (b). Aufgeführt ist für jede Gruppe der Vergleich zwischen den rostralen und kaudalen Ebenen der jeweiligen Subregion. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. spDG: suprapyramidaler Gyrus dentatus; ipDG: infrapyramidaler Gyrus dentatus; CA3c: Cornu ammonis 3 c; CA3b: Cornu ammonis 3 b; CA3a: Cornu ammonis 3 a; ns: nicht signifikant; \*:  $p \leq 0,05$



**Abbildung 32 Rostrokaudaler Vergleich der neuronalen Aktivität innerhalb des zweiten Kontextes in allen Subregionen**

Rekrutierte Neurone in den Subregionen des Gyrus dentatus (DG) und des Cornu ammonis 3 (CA3) während der Erkundung des zweiten Kontextes bei Mäusen der Gruppe AA (a) und der Gruppe AB (b).

Aufgeführt ist für jede Gruppe der Vergleich zwischen den rostralen und kaudalen Ebenen der jeweiligen Subregion. Die Darstellung erfolgte jeweils unter Angabe des Mittelwertes sowie des Standardfehlers. spDG: suprapyramidaler Gyrus dentatus; ipDG: infrapyramidaler Gyrus dentatus; CA3c: Cornu ammonis 3 c; CA3b: Cornu ammonis 3 b; CA3a: Cornu ammonis 3 a; ns: nicht signifikant; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,005$ ; \*\*\*:  $p \leq 0,0005$ ; \*\*\*\*:  $p \leq 0,0001$

## **Tierversuchsantrag**

Die Durchführung von Tierversuchen am Mausmodell sowie die Tötung von Tieren zur Hirnentnahme wurde beim Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein unter dem Titel „Objekt-Lernen im limbischen System“ angezeigt und unter der Lizenznummer V 242-7224.121-2 genehmigt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Doktorvaters und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich außer den in der Arbeit aufgeführten keine weiteren Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher, weder ganz noch in Teilen, keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat.

Kiel, den 06.12.2023

Lars-Patrick Schmill

# Publikationsliste

## Publikationen im Rahmen der Dissertation:

Schmill, L. P., Bohle, K., Rohrdanz, N., Schiffelholz, T., Balueva, K. & Wulff, P. (2023)  
Regional and interhemispheric differences of neuronal representations in dentate gyrus  
and CA3 inferred from expression of zif268. *Sci Rep*, 13, 18443. doi: 10.1038/s41598-  
023-45304-y

## Veröffentlichte Tagungsbeiträge im Rahmen der Dissertation

L.-P. A. Schmill (2016) IEG-Expression und Musterdifferenzierung im Hippocampus.  
Tagung der Ostsee-Physiologen, 12./13.10.2016 in Kiel

## Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Peer Wulff für die großartige Betreuung danken, die er mir über all die Jahre hinweg erbracht hat. Ich hatte das Glück, nicht nur immer ein offenes Ohr und viel Begeisterung bei ihm zu finden, sondern auch in allen Phasen der Doktorarbeit von ihm in fachlicher und menschlicher Hinsicht unterstützt zu werden. Besonders möchte ich mich bei ihm aber dafür bedanken, dass er immer hinter meinen wissenschaftlichen Zielen stand und mich in meinen Vorhaben bestärkt hat.

Ein großer Dank gilt auch Dr. Kira Balueva und Kerstin Kronenbitter für die tolle Einarbeitung und die große Hilfe bei allen Abschnitten der Versuche. Trotz der langwierigen Etablierung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen standen mir beide jeden Tag in meinem Forschungsfreisemester und auch parallel zum weiteren Studium mit Rat und Tat zur Seite, wodurch ich mich nie alleingelassen gefühlt habe und viel Freude an den Experimenten hatte. Vielen Dank auch den weiteren Mitgliedern der AG Wulff, die einfach ein tolles Team sind.

Für das positive Votum und die Auszeichnung mit dem fakultätseigenen Promotionsstipendium möchte ich mich zudem bei der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bedanken. Durch dieses wurde es mir ermöglicht, mich ein Semester lang vollständig auf diese Arbeit zu konzentrieren und das wissenschaftliche Arbeiten bereits zu einem so frühen Zeitpunkt in meiner Karriere in vollem Umfang erleben zu können, wie es ohne diese Unterstützung nicht möglich gewesen wäre.

Ich möchte außerdem meinen wunderbaren Eltern und meinen großartigen Freunden danken, die mich seit so vielen Jahren begleiten und auf die ich mich jeden Tag verlassen kann. Vielen Dank für die uneingeschränkte Unterstützung, für all die unvergesslichen Momente, für unseren stetigen Zusammenhalt und dafür, dass ihr mein Leben so bereichert.

Zuletzt möchte ich mich vor allem bei meiner Partnerin, Antonia Sziegoleit, bedanken, die mir immer wieder die nötige Zuversicht und den Rückhalt gegeben hat, die letzten Jahre zu meistern sowie auch diese Arbeit neben dem Studium und dem Berufsalltag zu vollenden. Vielen Dank auch für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit und besonders für deine fortwährende Ermutigung, meinen Zielen nachzugehen!