

Die funktionelle Bedeutung von Projektionszellen des medialen entorhinalen Cortex in der Interaktion zwischen entorhinalen Cortex und Hippocampus

HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach

PHYSIOLOGIE

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. Tengis Gloveli

geboren am 20.03.1952 in Oni/Georgien

Präsident: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof. Ulrich A. Misgeld

2. Prof. Eberhard H Buhl

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrages: 14. November 2000

Für Tamar Dugladze,
deren Verständnis und stete Ermutigung mich immer wieder zum Weitermachen bewegte
und
für meine Töchter Gvantsa und Natalie,
die ständigen Vaternangel an sich erlebt haben.

Erklärung

Die vorliegende Habilitationsschrift wurde selbständig verfaßt. Beim Zustandekommen der Arbeit haben allerdings die Kollegen Prof. Uwe Heinemann und Herr Dr. Dietmar Schmitz durch ihre Diskussionsbereitschaft und wertvolle Korrekturen beigetragen. Neben allgemeinen, aus der Literatur entnommenen Erkenntnissen werden in der Habilitationsschrift insgesamt neun eigene Publikationen zusammengefasst. Mein eigener Beitrag an diesen Arbeiten, an denen meistens mehrere Kollegen beteiligt waren, ist unterschiedlich groß. Die sieben von mir als Erstautor vorgelegten Arbeiten (Gloveli et al., 1995; Gloveli et al., 1997a; Gloveli et al., 1997b; Gloveli et al., 1997c; Gloveli et al., 1997d; Gloveli et al., 1999; Gloveli et al., eingereicht) wurden praktisch vollständig von mir konzipiert und durchgeführt. Bei den verbleibenden zwei Arbeiten (Schmitz et al., 1998a; Schmitz et al., 1998b) handelt es sich um Kooperationen, wo mein eigener Anteil (zwischen 30-40%) in der Durchführung und Analyse der experimentellen Daten sowie Beteiligung an der Abfassung der Publikation bestand.

Alle Kollegen, die meine Arbeit durch Diskussion, technische oder redaktionelle Beiträge unterstützt haben, sind in der Danksagung erwähnt.

Danksagung

Beim Zustandekommen der vorliegende Arbeit haben viele Kollegen durch ihre Hilfsbereitschaft und viele anregende Diskussionen beigetragen.

Ich möchte mich an dieser Stelle vor allem bei Prof. Uwe Heinemann für die Arbeitsmöglichkeiten, sowie für die jederzeit erwiesene Unterstützung bedanken, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre. Er hat viele Anregungen, Ideen und stets offene Ohren für mich gehabt.

Mein besonderer Dank für wichtige Diskussionen und viele Hilfestellungen geht an Dr. Dietmar Schmitz, Dr. Andreas Draguhn und Dr. Joachim Behr . Für viele nützliche Hinweise bei der Korrektur der ersten Version meiner Habilitationsschrift danke ich ihnen ganz herzlich. Unser gemeinsames langjähriges wissenschaftliches Interesse hat uns sehr eng zueinander gebracht und eine große und tiefe Freundschaft wachsen lassen.

An die frühe Anfangszeit in Köln, die vor allem aus der Zusammenarbeit mit Dr. Konol Alici, Dr. Chuan-Li Zhang, Dr. Ruth Empson, Dr. Eckhard Ficker, Dr. Heinz Beck, Dr. Thomas Mittmann bestand, erinnere ich mich gerne zurück.

Den Kollegen meiner eigenen Arbeitsgruppe für viele Unterstützungen und die freundschaftliche Atmosphäre in der Gruppe bin ich zu großem Dank verpflichtet. Im Labor sind dies Claudia Iserhot, Jörg Breustedt, Tamar Dugladze.

Ich möchte auch vielen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, mit denen ich entweder durch gemeinsame Arbeit oder viele für mich wichtige Gespräche verbunden war, danken. An dieser Stelle danke ich besonders Dr. Katharina Buchheim (Berlin), Prof. Ursula Zippel (Berlin), Dr. Sigrun Gabriel (Berlin), Dr. Christine Gebhardt (Berlin), Dr. Wolfgang Müller (Berlin), Prof. Rafael Guttierrez (Mexiko), Prof. Eero Castrén (Finnland), Dr. Barbara Nixdorf-Bergweiler (Berlin), Dr. Katrin Schulze (Berlin), Dr. Oliver von Bohlen und Halbach (Berlin).

Bei Astrid Düerkop möchte ich mich für ihre Hilfe bei Literaturrecherchen und Dokumentation bedanken. Frau Renate Lindner möchte ich Dank für ihre Hilfe in

administrativen Aufgaben aussprechen. Ein besonderes Dankeschön möchte ich den Herren Drs. Hans-Jürgen Gabriel und Herbert Siegmund für ihre Unterstützung in technischen Fragen ausrichten.

Danken möchte ich auch allen anderen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Institutes, die jederzeit ein offenes Ohr für mich hatten.

INHALTSVERZEICHNIS

Erklärung	3
Danksagung.....	4
1. Zusammenfassung.....	8
2. Einleitung.....	12
2.1. Anatomie des Hippocampus und der parahippocampalen Region.....	12
2.2. Funktionelle Bedeutung der parahippocampalen Region.....	15
2.3. Einfluß von Azetylcholin und Serotonin auf die Zellen im entorhinalen Cortex und im Hippocampus	17
2.4. Mechanismen der Epilepsie.....	19
3. Verwendete Methoden	22
3.1. Elektrophysiologische Messungen	22
3.2. Fluoreszenz Messungen	25
3.3. Immunohistochemische Färbung	26
3.4. Biozytin Färbung.....	26
4. Eigene Arbeiten	28
4.1. Morphologische und elektrophysiologische Charakterisierung der Schicht III-Zellen des medialen entorhinalen Cortex (Ref. 1).....	28
4.2. Morphologische und elektrophysiologische Charakterisierung der Schicht II-Zellen des entorhinalen Cortex (Ref. 2)	30
4.3. Charakterisierung der zur Area Dentata projizierenden tiefen Schichten (IV-VI) des medialen entorhinalen Cortex (Ref.3, Ref. 4).....	32
4.4. Frequenzabhängige Informationsübertragung vom medialen entorhinalen Cortex zum Hippocampus (Ref. 2, Ref. 5)	33
4.5. Muskarinerge und serotonerge Kontrolle der Erregbarkeit von Projektionsneuronen der Schicht II und III des entorhinalen Cortex (Ref. 6, Ref. 7).....	36
4.6. Einfluß von MK-801 auf den entorhinalen Cortex und auf die Interaktion zwischen entorhinalen Cortex und Hippocampus (Ref. 8).....	39

4.7. Die Entstehung und Ausbreitung epileptiformer Entladungen vom entorhinalen Cortex zum Hippocampus (Ref. 9)	41
5. Schlußfolgerung und Ausblick.....	43
6. Zitierte Literatur	50
7. Eigene Veröffentlichungen im Original	68
7.1. Gloveli et al., <i>Neuroscience</i> 77, 629-648, 1997 ..(Ref. 1).....	68
7.2. Gloveli et al., <i>J.Neurophysiol.</i> 78, 3444-3449, 1997 ..(Ref. 2)	68
7.3. Schmitz et al., <i>Neuroscience</i> 85, 999-1004, 1998 ..(Ref. 3)	68
7.4. Gloveli et al., <i>J.Neurosci.</i> , eingereicht .(Ref. 4).....	68
7.5. Gloveli et al., <i>Neuroscience</i> 80, 119-131, 1997 .(Ref. 5).....	68
7.6. Gloveli et al., <i>Eur.J.Neurosci.</i> 11, 3626-3636, 1999.(Ref. 6).....	69
7.7. Schmitz et al., <i>J.Physiol.(Lond.)</i> 508, 119-129, 1998.(Ref. 7)	69
7.8. Gloveli et al., <i>Neurosci. Lett.</i> 221, 93-96, 1997.(Ref. 8).....	69
7.9. Gloveli et al., <i>Dev.Brain Res.</i> 87, 145-152, 1995 .(Ref. 9)	69

Technische Hinweise:

„Ref.1“ bis „Ref. 9“ im Inhaltsverzeichnis weisen auf die in den jeweiligen Kapitel besprochenen eigenen Veröffentlichungen hin.

1. Zusammenfassung

Der entorhinale Cortex (EC) nimmt eine zentrale Stellung im limbischen System ein und ist darüber hinaus eine Verbindungsstelle zwischen Hippocampus und Cortex. Der EC weist bei einer Reihe von Erkrankungen frühzeitig selektive Zellverluste auf, die zu einer Beeinträchtigung von Lern- und Gedächtnisleistungen sowie von kognitiven Funktionen führen. Ziel der Untersuchungen war es, die Bedeutung der Projektionszellen des EC in der Interaktion zwischen EC und Hippocampus besser zu verstehen, um die funktionellen Folgen dieser Schädigungen abzuschätzen. Um die Eigenschaften der Projektionszellen im EC genauer zu charakterisieren, führten wir intrazelluläre Ableitungen an den Neuronen der oberflächlichen (Schicht II und III) und der tiefen (Schicht IV-VI) Schichten durch, von denen etwa ein Viertel während der Ableitung mit dem Farbstoff Biozytin gefärbt werden konnten. In Schicht III des medialen EC (mEC) fanden wir vier unterschiedliche Zelltypen, von denen zwei als Projektionsneurone (Typ 1 und Typ 2) charakterisiert wurden. Die Projektionszellen der Schicht III besitzen eine niedrige Schwelle zur Auslösung synaptisch evozierter Aktionspotentiale. Daneben konnten wir zwei weitere Typen von Zellen (Typ 3 und Typ 4) bestimmen, deren Somata in der Schicht III lagen, die aber nicht in den Hippocampus projizierten, sondern lokal im EC verschaltet waren.

Aufgrund ihrer Morphologie wurden die Zellen der Schicht II in Stellate (Stern-)Zellen und Nicht-Stellate-Zellen unterteilt. Der größte Anteil der Schicht II-Zellen wird von den Stellate-Zellen gebildet, die ihren Namen der sternförmigen Morphologie ihrer Somata verdanken. Neben den sehr stark verzweigten Dendriten weisen sie Axone auf, die in den Hippocampus projizieren. Während depolarisierender und hyperpolarisierender Strominjektionen zeichnen sich diese Zellen durch charakteristische Aus- und Einwärtsströme aus („sag“). Zudem sind für diese Zellen Na^+ -abhängige Membranpotential-Oszillationen beschrieben worden. Bei synaptischer Stimulation antworten sie mit einem kleinen exzitatorischen postsynaptischen Potential (EPSP), welchem ein deutliches schnelles und langsames inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP) folgt. Zur Auslösung von Aktionspotentialen in Stellate-Zellen sind wesentlich höhere synaptische Reizintensitäten erforderlich als bei den Projektionszellen der Schicht III.

In den tiefen Schichten des EC hatten wir Neurone abgeleitet, die ebenso wie die Stellate-Zellen der Schicht II rhythmische Membranpotential-Oszillationen, vorwiegend im Theta Frequenzbereich (5-22 Hz, Durchschnittswert 10.4 ± 1.1 Hz), aufweisen. Diese intrinsischen Oszillationen waren in den tiefen Schichten des EC bis dahin nicht beschrieben worden. Pharmakologisch zeichnen sie sich ebenfalls durch ihre Tetrodotoxin-Sensitivität aus. Morphologische Untersuchungen konnten zeigen, daß diese Zellen pyramidenförmige Somata aufweisen und zur Area Dentata (AD) projizieren. Als weitere Projektionszellen zur AD fanden sich bipolare und multipolare Neurone der tiefen Schichten, die trotz der morphologischen Ähnlichkeit mit GABAergen Interneuronen die typischen elektrophysiologischen und neurochemischen Eigenschaften von Prinzipalzellen des EC besitzen. Sowohl pyramidale als auch nicht-pyramidale Neurone können vermutlich Funktionen von sowohl Lokal- als auch Projektionszellen übernehmen und dementsprechend die schnelle Informationsübertragung zwischen den tiefen und oberflächlichen Schichten einerseits und zwischen EC und AD andererseits ausüben.

Um der Frage nachzugehen, unter welchen Bedingungen die Schicht II- und III-Projektionszellen aktiviert werden, führten wir repetitive synaptische Reizungen im lateralen EC sowie in den tiefen Schichten des EC durch. Hochfrequente repetitive synaptische Reizung (> 10 Hz) führt zu einer bevorzugten Aktivierung der Schicht II-Zellen. Hingegen können die Schicht III-Zellen durch Reizung in diesem Frequenzbereich gehemmt werden. Diese Neurone werden hingegen bei niedrigeren Reizfrequenzen (< 6 Hz) bevorzugt aktiviert und Schicht II-Zellen gleichzeitig gehemmt. Dies läßt vermuten, daß der Informationstransfer zwischen EC und Hippocampus frequenzabhängig gesteuert wird mit dem Ergebnis, daß niederfrequente Aktivität aus dem rhinalen Cortex über den EC bevorzugt die CA1-Region und das Subiculum erreicht, während höherfrequente Informationen bevorzugt den Weg über die AD nehmen. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich zudem, daß die Projektionsneurone der Schicht III im Anschluß an hochfrequente Reizung (10 Hz und mehr) eine sehr lang anhaltende (bis zu 20 s dauernde) Hyperpolarisation entwickelten. Die frühe Komponente dieser Hyperpolarisation wird durch Aktivierung von GABA_B-Rezeptoren vermittelt, während ein mittlerer Anteil über muskarinische Azetylcholin-Rezeptoren und der letzte Anteil dieser Hyperpolarisation über enkephalinerge Rezeptoren vermittelt wird.

Da bekannt ist, daß eine große Anzahl an cholinergen und serotonergen Fasern den EC innervieren und eine hohe Dichte der entsprechenden Rezeptoren im EC exprimiert ist, haben wir uns für den Einfluß von Carbachol (CCh; muskarinischer Agonist) und Serotonin auf die neuronale Aktivität im EC interessiert. Hierzu haben wir den Einfluß von CCh auf das Ruhemembranpotential und die postsynaptische intrazelluläre Kalzium-Konzentration in Schicht II und III untersucht. Applikation von CCh in niedriger Konzentration führt zu einer ausschließlichen Depolarisation des Membranpotentials von Schicht II Neuronen sowie zu einer Depolarisation und/oder Hyperpolarisation von Schicht III-Projektionsneuronen. Dabei konnten bei den intrazellulären Kalzium-Messungen zwei Unterschiede zwischen den Schicht II- und III-Neuronen beobachtet werden. Stellate-Zellen der Schicht II weisen schon bei geringen Depolarisationen kleine, durch niedrig-spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle vermittelte Kalzium-Anstiege auf, während in den Schicht III-Zellen kein Kalzium-Anstieg meßbar ist. Allerdings führen weitere Depolarisationen der Zellen in den Schicht III-Neuronen zu signifikant größeren Kalzium-Anstiegen als in den Schicht II-Zellen, welche durch hoch-spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle vermittelt sind.

Untersuchungen mit Serotonin (5-HT) zeigen, daß 5-HT im EC eine deutliche, unterdrückende Wirkung auf die glutamaterge synaptische Übertragung hat. Wir interessierten uns daraufhin für den zugrundeliegenden Wirkmechanismus. Da die direkten AMPA- und NMDA-Rezeptor-aktivierten Ströme nicht von Serotonin beeinflusst wurden, konnte eine direkte Rezeptormodulation beider Glutamaterezeptoren ausgeschlossen werden. Durch Experimente an "Miniatur"-exzitatorischen postsynaptischen Strömen konnte gezeigt werden, daß Serotonin über die Hemmung der präsynaptischen Glutamatausschüttung die effektive Reduzierung der synaptischen Exzitation im EC bedingt.

In den letzten Jahren ist bei Patienten mit Psychosen beschrieben worden, daß sie häufig Läsionen im mEC aufweisen. Dies gilt sowohl für Patienten mit Schizophrenie als auch für eine Gruppe von Patienten mit Temporallappenepilepsie. Derartige Läsionen lassen sich auch nach Einnahme von Phencyclidinen im Tierexperiment auslösen, wobei am besten die Wirkungen des nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptorantagonisten MK-801 dokumentiert sind. Wir haben zeigen können, daß Hirnschnitte von MK-801-

vorbehandelten Tieren veränderte synaptische Eigenschaften aufweisen. Extrazelluläre Feldpotential-Messungen zeigen, daß MK-801 bei intraperitonealer Verabreichung in höheren Konzentrationen (4 mg/kg) alle Komponenten des Feldpotentials der Schicht III des mEC signifikant verkleinert, während die Feldpotentiale der Schicht II und V unverändert blieben. Diese Untersuchungen lassen annehmen, daß die Schicht III-Neurone des mEC ihre funktionellen Eigenschaften nach der MK-801-Vorbehandlung ändern, was auch Auswirkungen auf den Informationsfluß zum Hippocampus haben könnte.

Im letzten Abschnitt der Arbeit wird die Interaktion zwischen EC und Hippocampus am *in vitro* Niedrig-Magnesium-Epilepsiemodell untersucht. Während die Ausbreitung epileptiformer Entladungen vom EC zum Hippocampus bei adulten Ratten durch eine Filterfunktion der AD unterbunden wird, zeigte sich bei juvenilen Tieren eine erhöhte Epileptogenizität im EC-Hippocampus-Komplex. Dies deutet auf eine verstärkte exzitatorische Interaktion zwischen EC und Hippocampus bei juvenilen Tieren hin.

2. Einleitung

2.1. Anatomie des Hippocampus und der parahippocampalen Region

Der Hippocampus stellt eine wichtige Struktur des limbischen Systems dar. Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1893) beschrieb zwei miteinander korrespondierende Regionen im Hippocampus: das Cornu ammonis (CA) und die Area dentata (AD; auch Fascia dentata genannt). Lorente de Nó (Lorente de Nó, 1934) differenzierte innerhalb der Pyramidenzellschicht des Cornu ammonis 4 Regionen (CA1-4) nach deren Breite, Zellgröße und Zelldichte. Die Axone der CA1-Zellen projizieren in Richtung Subiculum und Fimbria. Die Axone der CA-3-Zellen projizieren zum einen über die Fimbria zum Septum, zum anderen über Axonkollaterale zur CA1-Region und zum Subiculum. Im Cornu ammonis werden 5 Schichten unterschieden: Alveus, Stratum oriens, Stratum pyramidale, Stratum radiatum und Stratum lacunosum-moleculare. Alle Schichten beinhalten mehr oder weniger schichtenspezifische GABAerge Interneurone (Freund & Buzsáki, 1996).

In der AD lassen sich drei Schichten unterscheiden. In der äußeren Schicht, dem Stratum moleculare, befinden sich die apikalen Dendriten der Körnerzellen. In den äußeren 2/3 des Stratum moleculare enden die Fasern der oberflächlichen Zellen des EC (zum Überblick siehe Amaral & Witter, 1995). Zum inneren 1/3 dieser Schicht projizieren die assoziativen und kommissuralen Fasern der AD (Blackstad, 1956; Zimmer, 1971; Swanson *et al.*, 1978; Deller *et al.*, 1994; Deller *et al.*, 1995). Zudem besteht eine entorhinale Projektion von den tiefen Schichten des EC zum inneren 1/3 der molekularen Schichten sowie der Körnerzellschicht der AD (Deller *et al.*, 1996). Die mittlere Schicht wird von den Somata der Körnerzellen gebildet und wird demzufolge als Stratum granulare bezeichnet. Die Axone der Körnerzellen, die zur Area CA3 projizieren, bilden den Hauptanteil der inneren Schicht der AD. Dieses Gebiet wird auch als Hilusregion bezeichnet. Wie im Cornu Ammonis, besitzen auch alle genannten Schichten der AD spezifische Interneurone.

Im Gegensatz zur Hippocampusformation besteht die parahippocampale Region aus sechs Schichten, die grob in eine oberflächliche und eine tiefe Hauptschicht unterteilt wird

(Witter *et al.*, 1989a). Während man die Schichten I bis III in der oberflächlichen Hauptschicht zusammenfaßt, zählt man die Schichten IV bis VI zu der tiefen Schicht. Die Schlüsselposition in der parahippocampalen Region besetzt der entorhinale Cortex (EC), welcher die Verbindungstelle zwischen dem Hippocampus und dem Cortex darstellt. Vom EC geht eine bedeutende Projektion zur AD aus, der sogenannte "Tractus perforans". Er entspringt in den Prinzipalzellen der Schicht II des EC und führt über das anguläre Band, das Subiculum und die hippocampale Fissur in die Molekularschicht der AD (Schwartz & Coleman, 1981; Ruth *et al.*, 1982; Ruth *et al.*, 1988). Die trisynaptische Kette beginnt mit der ersten Synapse des Tractus perforans an den Dendritenbäumen der Körnerzellen (Abb. 1, S. 15) (Schwartz & Coleman, 1981; Ruth *et al.*, 1982; Storm-Mathisen & Ottersen, 1984; Ruth *et al.*, 1988). Von der AD ziehen die Axone der Körnerzellen, die sogenannten Moosfasern, in Richtung CA3-Region und bilden den zweiten synaptischen Kontakt. Die bereits zuvor erwähnten, von den Pyramidenzellen der CA3-Region zu den CA1-Pyramidenzellen ziehenden Fasern (Schaffer-Kollateralen), vollenden die trisynaptische Kette (Andersen *et al.*, 1971; Amaral & Witter, 1989). Die CA1-Region projiziert schließlich sowohl zum Subiculum als auch zu den tiefen Schichten des EC und schließt damit den hippocampalen Schaltkreis. Die Projektion der Schicht-II-Zellen des EC zur AD stellt zwar den stärksten Eingang zum Hippocampus dar, wird jedoch noch von einer zweiten, weniger bekannten Bahn - dem sogenannten "temporo-ammonic tract", ergänzt. Er entspringt in den Projektionsneuronen der Schicht-III-Zellen des EC und führt unter Umgehung der hippocampalen Schleife direkt zum Subiculum und zur CA1-Region (Hjorth-Simonsen & Jeune, 1972; Steward & Scoville, 1976; Witter *et al.*, 1988; Witter, 1993), wo er in den meisten Pyramidenzellen hemmende Potentiale induziert (Abb. 1, S. 15) (Empson & Heinemann, 1995a;b). Die Hauptagangsstruktur des Hippocampus stellt das Subiculum dar. Von hier aus projiziert der Hippocampus einerseits über den Fornix zu subcorticalen Regionen wie der Amygdala, dem Thalamus, dem Hypothalamus, dem Hirnstamm und dem Septum und andererseits über parahippocampale Regionen zum Cortex (Swanson & Cowan, 1977; Witter *et al.*, 1990; Witter & Groenewegen, 1990; Witter, 1993).

Der EC kann in eine mediale und eine laterale Region unterteilt werden. Diese Regionen unterscheiden sich in der zellulären Organisation und ihren Projektionszielen (Beckstead,

1978; Wilson & Steward, 1978; Köhler, 1988; Witter *et al.*, 1989b; Insausti, 1993). Zusammen mit dem perirhinalen und postrhinalen Cortex bildet der EC den rhinalen Cortex. Perirhinaler und postrhinaler Cortex stellen die Haupteingänge des EC dar und erhalten funktionell unterschiedliche Informationen. Während der perirhinale Cortex afferente Fasern von somatosensorischen, auditorischen und olfactorischen Arealen erhält (Burwell *et al.*, 1995; Suzuki, 1996; Burwell & Amaral, 1998a), gehen im postrhinalen Cortex Afferenzen von visuellen Arealen ein (Burwell *et al.*, 1995; Burwell & Amaral, 1998a). Diese zwei cortikalen Areale projizieren zu unterschiedlichen Regionen des EC. Der perirhinale Cortex projiziert bevorzugt zum lateralen EC, während der postrhinale Cortex hauptsächlich den medialen EC innerviert (Naber *et al.*, 1997; Burwell & Amaral, 1998b). Diese unterschiedlichen Projektionen zum lateralen bzw. medialen EC sind von besonderem Interesse, da sie in den entorhino-hippocampalen Verbindungen des „perforant path“ (PP) als laterale und mediale Komponenten erhalten bleiben. Der laterale PP hat im lateralen EC, der mediale PP im medialen EC seinen Ursprung (Witter, 1993). Die beiden Fasersystemen haben sowohl gemeinsame als auch unterschiedliche Projektionsziele. Beide PP-Komponenten enden an den gleichen Zellen der AD und der CA3-Region (Amaral & Witter, 1995). Hingegen innervieren sie unterschiedliche Zellpopulationen in der CA1-Region und im Subiculum (Tamamaki & Nojyo, 1995). Ihrerseits projizieren Subiculum und CA1-Region wiederum zurück zum EC. Das bedeutet, daß im hippocampo-entorhinalen System funktionell unterschiedliche Informationstypen gleichzeitig verarbeiten werden können (Naber *et al.*, 1997).

2.2. Funktionelle Bedeutung der parahippocampalen Region

Der EC ist wie der Hippocampus an räumlichem Orientierungslernen beteiligt. Neurone des EC erhalten sensorische Informationen über Objekte und deren Lokalisation im Raum, welche ins Kurzzeit-Gedächtnis übertragen werden (Suzuki *et al.*, 1997). Es ist postuliert worden, daß der EC für das Kurzzeit-Gedächtnis von Objekten eine wichtigere Rolle spielt als der Hippocampus (zum Überblick siehe Suzuki, 1999). Verhaltensphysiologische Experimente haben gezeigt, daß Unterbrechungen der EC-AD Projektion zu Lerndefiziten führen (McNaughton *et al.*, 1989), während zuvor erlernte Informationen aus dem räumlichen Orientierungsverhalten der Tiere nach wie vor abgerufen werden können. Nach AD Läsionen lassen sich auch im Hippocampus nach wie vor typische Antworten von sogenannte Platzzellen („place cells“) ableiten (Foster *et al.*, 1989; McNaughton *et al.*, 1989). Es wird vermutet, daß die hippocampo-cortikalen Rückprojektionen über das Subiculum und den EC für die Langzeit-Speicherung von zuvor im Hippocampus bearbeiteten Informationen im Cortex beteiligt sein könnten. Dementsprechend würde die parahippocampale Region, einschließlich des EC, als Zwischenspeicher von Informationen dienen, welche anschließend ins Langzeit-Gedächtnis übertragen werden (Eichenbaum *et al.*, 1994). Es wird also ein Transfermodus angenommen, bei dem Informationen aus dem Arbeitsspeicher in den Langzeitspeicher anderer Hirnstrukturen übertragen werden (Squire, 1992; Skaggs & McNaughton, 1996; Zanna *et al.*, 1996). Für diesen Transfermodus ist möglicherweise die Genese hochfrequenter Spontanentladungen (200 Hz-Oszillationen) im Hippocampus verantwortlich (Buzsáki *et al.*, 1992; Chrobak & Buzsáki, 1994; Wilson & McNaughton, 1994; Chrobak & Buzsáki, 1996; Siapas & Wilson, 1998). Solche komplexen Entladungen können allerdings auch im Hippocampus-Hirnschnittpräparat beobachtet werden und sind wahrscheinlich nicht synaptisch sondern über elektrische Kopplung neuronaler Netzwerke vermittelt (Draguhn *et al.*, 1998). Weitere hochfrequente Rhythmen stellen die sogenannten Gamma-Oszillationen (40-100 Hz) dar, die in den oberflächlichen

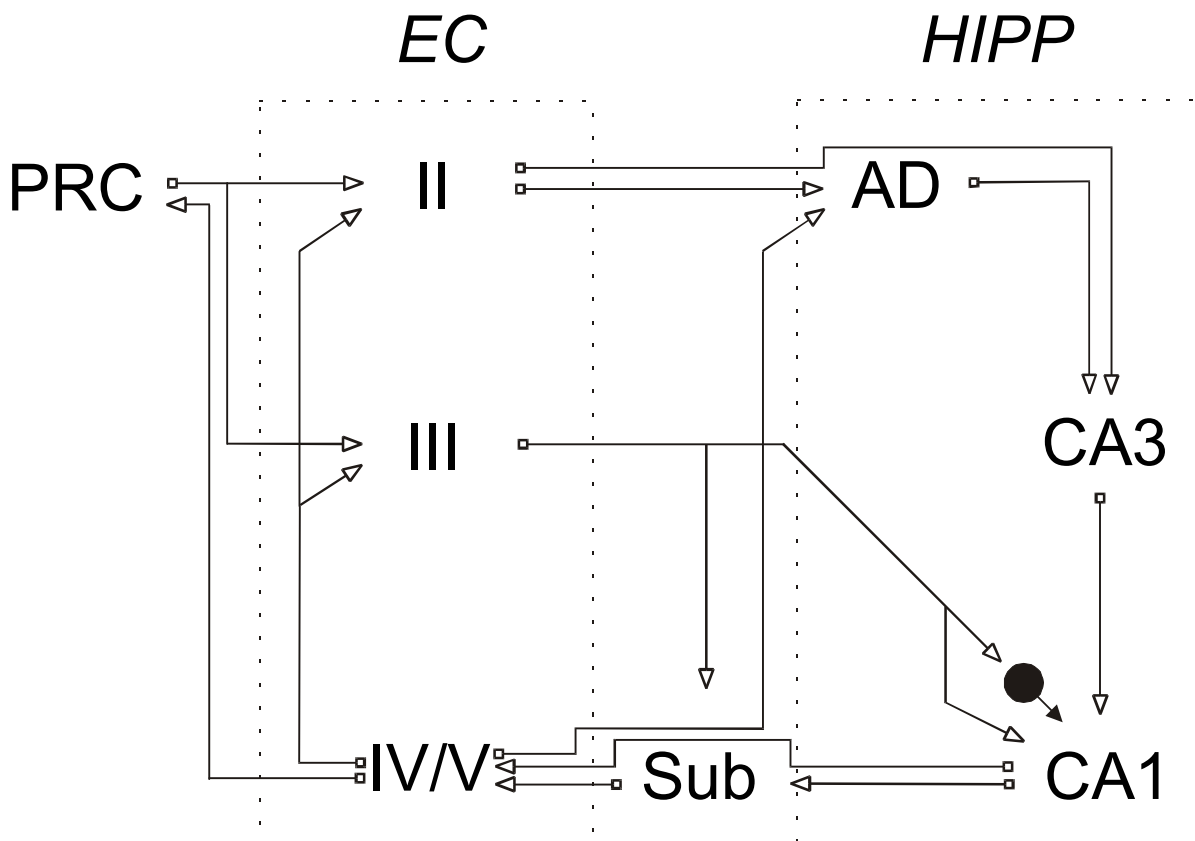


Abb. 1: . Schematische Darstellung der wichtigsten Verbindungen im neuronalen Schaltkreis des entorhinalen Cortex (EC)-Hippocampus-Komplex.

Efferenzen aus der Schicht II des EC erregen einerseits die Körnerzellen der Area Dentata (AD), andererseits projizieren Zellen der Schicht III in das Subiculum und die CA1-Region, wo sie überwiegend inhibitorische Wirkung entfalten. Die Projektionszellen der tiefen Schichten (IV/V) bilden eine zusätzliche Projektion zur AD. Aus der AD wird die Erregung über die Moosfasern zu den Pyramidallenzellen der CA3-Region und von dort über Schaffer-Kollateralen zur CA1-Region geleitet. Die Pyramidenzellen der CA1-Region sind mit dem Subiculum (Sub) verbunden. Der Schaltkreis schließt mit der Verbindung zum EC. Der EC steht über den post- und perirhinalen Cortex (PRC) mit corticalen Neuronen in Verbindung.

Schichten des EC generiert werden und mit den entorhinalen Theta-Rhythmen während des explorativen Verhaltens und dem REM-Schlaf (“rapid eye movement sleep“) verbunden sind (Chrobak & Buzsáki, 1998). Hippokampale Theta-Rhythmen (4-12 Hz) stellen den Zustand dar, während dem der hippocampale Schaltkreis den rhythmischen

Eingang von den Zellen der oberflächlichen Schichten des EC erhält (Stewart *et al.*, 1992; Chrobak & Buzsáki, 1994). Dementsprechend stellt die hochfrequente Synchronisation der neuronalen Aktivität des EC und Hippocampus die Basis für die effektive Kommunikationen zwischen diesen Strukturen dar (Chrobak & Buzsáki, 1998).

Der EC hat in letzter Zeit besondere Aufmerksamkeit erhalten, weil er eine wesentliche Rolle bei verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen spielt. Charakteristisch für Patienten mit Alzheimer Erkrankung ist die anterograde Amnesie zu Beginn der Erkrankung (Flicker *et al.*, 1991), die vermutlich mit pathologischen Veränderungen im EC in Beziehung steht (Braak & Braak, 1993). Diese Struktur spielt außerdem eine wichtige Rolle in der Induktion und/oder Persistenz von Erkrankungen wie der Epilepsie und der Schizophrenie. Im Phencyclidin-Modell der Schizophrenie führt Blockade des NMDA-Rezeptor Kanals zu selektiven funktionellen und strukturellen Veränderungen der Schicht-III-Neurone des EC (Castrén *et al.*, 1993; Lindén *et al.*, 1997). Die Interaktion zwischen verschiedenen Transmittersystemen, wie z.B. GABA, Azetylcholin (ACh), Dopamin und Glutamat ist verantwortlich für die Dysfunktion und die nachfolgenden Verluste von Neuronen in diesem Modell (Olney *et al.*, 1991; Farber *et al.*, 1993; Olney & Farber, 1995). Der EC ist zudem eine Schlüsselstruktur in der Generierung der Temporallappenepilepsie (Jones & Heinemann, 1988; Du *et al.*, 1995). Eine der Ursachen scheint die reziproke synaptische, meistens NMDA-Rezeptor vermittelte Verbindung zwischen tiefen und oberflächlichen Schichten des EC zu sein, welche zu massiven Erregungen führt (Jones & Heinemann, 1988; Schmitz *et al.*, 1997).

2.3. Einfluß von Azetylcholin und Serotonin auf die Zellen im entorhinalen Cortex und im Hippocampus

Das cholinerge System spielt in verschiedenen Hirnfunktionen, wie z.B. Weckreaktion („arousal“), Schlaf-Wach-Zyklus, Lern- und Gedächtnisprozessen eine wesentliche Rolle (Szerb, 1967; Bartus *et al.*, 1982; Stewart *et al.*, 1985; Aigner & Mishkin, 1986; McCormick & Bal, 1997). Die Demenz bei Alzheimer- und Parkinson-Erkrankung sind teilweise mit Verlusten der corticalen cholinergen Innervation verbunden (Davies & Maloney, 1976; Ruberg *et al.*, 1982; Coyle *et al.*, 1983). Für das Verständnis und die

erfolgreiche Behandlung von neurologisch-psychiatrischen Erkrankungen (Sarter & Bruno, 1999) mit Störungen der Gedächtnis- und kognitiven Funktionen ist es zunächst notwendig, die dem gesunden Zustand zugrundeliegenden zellulären Funktionen zu verstehen. Viele Ergebnisse wissenschaftlicher Untersuchungen weisen darauf hin, daß Veränderungen der synaptischen Plastizität dabei von wesentlicher Bedeutung sind. Die Hauptrolle spielen dabei Synapsen, die mit dem Neurotransmitter Glutamat arbeiten. Die synaptische Plastizität wird durch biochemisch-molekulare Reaktionen vermittelt, welche durch Anstiege des intrazellulären freien Kalziums ($[Ca^{2+}]_i$) bedingt sind. Beim Morbus Alzheimer kommt es wahrscheinlich durch Schädigung cholinergischer Neurone zu einer Störung der Abspeicherung von Gedächtnisinhalten. Obwohl gegenwärtig der zugrundeliegende pathophysiologische Prozess nicht bekannt ist, kommt es wie bei allen bekannten Degenerationsprozessen zu Störungen der intrazellulären Ca^{2+} -Regulation.

Der EC erhält starke cholinerge Eingänge von den basalen Kernen des Vorderhirns, vom Septum und vom Nucleus pallidus, die sowohl in den oberflächlichen als auch den tiefen Schichten enden (Lewis & Shute, 1967; Alonso & Köhler, 1984; Woolf *et al.*, 1984; Eckenstein *et al.*, 1988). In den meisten Neuronen des ZNS führt die Aktivierung von muskarinergen Rezeptoren durch ACh zu einer Depolarisierung, welche durch eine Verminderung verschiedener Kalium-Leitfähigkeiten bedingt ist: dem Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Strom, dem spannungsunabhängigen Leckstrom, dem spannungsabhängigen M-Strom (Benardo & Prince, 1982; Halliwell & Adams, 1982; Cole & Nicoll, 1983; Müller & Misgeld, 1986; Madison *et al.*, 1987) sowie über die Aktivierung der unspezifischen Kationen-Leitfähigkeiten (Haj-Dahmane & Andrade, 1996; Klink & Alonso, 1997). Umgekehrt kann ACh durch Zunahme von einwärtsgerichteten Kalium-Leitfähigkeiten zu einer Hyperpolarisation führen (Gerber *et al.*, 1991; Pan & Williams, 1994). In hohen Konzentrationen verursacht der muscarinerge Rezeptor-Agonist Carbachol (CCh) epileptiforme Aktivität im EC (Dickson & Alonso, 1997).

Dem serotonergen System wird auf der einen Seite eine bedeutende Rolle bei der Schlafregulation, der Schmerzwahrnehmung, der Kontrolle von Hormonausschüttung sowie bei Lern- und Gedächtnisbildung zugesprochen (Jouvet, 1973; Willis, 1981; Sallanon *et al.*, 1982; Luine *et al.*, 1984; Richter-Levin *et al.*, 1993; Richter-Levin *et al.*, 1994). Auf der anderen Seite wird Serotonin in Zusammenhang mit pathophysiologischen

Prozessen wie der Alzheimer Erkrankung, der Epilepsie und der Schizophrenie gesehen (Wada *et al.*, 1992a;b; Maurel Remy *et al.*, 1995; Tejani-Butt *et al.*, 1995; Kinon & Lieberman, 1996; Schmitz *et al.*, 1997). Obwohl bis heute unzählige Verhaltens-, System- und zellphysiologische Untersuchungen durchgeführt worden sind, sind die exakten Mechanismen immer noch unklar.

Gegenwärtig werden 7 Gruppen von 5-HT-Rezeptoren unterschieden: 5-HT₁ bis 5-HT₇. Zusätzlich zu den Klassen 1-7 lassen sich weitere Unterformen unterscheiden, so wird z.B. der 5-HT₁-Rezeptor in die 5-HT_{1A,B,D,E,F} unterteilt.

In immunhistochemischen und autoradiographischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß sowohl der Hippocampus als auch der EC eine überdurchschnittlich hohe serotonerge Innervation aufweisen und in hoher Dichte Serotonin-Rezeptoren exprimieren (Bobillier *et al.*, 1975; Steinbusch, 1981; Pazos *et al.*, 1985; Pazos & Palacios, 1985). Nachdem bekannt wurde, daß Serotonin eine wichtige Rolle beim Lernverhalten spielt, entstanden eine Vielzahl von Arbeiten über den Einfluß von 5-HT auf den Hippocampus.

Einige *in vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, daß 5-HT über unterschiedliche 5-HT-Rezeptoren sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Effekte auf hippokampale Neurone ausübt (Colino & Halliwell, 1987; Segal *et al.*, 1989). Serotonin hyperpolarisiert Pyramidenzellen durch die Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors (Colino & Halliwell, 1987; Segal *et al.*, 1989) und Öffnung eines Ca²⁺-unabhängigen K⁺-Kanals (K_{IR}) (Richter-Levin & Segal, 1990).

Bis heute sind erst wenige Arbeiten über die Effekte von Serotonin im EC erschienen (Sizer *et al.*, 1992; Schmitz *et al.*, 1998a;b). Es konnte gezeigt werden, daß Serotonin im EC ebenso wie im Hippocampus zu einer Hyperpolarisation führt (Sizer *et al.*, 1992).

2.4. Mechanismen der Epilepsie

Epilepsien gehören zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen beim Menschen. Die Mehrzahl der Epilepsiepatienten kann man heute pharmakologisch erfolgreich behandeln. Eine der häufigsten Epilepsieformen des Menschen ist die Temporallappenepilepsie. Die Temporallappenepilepsie ist bei etwa 80% der Patienten durch die bisher verwendeten

Antikonvulsiva nur unzureichend zu behandeln. Die experimentelle Epilepsieforschung konzentriert sich daher besonders auf diese Epilepsieform, um die Grundlagen für effektive Behandlungsstrategien zu schaffen.

Ein Mechanismus der Entstehung epileptiformer Aktivität ist ein Ungleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung. Der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Gehirn ist Gamma-Amino-Buttersäure (GABA). Zum jetzigen Zeitpunkt werden hauptsächlich zwei GABA-Rezeptoren unterschieden, GABA_A-, GABA_B-Rezeptoren. Der sogenannte GABA_C-Rezeptor kann als eine Isoform des GABA_A-Rezeptors verstanden werden (Cutting *et al.*, 1991). GABA_A-Rezeptoren sind ligandengesteuerte Ionenkanäle, die hauptsächlich für Chloridanionen, aber auch in geringerem Umfang für HCO₃⁻ Ionen, durchlässig sind. Ein Gleichgewichtspotential von Chlorid oberhalb des Ruhemembranpotentials, wie es in ontogenetischen Studien beschrieben worden ist oder auch im dendritischen Bereich von Neuronen beobachtet wurde, führt im juvenilen Tier nicht zu einer hemmenden Antwort, sondern zu einer Depolarisation und damit möglicherweise zur Erregung der Zelle. Dieser Mechanismus ist bei frühkindlichen Epilepsien zu berücksichtigen. Der GABA_B-Rezeptor gehört zu der Klasse der metabotropen Rezeptoren. Zusätzlich zu der beschriebenen postsynaptisch induzierten Kaliumleitfähigkeit (zum Überblick siehe Misgeld *et al.*, 1995), sind hemmende Einflüsse des GABA_B-Rezeptors auf prä- und postsynaptische Kalziumströme sowie eine direkte Verminderung der Freisetzungswahrscheinlichkeit von Vesikeln gezeigt worden (Konnerth & Heinemann, 1983; Mintz & Bean, 1993; Thompson *et al.*, 1993; Capogna *et al.*, 1996; Lambert & Wilson, 1996; Wu & Saggau, 1997; Chen & Van den Pol, 1998).

Die für die synaptisch vermittelte Erregung hauptsächlich verantwortlichen Glutamat-Rezeptoren lassen sich in mindestens vier Unterklassen einteilen. Neben den drei Liganden-gesteuerten Glutamat-Rezeptor-Typen, AMPA, Kainat und NMDA kennt man heute zudem die metabotropen Glutamat-Rezeptoren. Die Ionophore des NMDA-Rezeptors weist von allen Glutamat-Rezeptoren den größten Durchmesser auf. Neben einer großen Leitfähigkeit für Na⁺-, K⁺- und Ca²⁺-Ionen können auch noch Mg²⁺-Ionen in den Kanal eintreten und zum Teil auch durchtreten (Mayer *et al.*, 1984; Lambert & Heinemann, 1986; MacDermott *et al.*, 1986; Ascher & Nowak, 1988). Da die Magnesiumionen durch Bindung an eine Bindungsstelle innerhalb des NMDA-Rezeptors

zu einer Blockade der Pore für andere Ionen führen (Ault *et al.*, 1980; Mayer & Westbrook, 1987; Ascher & Nowak, 1988), kommt den Magnesiumionen in dem Modell der „Niedrig-Magnesium-Epilepsie“ eine besondere Bedeutung zu. Hierbei kommt es durch die Reduzierung der extrazellulären Magnesiumkonzentration zur erleichterten Öffnung des NMDA-Kanals.

In vitro- Epilepsiemodelle

Durch Manipulation des extrazellulären Ionenmilieus lassen sich drei verschiedene Formen von epileptiformen Entladungen in Hirnschnittpräparaten *in vitro* induzieren: 1. Niedrig-Ca²⁺-, 2. Hoch-K⁺- und 3. Niedrig-Mg²⁺-Epilepsie (Jefferys & Haas, 1982; Yaari *et al.*, 1983; Haas & Jefferys, 1984; Walther *et al.*, 1986; Dreier & Heinemann, 1991; Leschinger *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994). Der Begriff „Epilepsie“ steht dabei für extrazellulär gemessene epileptiforme elektrographische Aktivität in Hirnschnittpräparaten der Ratte oder des Menschen, die als Modell der Krankheit genutzt werden.

Niedrig-Mg²⁺-Epilepsie. Durch die Abnahme der extrazellulären Magnesiumkonzentration kommt es zur Negativierung des extrazellulären Membranoberflächenpotentials, wodurch das transmembranöse Potential in depolarisierende Richtung verschoben wird. Zusätzlich wurde eine erleichterte Aktivierung von Ca²⁺- Strömen und eine Zunahme der Transmitterfreisetzung beschrieben (Hamon *et al.*, 1987; Heinemann & Jones, 1990). Die Niedrig-Magnesium-Epilepsie weist sowohl regional als auch zeitlich unterschiedliche Formen und pharmakologische Profile auf. Während man in der CA3- und CA1-Region des adulten Hippocampus nur kurze rekurrente Entladungen beobachten kann (Herron *et al.*, 1985; Mody *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1994), entwickeln sich in kortikalen Strukturen epileptiforme Ereignisse mit tonisch-klonischem Entladungsmuster (Walther *et al.*, 1986; Dreier & Heinemann, 1991; Zhang *et al.*, 1994; Behr *et al.*, 1996). Diese Aktivität ist jedoch nicht über einen längeren Zeitraum stabil, sondern geht nach 1-2 Stunden in ein Status epilepticus-artiges Muster über (Dreier & Heinemann, 1990; Zhang *et al.*, 1995). Da die späte Status epilepticus-artige Aktivität jedoch durch keines der gebräuchlichen Antikonvulsiva unterdrückt werden kann, stellt diese Aktivität möglicherweise ein *in vitro* Modell für die pharmakoresistente Epilepsie dar (Dreier & Heinemann, 1990; Zhang *et al.*, 1995).

3. Verwendete Methoden

3.1. Elektrophysiologische Messungen

Die Untersuchungen wurden an kombinierten Schnitten der Hippocampusformation durchgeführt. Die Schnitte enthielten das Prä- und Parasubiculum, den entorhinalen und perirhinalen Cortex, den temporalen Cortex Area 3 und im weiter dorsalen Bereich auch Anteile des temporalen Cortex Area 2 und 1.

In diese Arbeit gingen extrazelluläre Feldpotential- und Ionenmessungen (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}), intrazelluläre Ableitungen, intrazelluläre Ca^{2+} -Messungen sowie Patch-clamp-Ableitungen ein.

Extrazelluläre Feldpotential-Ableitungen und Ionenmessungen. Über die Referenzseite ionensensitiver Elektroden oder mit Hilfe einfacher monokapillarer Feldpotentialelektroden ist man in der Lage, sowohl schnelle als auch langsame Veränderungen der Feldpotentiale abzuleiten. Auf diese Weise können spontan auftretende epileptiforme Entladungen sowie durch elektrische Reize ausgelöste transiente Feldpotentialänderungen erfaßt werden.

Mit den ionensensitiven Microelektroden können Veränderungen der extrazellulären Ionenkonzentrationen sowohl bei repetitiver Reizung als auch bei spontan auftretenden epileptiformen Entladungen bestimmt und verfolgt werden.

Intrazelluläre und Patch-Clamp Ableitungen. Nach Penetration der Zelle und Stabilisierung des Membranpotentials wurde routinemäßig ein Standardprotokoll zur Erfassung der intrinsischen und synaptischen Eigenschaften durchgeführt. Hierdurch war es möglich Ruhemembranpotential, Eingangswiderstand, Zeitkonstante, Strom-Spannungskennlinie, Höhe, Dauer, Breite und Schwelle der Aktionspotentiale, Nachhyperpolarisation, Akkomodation, Größe, Form und Dauer der exzitatorischen und inhibitorischen postsynaptischen Potentiale (EPSPs und IPSPs) und nicht zuletzt auch Umkehrpotentiale der EPSPs und IPSPs zu bestimmen. Durch Doppel- oder auch repetitive Reizung war es zudem möglich, Potenzierungs- oder Habituerungsverhalten der synaptischen Potentiale zu erfassen.

Die intrazellulären Ableitungen sind je nach Fragestellung sowohl im Brücken- und Stromklemm-Modus („current-clamp“) als auch im Spannungsklemm-Modus („single-electrode-voltage-clamp“) durchgeführt worden. Die Patch-clamp Untersuchungen wurden unter visueller Kontrolle an identifizierten Zellen oder nach Applikation des Fluoreszenz Farbstoffes Dextranamin an retrograd gefärbten Zellen durchgeführt.

Bei der Patch-clamp-Technik wird eine Glaspipette mit einem Innendurchmesser von 1-2 μm (ca. 2-6 $\text{M}\Omega$) der Zellmembran genähert. Im "cell-attached" Modus ist man bei genügend hoher Abdichtung in der Lage, Einzelkanalaktivität zu beobachten. Auf der Basis dieser Konfiguration können zwei weitere Anordnungen erreicht werden. Durch vorsichtiges Zurückziehen der Elektrode kann die "inside-out"-Konfiguration erlangt werden. Überdies kann durch Erhöhung des zuvor angelegten Unterdrucks die unter der Pipette liegende Membran zerrissen werden, ohne daß die ursprünglich zwischen Pipette und Membran befindliche Verbindung zerstört wird. Die erreichte Anordnung wird als "whole-cell"-Konfiguration bezeichnet. In dieser Konfiguration erhält man unter günstigen Umständen einen gegen des Bad gut isolierten, zum Zellinneren jedoch recht niederohmigen Zugang. Über den letztgenannten Zugang läßt sich nun die ionale Zusammensetzung des Zellinneren kontrollieren. Aus der Anordnung läßt sich durch vorsichtiges Zurückziehen der Elektrode wiederum eine weitere Konfiguration erzielen, die sogenannte "outside-out"-Konfiguration.

Meßfehler bei Messungen mit ionensensitiven- und patch clamp-Elektroden.

Der Spitzendurchmesser ionenselektiver Mikroelektroden ist mehrfach größer (ca. 2-4 μm) als die durchschnittliche Weite des extrazellulären Raumes im Gewebe des zentralen Nervensystems (100-500 Å). Daher können die an den neuronalen- und Gliazellen lokal auftretenden Ionenkonzentrationsänderungen anders (größer oder kleiner) als die im Totraum um die Elektrode gemessenen ionalen Veränderungen sein. Neben diesem Fehler können bei Messungen mit ionensensitiven Elektroden Diffusionspotentiale entstehen, die sich bei Änderungen der extrazellulären Ionenkonzentration ebenfalls ändern und bis zu 10% Fehler der gemessenen Ionenkonzentrationen ergeben.

Bei Patch-Clamp Ableitungen versucht man in der Regel, die Zelle in der Spannungsklemme auf einem vorgegebenen Potential zu halten und den notwendigen Kompensationsstrom zu messen. Dieser ist direkt proportional zur Änderung der Leitfähigkeit, die wiederum in direktem Zusammenhang mit der Aktivierung von Ionenkanälen (z.B. postsynaptischen Transmitterrezeptoren) steht. Im Gegensatz zu konventionellen intrazellulären Ableitungen des somatischen Potentials im sogenannten Stromklemm-Modus können hierbei gegenüber dem eigentlichen synaptischen Ereignis stark verzerrte Zeitverläufe und Amplituden gemessen werden. Die wesentlichen Ursachen dieser Meßfehler sind: ein relativ zum Membranwiderstand signifikanter Widerstand zwischen Pipette und Zellinnerem (sogenannter Serienwiderstand) sowie eine hohe Kapazität und ein komplexes Verzweigungsmuster der Zelle (bei Neuronen als „space clamp“ Problem bekannt, das vor allem bei distal ansetzenden Synapsen eine große Rolle spielt).

In patch clamp Messungen wird je nach Aufgabenstellung ein auf kontinuierlicher Rückkopplung basierender patch clamp Verstärker oder ein diskontinuierlicher voltage clamp Verstärker (mit zyklischem Wechsel von Spannungsmessung und Strominjektion) verwendet. Beide Verstärker haben Vor- und Nachteile. Der ursprünglich von Hamill et al. (1981) entwickelte kontinuierliche Verstärker arbeitet mit sehr geringem Rauschen, ist aber anfällig für den Meßfehler durch hohe Serienwiderstände. Dagegen ist der diskontinuierliche voltage clamp Verstärker theoretisch unabhängig vom Serienwiderstand und verfügt über einen sehr zuverlässigen current clamp Modus. Sein Nachteil ist das relativ große Rauschen. Aus dem oben Gesagten ergibt sich, daß es für viele Fragestellungen praktisch ist, die voltage-clamp Messungen mit dem konventionellen, auf kontinuierlicher Rückkopplung basierenden patch clamp Verstärker durchzuführen, wenn man den Serienwiderstand möglichst weitgehend reduziert. Bei größeren Strömen, besonders bei Ableitung mit relativ engen (hochohmigen) Pipetten empfiehlt sich dagegen der diskontinuierliche Bautyp. Problematisch bleibt in jedem Fall die Spannungsklemme in stark verzweigten Zellen.

3.2. Fluoreszenz Messungen

Intrazelluläres „Ca²⁺-imaging“. Im Anschluß an die Penetration einer einzelnen Zelle mit einer konventionellen Mikroelektrode konnte der Ca²⁺ empfindliche Fluoreszenz-Farbstoff Fura-2 in die Zelle eingebracht werden. Das intrazelluläre Kalzium-Signal wurde im Soma sowie in den proximalen Dendriten mit Hilfe eines CCD-Kamera-Systems gemessen. Aus den Fluoreszenz-Signalen (360 und 380 nm Anregungswellenlänge) wurde die absolute intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration errechnet. Im Ruhezustand zeigten die Zellen gleichmäßig niedrige Ca²⁺-Spiegel in ihren Somata, Dendriten und Axonen. Die [Ca²⁺]_i-Spiegel unter Ruhebedingungen variierten von Zelle zu Zelle zwischen ca. 30 und 150 nM.

Darstellung der Projektionszellen und Faserverbindungen im entorhinalen Cortex-Hippocampus-Komplex mit Dextranaminen. Mit Hilfe des Farbstoffes Dextranamin haben wir die Projektionszellen und Faserverbindungen in *in vitro* Hirnschnittpräparaten des kombinierten EC-Hippocampuspräparates untersucht.

Dextranamine werden sowohl anterograd als auch retrograd nahezu gleich gut transportiert und bieten deshalb eine besonders gute Möglichkeit, die Zellen und Faserverbindungen in ihrem ganzen Verlauf darzustellen. Da die Farbstoffe allerdings nicht spontan in die Zellen aufgenommen werden, müssen im Bereich der Farbstoffapplikation kleine Läsionen gesetzt werden. Wenn die Fasern ihre funktionelle Integrität verlieren, geben sie den Farbstoff wieder ab, so daß mit diesem Verfahren nur lebende Faserverbindungen markiert werden können.

Als Farbstoff haben wir den Fluoreszenz-Farbstoff Tetramethylrhodamine Dextranamin („Fluoro Ruby“) (Schmued *et al.*, 1990) mit einem Molekulargewicht von 3000 verwendet. Der Farbstoff wird als Kristall mit Hilfe einer Nadel (Durchmesser 0.15 mm) unter visueller Kontrolle appliziert. Die Farbstoffapplikation erfolgte u.a. in die innere Molekularschicht oder Körnerzellschicht der AD.

Die Schnitte wurden für 8-10 Stunden in der Kammer umspült und anschließend in 4% Paraformaldehyd über Nacht bei 4° C fixiert. Danach wurden die Hirnschnittpräparate in 30%-iger Sucrose gewaschen und anschließend 50 µm dicke Schnitte mit Hilfe eines

Gefriermikrotoms angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen und mit UV-Inertmedium (Citifluor) eingebettet.

3.3. Immunohistochemische Färbung

Zur neurochemischen Charakterisierung der Projektionszellen des EC wurde die retrograde Färbung nach Applikation von Dextranamin in der AD in Kombination mit einer Immunofärbung mit Hilfe fluoreszenzgebundener Antikörper gegen GABA verwendet. Nach Dextranamin-Applikation wurden die Schnitte für 8-10 Stunden in der Kammer umspült und anschließend in 4% Paraformaldehyd über Nacht bei 4° C fixiert. Danach wurden sie für 24 Stunden in 30%-iger Sucrose (in 0.1 M PB bei 4° C) gelagert und anschliessend mit Hilfe eines Gefriermikrotoms 25 µm Dicke Dünnschnitte angefertigt. Die Dünnschnittpräparate wurden erst über Nacht mit primärem Antikörper (Kaninchen anti-GABA IgG, verdünnt 1:1000) und danach für 3 Stunden mit sekundärem Antikörper (fluoreszein konjugierte anti-Kaninchen IgG [Ziege], verdünnt 1:50) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie dehydriert und mit dem Einbettmedium (Fluoromount) eingedeckelt (Details siehe Gloveli *et al.*, eingereicht).

3.4. Biozytin Färbung

Zusätzlich zu den elektrophysiologischen Messungen mit konventionellen Mikroelektroden oder Patchpipetten wurde während der Messung der Farbstoff Biozytin in die jeweilige Zelle injiziert. Somit waren wir in der Lage, nach Färbung der Zelle, eine Korrelation zwischen Morphologie und Elektrophysiologie zu erstellen. Es wurde versucht, in einem Schnitt nur jeweils eine Zelle anzufärben, um spätere Struktur-Funktionsanalysen zu ermöglichen.

Nach Beendigung der intrazellulären Färbung wurde das Schnittpräparat zunächst für mindestens eine halbe Stunde nach der Ableitung in der Kammer belassen und anschließend über Nacht in eine Fixationslösung (4 % Paraformaldehyd in 0.1 M PB) gebracht.

Die Dünnschnittpräparate (75 µm Dicke) wurden mit Avidin-Biotin-Reagenz (ABC-Kit) und Diaminobenzidin (DAB)-Lösung inkubiert und anschließend durch Zugabe von Osmiumoxyd (OsO₄) intensiviert (Details siehe Gloveli *et al.*, 1997a).

4. Eigene Arbeiten

4.1. Morphologische und elektrophysiologische Charakterisierung der Schicht III-Zellen des medialen entorhinalen Cortex

Der EC nimmt eine entscheidende Rolle im limbischen System ein (Insausti, 1993; Jones, 1993). Obwohl von der Schicht III des EC der wichtigste Eingang zum Hippocampus proper ausgeht (Hjorth-Simonsen & Jeune, 1972; Steward & Scoville, 1976; Witter *et al.*, 1988; Witter, 1993), waren die Eigenschaften von Neuronen der Schicht III bisher wenig verstanden. In anatomischen Studien ist eine große Anzahl verschiedener Zelltypen in dieser Schicht beschrieben worden (Lorente de Nó, 1933; Germroth *et al.*, 1989a;b; Lingenhöhl & Finch, 1991). Das Ziel unserer Arbeit war es, mit kombinierten morphologischen und elektrophysiologischen Methoden die verschiedenen Zelltypen der Schicht III des mEC zu untersuchen und dabei besonders auf die intrinsischen und synaptischen Eigenschaften der einzelnen Zellen einzugehen.

Insgesamt haben wir 185 Zellen der Schicht III abgeleitet, wobei 40 Neurone morphologisch rekonstruiert werden konnten. Anhand morphologischer und elektrophysiologischer Parameter wurden vier verschiedene Zelltypen (Typ 1 bis 4) klassifiziert, die weiter in Projektionsneurone (Typ 1 und 2) und Lokalzellen (Typ 3 und 4) unterteilt wurden.

Typ 1-Zellen. Den am häufigsten vorkommenden Zelltyp (89 von 185 Zellen) nannten wir Typ 1. Dieser Zelltyp hat dicke Stammdendriten und weitverzweigte Dendritenbäume, die bis zur Cortexoberfläche reichen (Abb. 1, Ref. 1). Für diesen Typ sind zwei morphologische Merkmale charakteristisch: 1. die ausgeprägte horizontale Arborisierung der basalen Dendriten und 2. die späte Bifurkation des apikalen Hauptdendriten (Abb. 1, Ref. 1). Die Axone projizierten in Richtung Subiculum und die CA1-Region.

Diese Zellen zeigen reguläre Aktionspotentiale während depolarisierender Strominjektion sowie einen hohen Eingangswiderstand und eine relativ lange Zeitkonstante (Abb. 1 und Abb. 3, Ref. 1). Auf synaptische Stimulation antworteten die Zellen mit schnellen, CNQX-

sensitiven, und langsamen, APV-sensitiven EPSPs und gelegentlich mit kleinen, langsamen, CGP35348- und CGP55845A-sensitiven IPSPs. Charakteristisch für diesen Neuronentyp ist auch eine steile Eingangs-Ausgangs-Kurve auf elektrische Reizung afferenter Fasern. Dementsprechend sind diese Zellen leicht erregbar und weisen eine niedrige Schwelle zur Auslösung von Aktionspotentialen auf. Da sie direkt zur CA1-Region des Hippocampus projizieren, scheinen diese Eigenschaften besonders wichtig für die Informationsübertragung von der Schicht III des EC zum Hippocampus zu sein.

Eine kurze, hochfrequente (40 Hz) synaptische Stimulation führte zur Summation der langsamen IPSPs (Abb. 1Ad, Ref. 1).

Typ 2-Zellen. Typ 2-Neurone sind ebenfalls Pyramidenzellen. Im Gegensatz zu Typ 1-Neuronen weisen Typ 2-Zellen eine zirkuläre Anordnung der basalen Dendriten sowie eine frühe Bifurkation des apikalen Hauptdendriten auf. Die sieben morphologisch identifizierten Zellen lagen in einem Abstand von $405 \pm 22 \mu\text{m}$ zur Cortexoberfläche d.h. in der Schicht III des EC. Die Axone dieser Zellen projizierten ebenfalls zum Subiculum und zur CA1-Region des Hippocampus (Abb. 1B, Ref. 1).

Im Gegensatz zu den Typ 1-Zellen reagierte dieser Zelltyp während depolarisierender Strominjektion mit einer stärkeren Akkomodation der Aktionspotentiale (Abb. 6C, Ref. 1). Typ 2-Zellen haben einen signifikant niedrigeren Eingangswiderstand und eine kürzere Zeitkonstante als die vom Typ 1. Einmalige synaptische Reizung löste einen EPSP-fIPSP-sIPSP-Komplex aus. Das EPSP konnte durch CNQX blockiert werden. Das IPSP bestand aus zwei Komponenten, einer schnellen Bicucullin-sensitiven und einer langsamen, CGP35348-sensitiven Komponenten. Wie die Typ 1-Zellen zeigte dieser Neuronentyp bei repetitiver synaptischer Reizung ungewöhnlich langsame IPSPs (Abb. 1Bd, Ref. 1).

Die anderen Neurone des EC (Typ 3 und 4) waren ebenfalls Pyramidalzellen. Charakteristisch war jedoch, daß ihre Axone den EC nicht verließen. Deshalb nannten wir sie lokale EC Zellen. Im Gegensatz zu den Projektionszellen kamen sie nur selten vor.

Typ 3-Zellen. Typ 3-Zellen waren morphologisch leicht von den Projektionsneuronen zu unterscheiden, da sowohl die basalen als auch die apikalen Dendritenbäume eine zirkuläre Anordnung aufwiesen. Das Hauptaxon projizierte zu den tiefen Schichten des EC, zeigte

jedoch zuvor eine starke axonale Arborisierung, die sich nur innerhalb der Schicht III ausbreitete (Abb. 2, Ref. 1).

Dieser Zelltyp zeigt ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften wie die Typ 1-Zellen. Auf depolarisierende Strominjektion antworten auch diese Zellen mit regulären Entladungen von Aktionspotentialen. Dieser Neuronentyp weist ebenfalls einen hohen Eingangswiderstand und eine lange Zeitkonstante auf (Abb. 8, Ref. 1). Einmalige synaptische Reizung löst ein schnelles EPSP aus, das von einem deutlichen langsamen EPSP gefolgt wird. Ein wichtiges elektrophysiologisches Unterscheidungsmerkmal zu den Typ 1-Zellen war nach repetitiver Reizung zu sehen. Im Gegensatz zur Typ 1-Zellen, die mit einer Summation der IPSPs reagierten, summierten sich in den Typ 3-Zellen nur die EPSPs auf (Abb. 2 Ad, Ref. 1).

Typ 4-Zelle. Die morphologisch identifizierten Typ 4-Zellen wiesen eine zirkuläre Anordnung der basalen Dendriten auf. Die apikalen Dendriten erreichten wie die der Projektionszellen die corticale Oberfläche. Diese Zellen zeigten eine extensive axonale Arborisierung innerhalb der Schichten I bis III (Abb. 2B, Ref. 1).

Bei positiver Strominjektion antwortete dieser Zelltyp mit einer hohen Frequenz von Aktionspotentialen. Im Gegensatz zu allen anderen Zelltypen waren die synaptischen Antworten in Typ 4-Zellen von dem Stimulationsort abhängig. Bei einmaliger synaptischer Stimulation des lateralen EC reagierten diese Zellen mit einem schnellen EPSP, wobei sie bei elektrischer Stimulation der tiefen Schichten des medialen EC mit einem schnellen IPSP gefolgt von einem kleineren langsameren IPSP antworteten. Repetitive synaptische Reizung (40 Hz) führte sowohl bei den EPSPs als auch bei den IPSPs zu keiner Potenzierung (Abb. 2B, Ref 1).

4.2. Morphologische und elektrophysiologische Charakterisierung der Schicht II-Zellen des entorhinalen Cortex

Die Schicht II des EC ist eine der ersten Regionen, die zu Beginn der Alzheimerschen Erkrankung neurofibrilläre Bündel aufweist (Braak & Braak, 1991; Gómez-Isla *et al.*, 1996). Der größte Anteil der Schicht II-Zellen wird von Stellate- und nicht-Stellate-Zellen

gebildet. Zusätzlich zu diesen Zelltypen wurde ein neuer Zelltyp in der Schicht II des lateralen EC beschrieben mit im Vergleich zu den Projektionszellen sehr unterschiedlichen elektrophysiologischen und morphologischen Eigenschaften (Empson *et al.*, 1995). Diese pyramidenförmigen Zellen besitzen einen sehr starken, dornfortsatzfreien apikalen Dendriten. Die auffälligste morphologische Eigenschaft dieses Zelltyps ist jedoch seine starke axonale Arborisierung, die sich über die Schichten I bis III erstreckt und eine hohe Anzahl von Varikositäten aufweist (Empson *et al.*, 1995). Während sich sowohl in den Stellate als auch in den nicht-Stellate Zellen ein hyperpolarisationsaktivierter einwärtsgerichteter Strom (sag) beobachten ließ, konnte dies in dem neuen Zelltyp selbst bei großen hyperpolarisierenden Strompulsen nicht gesehen werden. Im Gegensatz zu den Projektionszellen der Schicht II ist dieser neue Zelltyp vermutlich für die exzitatorische Interaktion innerhalb des lateralen EC verantwortlich (Empson *et al.*, 1995).

Für die morphologische und elektrophysiologische Charakterisierung der Schicht II Stellate Zellen wurden intrazelluläre Ableitungen aus dieser Schicht des mEC durchgeführt. Die morphologisch identifizierten Zellen wiesen neben sehr stark verzweigten Dendriten Axone auf, die bis in den Hippocampus reichten. Während depolarisierender und hyperpolarisierender Strominjektionen zeichneten sich diese Zellen durch charakteristische, frühe maximale Membranpotentialantworten aus, die von einem Spannungsabfall auf ein niedrigeres Membranpotential (sag) gefolgt waren (Abb. 1Aa, Ref. 2). Darüber hinaus fielen die Neurone durch unterschwellige Membranpotential-Oszillationen auf. Dabei handelt es sich um rhythmische Schwankungen des Membranpotentials, die abhängig vom Haltepotential eine Frequenz von 8-20 Hz aufweisen (Theta- und Beta-Bereich). Interessanterweise sind diese Oszillationen nicht Kalzium- oder Kalium-abhängig, sondern reagieren auf den Na⁺-Blocker Tetrodotoxin (Klink & Alonso, 1993).

Im Gegensatz zu den Projektionszellen der Schicht III des mEC antworteten die Stellate Zellen der Schicht II mit einer deutlichen synaptischen Hemmung. Bei synaptischer Stimulation zeigte sich ein kleines EPSP, gefolgt von einem ausgeprägten schnellen und langsamen IPSP (Abb.1Ab, Ref. 2 und Abb. 1A, Ref. 6). Ein weiteres wichtiges elektrophysiologisches Merkmal dieser Zellen war eine flache Eingangs-Ausgangs-Kurve auf einzelne synaptischen Reize. Dementsprechend waren auch die zur Auslösung von

Aktionspotentialen erforderlichen Reizintensitäten wesentlich höher als bei den Projektionszellen der Schicht III (Gloveli *et al.*, 1997b).

Bei der Auslösung von schnellen IPSPs trat in den Stellate Zellen der Schicht II, wie auch in den Typ 2 Zellen der Schicht III des mEC, nach dem initialen hyperpolarisierenden IPSP eine zweite, langsamere, depolarisierende Komponente auf. Diese Komponente persistierte auch noch, wenn hohe Konzentrationen von Glutamat-Antagonisten appliziert wurden (NBQX 20 μ M, APV 120 μ M) (D. Schmitz, R. Hetka, J. Behr, T. Gloveli, H. Monyer, U. Heinemann, in Vorb.).

4.3. Charakterisierung der zur Area Dentata projizierenden tiefen Schichten (IV-VI) des medialen entorhinalen Cortex

Im EC waren persistierende rhythmische Membranpotential-Oszillationen nur von Stellate Zellen der Schicht II bekannt (Alonso & Llinás, 1989). In den tiefen Schichten des EC waren diese intrinsischen Oszillationen bisher nicht beschrieben worden. Jedoch hatten wir auch eine erstaunlich hohe Anzahl an Neuronen in den tiefen Schichten des EC gefunden, die, wie die Stellate Zellen der Schicht II, rhythmische unterschwellige Membranpotential-Oszillationen aufwiesen (Abb. 1, Ref. 3). Wie die Schicht II-Zellen zeigten auch diese Zellen Membranpotential-Oszillationen im Frequenzbereich zwischen 5-22 Hz. Pharmakologisch zeichneten sie sich durch ihre Tetrodotoxin-Sensitivität aus. Diese Zellen, die in Färbungen pyramidenförmige Somata zeigten, ließen sich vom Subiculum und von der AD aus antidrom aktivieren. Demzufolge nehmen wir an, daß diese Zellen zur erst kürzlich von Deller und Kollegen (Deller *et al.*, 1996) beschriebenen Projektion der tiefen Schichten des EC zur AD beitragen oder gar die Ausgangsstruktur der Projektion bilden. Um dieser Hypothese nachzugehen, haben wir den Fluoreszenz-Farbstoff Dextranamin in die molekulare Schicht der AD appliziert, um die rückläufig gefärbten Neurone in den tiefen Schichten des EC sowohl morphologisch als auch elektrophysiologisch zu untersuchen. Die gefärbten Neurone wurden mit Hilfe der patch-clamp Technik abgeleitet. Die weitere Biozytinfärbung dieser Neuronen zeigte, daß es sich um pyramidale und nicht-pyramidale (vertikale bipolare und multipolare) Projektionszellen handelte (Abb. 1-4, Ref. 4). Axone beider Typen projizieren über den

perforant path zur molekularen Schicht der AD. Zudem geben diese Neurone aufsteigende axonale Kollaterale zu den oberflächlichen Schichten des EC ab. Sowohl pyramidale als auch nicht-pyramidale Neurone zeigen reguläre Aktionspotentiale während depolarisierender Strominjektion (Abb. 2 und 4, Ref. 4). Eine wesentliche Anzahl der Pyramidenzellen zeigen intrinsische Membranpotential-Oszillationen (Abb. 2, Ref. 4). Trotz morphologischer Ähnlichkeiten zu den GABAergen Interneuronen des EC, zeigen die vertikalen bipolaren und multipolaren Neurone ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften wie die Prinzipalneurone des EC. Immunohistochemische Untersuchungen mit GABA-Antikörpern bestätigten ihre nicht-GABAerge Natur (Abb. 1, Ref. 4). Unsere Untersuchungen zeigten, daß beide Zelltypen - sowohl pyramidale als auch nicht-pyramidale Neurone – gleichzeitig Funktionen von Lokal- und Projektionsneuronen übernehmen können. Diese Eigenschaft ist vermutlich verantwortlich für die schnelle Informationsübertragung von den tiefen zu den oberflächlichen Schichten des EC.

4.4. Frequenzabhängige Informationsübertragung vom medialen entorhinalen Cortex zum Hippocampus

Der EC erhält über den post- und perirhinalen Cortex aus allen sensorischen Systemen konvergente Informationen. Diese erreichen über die Neurone der zweiten Schicht (Tamamaki & Nojyo, 1993) und der tiefen Schichten (Deller *et al.*, 1996; Schmitz *et al.*, 1998c; Gloveli *et al.*, eingereicht) die AD des Hippocampus.

Für die Beteiligung der EC-AD-Hippocampus-Projektion an Lernprozessen spricht die Tatsache, daß an den entsprechenden synaptischen Verbindungen sehr einfach Langzeit-Potenzierung induziert werden kann. Unter physiologischen Bedingungen wird dies vereinfacht, wenn die betroffenen synaptischen Verbindungen im Theta-Frequenzbereich aktiviert werden (Staubli & Lynch, 1987; Yeckel & Berger, 1998). Seit längerer Zeit ist bekannt, daß sowohl Tiere als auch Menschen im EC-Hippocampus-Komplex Theta-Aktivität aufweisen, wenn sie neuen Reizkonstellationen ausgesetzt werden. Der Theta-Rhythmus kann sowohl im EC als auch im Hippocampus beobachtet werden (Alonso & García-Austt, 1987a;b; Alonso & Llinás, 1989; Stewart *et al.*, 1992) und koordiniert die Interaktion dieser Strukturen.

Um den selektiven Transfer von sensorischen Informationen über den EC in den Hippocampus zu untersuchen, führten wir Reizungen der synaptischen Eingänge bei unterschiedlichen Frequenzen durch. Es stellte sich die Frage, unter welchen Bedingungen die beiden separaten Projektionen von Schicht II und III aktiviert bzw. gehemmt werden. Representative Ableitungen sind in der Abbildung 2 (Ref. 2) gezeigt. Die Schicht II-Zellen werden vor allem dann synaptisch aktiviert, wenn die Afferenzen mit Frequenzen oberhalb von 6 Hz gereizt wurden, wohingegen bei Reizfrequenzen <6 Hz keine Aktionspotentiale auftraten. Schicht III-Projektionsneurone ließen sich hingegen besonders leicht durch niederfrequente Reizung der synaptischen Eingänge aktivieren, während sie bei Frequenzen oberhalb von 10 Hz unerregbar waren (Abb. 2, Ref. 2). Somit werden die beiden Eingänge des Hippocampus frequenzabhängig moduliert, mit dem Ergebnis, daß niederfrequente Aktivität aus dem rhinalen Cortex über den EC bevorzugt die CA1-Region und das Subiculum erreicht, während höherfrequente Informationen bevorzugt den Weg über die AD aktivieren. Interessanterweise zeigte sich eine Überlappungsfrequenz von 6-10 Hz, bei der beide Eingänge aktiviert werden konnten.

Die Körnerzellen der AD besitzen aufgrund ihrer intrinsischen Eigenschaften eine hohe Schwelle für die synaptische Aktivierung (siehe Lambert & Jones, 1990). Demzufolge könnten die hochfrequenten Entladungen, die bei Stimulation der Schicht II-Zellen beobachtet wurden, für die Informationsübertragung über die trisynaptische Schleife erforderlich sein.

Ein weiterer Unterschied zwischen Schicht II- und Schicht III-Zellen zeigte sich im Anschluß an die repetitiven synaptischen Stimulationen. Während die Schicht II-Neurone nur kurze Phasen der Nachhyperpolarisation (200-500 ms) aufwiesen, folgten den Schicht III-Zellen Nachhyperpolarisationen, die bis zu 20 s andauern konnten (Abb. 1-3, Ref. 5). Da diese langanhaltenden Nachhyperpolarisationen weder in den Zellen der Schicht II noch in den Lokalzellen der Schicht III nachweisbar waren, scheint dieses Phänomen eine charakteristische Eigenschaft der Projektionsneurone der Schicht III zu sein.

Die langanhaltende synaptische Hyperpolarisation in den Schicht III-Projektionszellen ließ sich pharmakologisch in drei Komponenten aufteilen: eine ca. 1s lange Komponente, zu der $GABA_B$ Rezeptoren beitragen (Umkehrpotential ca. -90 mV), eine mittlere

Komponente (1-6 s, sIPSP₂, Umkehrpotential ca. -84 mV), die sich durch Atropin vermindern aber nicht vollständig blockieren ließ, und eine späte Komponente (6- 20 s), die durch Naloxon gehemmt wurde (Abb. 7, 8, Ref. 5). Unsere Ergebnisse zeigen damit, daß GABAerge (vermittelt über den GABA_B-Rezeptor) cholinerge und enkephalinerge Mechanismen an der lang anhaltenden Hyperpolarisation beteiligt sind.

Es wurde gezeigt, daß Dynorphin und Enkephalin verschiedene K⁺-Leitfähigkeiten aktivieren können (Duggan & North, 1983; Werz & Macdonald, 1983). Diese Befunde könnten die beobachtete Blockade der späten Komponente durch Naloxon erklären. Zudem konnten im EC Opioid-Rezeptoren (● -, ✱- und ✎-Rezeptoren) nachgewiesen werden (Mansour *et al.*, 1995). Bisherige Untersuchungen bezogen sich nur auf die Effekte von Naloxon auf heterosynaptische Langzeit-Potenzierung (LTP) oder Langzeit-Depression (LTD) (Bramham *et al.*, 1988; Derrick *et al.*, 1992; Weisskopf *et al.*, 1993; Terman *et al.*, 1994; Xie & Lewis, 1995). Unsere Ergebnisse zeigen, daß auch synaptisch freigesetzte Enkephaline im EC zu postsynaptischen Antworten führen können.

Auf eine Beteiligung von K⁺-Leitfähigkeiten am sIPSP₂ deutet das Umkehrpotential dieser Komponente (-84 mV) hin, welches sich nahe dem Umkehrpotential für Kalium befindet. Da das IPSP₂ sowohl bei Reizung unterschiedlicher weiter entfernter Orten als auch bei naher Reizung beobachtet werden konnte, müssen u.a. lokale Interneurone für die Generierung dieses inhibitorischen postsynaptischen Potentials verantwortlich gemacht werden. Das weist darauf hin, daß sich im EC cholinerge Neurone befinden (siehe De Lacalle *et al.*, 1998). Eine andere Möglichkeit wäre, daß cholinerge Fasern im Schnittpräparat überleben und nach elektrischer Reizung zur Ausschüttung von Azetylcholin mit nachfolgender postsynaptischer Antwort führen. Tatsächlich gibt es mehrere Hirnareale (basale Vorderhirnkerne, Septum, Pallidum) in denen sich cholinerge Neurone befinden, die den EC innervieren (Alonso & Köhler, 1984; Milner & Amaral, 1984; Woolf *et al.*, 1984; Eckenstein *et al.*, 1988).

4.5. Muskarinerge und serotonerge Kontrolle der Erregbarkeit von Projektionsneuronen der Schicht II und III des entorhinalen Cortex

Die Rolle des Azetylcholin (ACh) bei der Modulation neuronaler Aktivität ist seit längerer Zeit bekannt. Es wird angenommen, daß das cholinerge System einen Einfluß auf Lernen und Gedächtnis hat (Bland, 1996; Shen *et al.*, 1996). Sowohl die oberflächlichen als auch die tiefen Schichten des EC erhalten cholinerge Afferenzen vom basalen Vorderhirn (Lewis & Shute, 1967; Mellgren & Srebro, 1973; Milner *et al.*, 1983; Alonso & Köhler, 1984; Lysakowski *et al.*, 1989; Gaykema *et al.*, 1990). Der muskarinerge Antagonist Atropin reduziert die oben beschriebene langsame Hyperpolarisation in Schicht III-Projektionszellen (IPSP₂) um ca. 70%, was für eine Beteiligung des ACh an der Genese dieser Antwort spricht (Gloveli *et al.*, 1997c).

Unter intrazellulärer Applikation eines Kalzium-empfindlichen Fluoreszenz-Farbstoffes (Fura-2) haben wir Membranpotentialänderungen und Änderungen der postsynaptischen $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration in EC-Neuronen der Schicht II und III nach intrazellulärer Strominjektion sowie nach Druckapplikation des muskarinischen Azetylcholin-Rezeptor-Agonisten Carbachol (CCh) gemessen. Neben den elektrophysiologischen Kriterien (Gloveli *et al.*, 1997a) nutzten wir morphologische Charakteristika nach Fura-2-Färbung zur Klassifizierung der entorhinalen Neurone der Schicht II und III.

Druckapplikation von CCh in niedriger Konzentration (1 mM) führte zu einer leichten Depolarisation des Membranpotentials von Schicht III-Projektionsneuronen. In einigen wenigen Zellen kam es nach CCh-Applikation zu einer isolierten Hyperpolarisation oder zu einem biphasischen Verlauf, bei dem eine Depolarisation von einer Hyperpolarisation gefolgt wurde. Applikation von CCh in höherer Konzentration (10 mM) induzierte eine deutlich stärkere Depolarisation des Membranpotentials, welche zudem länger andauerte als unter niedrigen CCh-Konzentrationen. Zudem kam es unter höherer CCh-Konzentration häufig zu spontan auftretenden synaptischen Potentialen und epileptiformen Entladungen (Abb. 2, Ref. 6). Potentiale mit repetitiven Entladungen waren weder durch Hyperpolarisation noch durch Depolarisation blockierbar. CCh-vermittelte Depolarisationen und spontane PSPs führten zu keiner meßbaren Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ Konzentration. Unterschwellige Depolarisation des Membranpotentials nach

Strominjektion war auch nicht von intrasomatischer Ca^{2+} -Akkumulation begleitet. Dies deutet auf das Fehlen oder die geringe Ausprägung niedrig-spannungsaktivierter Kalzium-Kanäle in diesen Zellen hin. Unter epileptiformer Aktivität hingegen kam es in den meisten Fällen zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums (Abb. 2, Ref. 6), vermutlich über die Öffnung hoch-spannungsaktivierter Ca^{2+} -Kanäle.

Applikation von CCh in niedriger Konzentration resultierte in Stellate Neuronen der Schicht II in einer ausschließlichen Depolarisation sowie rhythmischen PSPs (Abb. 3, Ref. 6). Im Gegensatz zu Neuronen der Schicht III gingen vergleichbare Depolarisationen nach intrazellulärer Strominjektion mit intrinsischen Oszillationen und intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegen einher (Abb. 5, Ref. 6). Dieses Ca^{2+} -Signal wurde in niedriger Konzentration durch den Ca^{2+} -Kanal Antagonisten Ni^{2+} blockiert. Dieser Befund weist auf niedrig-spannungsaktivierte Kalzium-Kanäle in diesen Zellen hin.

Um die relative Dichte hoch-spannungsaktivierter Kanäle zu vergleichen, untersuchten wir die intrasomatische Kalziumakkumulation in den Neuronen der oberflächlichen Schichten des EC während hochfrequenter Serien von intrinsisch generierten Aktionspotentialen. Durch Strominjektion generierte Aktionspotentiale mit einer Frequenz von ca. 10 Hz führten zu einer deutlich höheren Akkumulation von Kalzium in Schicht III-Neuronen als solchen in der Schicht II-Zellen (Abb. 6, Ref. 6). Unsere Studie mit CCh-Applikationen zeigte zudem, daß, obwohl die Muskarin-Rezeptor-Aktivierung zu epileptiformen Entladungen in allen oberflächlichen Schichten führte, der begleitende intrazelluläre Ca-Anstieg in Schicht III-Neuronen bedeutend größer war als in Schicht II-Neuronen (Abb. 2-4, Ref. 6). Es ist denkbar, daß der durch Aktivierung der tiefen Schichten bedingte, starke Anstieg des intrasomatischen Kalzium für den bei Temporallappenepilepsie beschriebenen Zelluntergang der Schicht III-Neurone (Du *et al.*, 1993; Du *et al.*, 1995) verantwortlich ist.

Im Gegensatz zu den intrinsischen Theta-Rhythmen der Stellate-Zellen (mit einem Maximum bei einer Frequenz von 7 Hz) führte Applikation von CCh (1 mM) in den tiefen Schichten (Schicht V-VI) zu Oszillationen der Schicht II- und III-Zellen des EC mit drei charakteristischen Maxima im Theta- und Gamma-Frequenz-Bereich (bei 11, 23 und 40 Hz). Bemerkenswert ist die Tatsache, daß CCh zudem zu paroxysmalen Depolarisationen dieser Projektionszellen führte. Dies zeigt, daß sowohl die synaptische als auch die

epileptiforme Aktivität in oberflächlichen Schichten von den tiefen Schichten des EC aus generiert werden kann (siehe hierzu Dickson & Alonso, 1997).

Im Gegensatz zu CCh führte die Aktivierung des serotonergen Systems zur Unterdrückung der synaptischen Übertragung in den oberflächlichen EC-Neuronen (Abb. 2-4, Ref. 7). Die Experimente mit Serotonin zeigten, daß dosisabhängig sowohl die EPSPs (Schmitz *et al.*, 1997) als auch sekundär die polysynaptischen IPSPs unterdrückt wurden (Schmitz *et al.*, 1998d). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu Befunden in hippocampalen Pyramidenzellen, wo Serotonin in niedrigen Konzentrationen zu einer Zunahme der EPSP-Amplituden führt (Segal, 1990; Schmitz *et al.*, 1995a) und lediglich hohe Konzentrationen von Serotonin die EPSPs unterdrücken (Schmitz *et al.*, 1995a). Dort wurde zudem gezeigt, daß Serotonin sowohl polysynaptische (Segal, 1990; Ghadimi *et al.*, 1994; Schmitz *et al.*, 1995b) als auch monosynaptische IPSPs verringert (Schmitz *et al.*, 1995b).

Als nächstes untersuchten wir die zugrundeliegenden subzellulären Mechanismen der Unterdrückung der synaptischen Übertragung in den EC-Neuronen. Zwei Mechanismen kommen für die Abnahme der EPSPs in Frage: eine Hemmung präsynaptischer Glutamat-Ausschüttung oder die Modulation postsynaptischer AMPA- bzw. NMDA-Rezeptoren. Mit Hilfe von Patch-Clamp-Messungen von "miniature"-EPSCs (mEPSPs) und Glutamaterezeptor-Einzelkanal-Strömen bei schneller Glutamatapplikation an "outside-out-patches" untersuchten wir, welche der oben genannten Mechanismen der Reduktion von synaptisch evozierten Antworten zugrunde lagen. Schnelle Applikation von Glutamat an "outside-out-patches" mit und ohne Serotonin zeigte, daß Serotonin keinerlei Effekt auf Amplitude und Kinetik der AMPA- und der NMDA-Rezeptor-vermittelten Antworten hat (Abb. 5, Ref. 7). Damit ist ein postsynaptischer Mechanismus der Unterdrückung von EPSPs durch Serotonin unwahrscheinlich (Schmitz *et al.*, 1998d). Daraufhin wurde der Effekt von Serotonin auf spontane glutamaterge mEPSCs getestet (Abb. 6, Ref. 7). Nach Applikation von Serotonin (50 μ M) wurde eine drastische Reduktion der Frequenz der mEPSCs beobachtet, während die Amplituden-Verteilung unverändert blieb.

Serotonin führte also über einen präsynaptischen Mechanismus zu einer starken Unterdrückung der Freisetzung von Glutamat. Die Effekte von Serotonin in Schicht III-Neuronen des EC, die überwiegend hemmende Zellen in der Area CA1 aktivieren

(Buzsáki, 1984; Empson & Heinemann, 1995b), können somit zu einer Disinhibition in der Area CA1 beitragen und dadurch die Erregbarkeit dieser Region verstärken.

4.6. Einfluß von MK-801 auf den entorhinalen Cortex und auf die Interaktion zwischen entorhinalen Cortex und Hippocampus

Trotz intensiver Forschung sind die der Schizophrenie zugrundeliegenden Ursachen unbekannt. Der Mangel an experimentellen Modellen hat die Erforschung der Pathophysiologie der Schizophrenie und anderer Psychosen, wie beispielsweise der manisch-depressiven Form, erschwert. Phencyclidin und andere Anästhetika (Ketamin) führen zu psychotischen Symptomen, welche der Schizophrenie ähneln (Javitt & Zukin, 1991). Phencyclidine (Phencyclidin, Ketamin und MK-801, PCP) binden als nicht-kompetitive Inhibitoren an die Phencyclidin-Bindungsstelle am Ionenkanal des NMDA-Glutamatrezeptors. Wie andere NMDA-Rezeptorantagonisten zeigt PCP neuroprotektive Eigenschaften und schützt Neurone gegenüber experimentell induzierten Ischämien (Park *et al.*, 1988; Dirnagl *et al.*, 1990). Im Gegensatz zu diesen neuroprotektiven Effekten sind paradoxerweise reversible neurotoxische Effekte von PCP an Neuronen des posterioren Cingulums und retrosplenialen Cortex der Ratte beschrieben worden (Olney *et al.*, 1989). Castrén und Kollegen (Castrén *et al.*, 1993) haben eine PCP-induzierte Expression der mRNA von neurotrophen Faktoren sowie eine vermehrte Expression von c-FOS im Cingulum, retrosplenialen Cortex sowie im mEC beobachtet. Die Induktion der mRNA in geschädigten Neuronen ist sehr stark und langanhaltend. Die paradoxen PCP-Effekte im mEC betreffen nur die Neurone der Schicht III im dorsalen Anteil des mEC. Die zugrundeliegenden Mechanismen sowohl der paradoxen PCP-Effekte als auch der PCP-induzierten Psychose sind nicht bekannt. Es besteht allerdings eine Korrelation zwischen der Psychose beim Menschen und den paradoxen PCP-Effekten im limbischen Cortex der Ratte (Olney *et al.*, 1989). Zudem verhindern antipsychotische Medikamente die paradoxen PCP-Effekte im retrosplenialen Cortex (Farber *et al.*, 1993). Weiterhin korreliert die Verteilung der durch PCP-geschädigten Neurone sehr eng mit den Arealen, deren Zytoarchitektur bei Schizophrenie gestört ist (Roberts, 1990). Diese Daten lassen vermuten, daß die paradoxen PCP-Effekte einen Bezug zu den psychotischen Symptomen

haben und somit als ein experimentelles Modell für die PCP-induzierte Psychose dienen könnten.

Ziel unserer Untersuchungen war es herauszufinden, welche Wirkung MK-801 bei systemischer Applikation auf den EC hat und ob sich die *in vivo* ermittelten Ergebnisse auch am Hirnschnitt nachvollziehen lassen. In den Versuchen wurden durch Stimulation der Schicht III des lateralen EC evozierte Feldpotentiale in den Schichten II, III und V des mEC abgeleitet. Die Untersuchungen an mit MK-801-vorbehandelten Ratten haben gezeigt, daß bei intraperitonealer Verabreichung in höheren Konzentrationen (4 mg/kg) alle Komponenten der reizinduzierten Feldpotentialantworten in der Schicht III des mEC signifikant verkleinert sind, nicht jedoch in der Schicht II und Schicht V (Abb 1, Ref. 8). Bei den *in vitro* Versuchen ließen sich die oben genannten Ergebnisse bei einer Konzentration von 1 µM MK-801 [entspricht derjenigen, die das Hirn bei systemischer Applikation von 4 mg/kg erreicht (Willis *et al.*, 1991; Hatfield *et al.*, 1992)] nicht reproduzieren (Abb. 2, Ref. 8). Erst bei der wesentlich höheren Konzentrationen von 200 µM konnten signifikante, jedoch nicht schichtspezifische Verkleinerungen des Feldpotentials in den Schichten III und V beobachten werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß MK-801 nicht nur als NMDA-Rezeptor-Antagonist wirkt, sondern wahrscheinlich auch mit anderen Transmittersystemen interagiert (Olney & Farber, 1995). Zur Zeit ist jedoch nicht klar, um welche anderen Transmittersysteme es sich dabei handelt und ob die beobachteten Effekte im EC reversibel sind oder zum Absterben der betroffenen Zellen führen.

Die beobachteten schichtspezifischen Veränderungen in Schicht III des mEC an mit MK-801-vorbehandelten Ratten führten zu der Hypothese, daß das frequenzgesteuerte Schaltverhalten von Schicht-III-Zellen auf die CA1-Region sowie das Subiculum gestört ist. Dies könnte erklären, warum es in Folge von Phencyclidinapplikationen zu kognitiven Defiziten als Bestandteil von Psychosen kommt.

4.7. Die Entstehung und Ausbreitung epileptiformer Entladungen vom entorhinalen Cortex zum Hippocampus

In tierexperimentellen *in vitro* Untersuchungen können in kombinierten EC-hippocampus Schnitten durch Erniedrigung der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration spontane epileptiforme Entladungen induziert werden (Walther *et al.*, 1986; Heinemann, 1987; Mody *et al.*, 1987; Jones & Heinemann, 1988; Heinemann & Jones, 1990; Zhang *et al.*, 1994). Während in den hippocampalen CA3- und CA1-Regionen kurze (40-80 ms) rekurrente epileptiforme Entladungen auftreten, welche über lange Zeit stabil sind, ist die Aktivität im EC durch länger andauernde (10-90 s), anfallsartige Ereignisse charakterisiert, welche nach 60-90 Minuten in rekurrente Entladungen übergehen (Matsumoto & Ajmone-Marsan, 1964a;b; Jones & Heinemann, 1988; Heinemann & Jones, 1990; Zhang *et al.*, 1994). Trotz der in den Hirnschnitten gut erhaltenen Faserverbindungen zwischen dem EC und dem Hippocampus (Boulton *et al.*, 1992; Gloveli *et al.*, eingereicht) werden die anfallsartigen Ereignisse nicht zu den hippocampalen CA3- und CA1-Regionen übertragen (Dreier & Heinemann, 1991). Dies legt die Vermutung nahe, daß die AD eine Filterfunktion besitzt, welche die Ausbreitung epileptiformer Aktivität vom EC zum Hippocampus unterbindet. Mit dieser Hypothese steht der Befund im Einklang, daß die Körnerzellen der AD durch Basket- und Chandelier-Zellen stark gehemmt werden (Patton & McNaughton, 1995). Diese hemmende Kontrolle wird sowohl durch $GABA_A$ - als auch durch $GABA_B$ -Rezeptoren vermittelt (Rausche *et al.*, 1989).

Da viele Epilepsien schon im Kindesalter beginnen, hat uns die Empfindlichkeit des juvenilen EC-Hippocampus-Komplexes für die Auslösung und Ausbreitung epileptiformer Aktivität interessiert. Wir konnten zeigen, daß die Niedrig-Magnesiumepilepsie im juvenilen Gewebe leichter, d.h. bereits bei geringer Erniedrigung des extrazellulären Mg^{2+} auslösbar ist (Abb 1, Ref. 9). Im Gegensatz zu den erwachsenen Tieren konnten wir in juvenilen Tieren eine Ausbreitung epileptiformer Aktivität vom mEC über die AD in die CA3- und CA1-Regionen beobachten (Abb. 4-7, Ref. 9). Zu diesem Zeitpunkt ist die AD noch unreif und aufgrund einer verspäteten Ausreifung von Chlorid-Pumpen wirken $GABA_A$ -Rezeptor-vermittelte Potentiale depolarisierend (Cherubini *et al.*, 1991; Ben-Ari *et al.*, 1994). Im Laufe der postnatalen Entwicklung beteiligen sich die AD, später die

CA3-Region und zuletzt die CA1-Region nicht mehr länger an der epileptiformer Aktivität des EC und des Subiculus (Gloveli *et al.*, 1998). Dies deutet auf eine verstärkte exzitatorische Interaktion zwischen EC und Hippocampus beim juvenilen Tier hin. Eine weitere Möglichkeit ist, daß die Schicht III des EC bei den jungen Tieren verstärkt an der Anfallsgenese beteiligt ist und daß dieser Prozeß altersabhängig ist, da bei erwachsenen Tieren den tiefen Schichten des EC die größere Bedeutung für die Entstehung epileptischer Aktivität zugesprochen wird (Dickson & Alonso, 1997; Gloveli *et al.*, 1999).

5. Schlußfolgerung und Ausblick

EC und Gedächtnisbildung

Der entorhinale Cortex (EC) stellt die wichtigste Schaltstation zwischen Cortex und Hippocampus dar und spielt eine wesentliche Rolle sowohl beim Lernen und der Gedächtnisbildung (Eichenbaum *et al.*, 1994; Young *et al.*, 1997; Suzuki, 1999) als auch bei neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen (Braak & Braak, 1991; Du *et al.*, 1993; Jakob & Beckmann, 1994). Zusammen mit peri- und postrhinalem Cortex besitzen der EC und der Hippocampus die Fähigkeit neue Informationen aufzunehmen und ins deklarative Langzeitgedächtnis zu übertragen (Squire & Zola, 1996). Der Hippocampus stellt dabei nur einen kurzzeitigen Speicher für Inhalte des Langzeitgedächtnisses dar (Eichenbaum *et al.*, 1994), während eine permanente Speicherung in kortikalen Hirnregionen stattfindet (Squire, 1992; Skaggs & McNaughton, 1996; Zanatta *et al.*, 1996). Das grundlegende Ziel der Gedächtnisforschung ist es, neuronale Mechanismen zu finden, welche der Gedächtnisbildung zugrunde liegen. In diesem Zusammenhang ist das Verständnis der Funktion der Projektionsneurone des EC und des Hippocampus während der Gedächtnisbildung (d.h. Speicherung, Transfer, Abruf) notwendig.

Die hier beschriebenen *in vitro* Studien haben das gemeinsame Ziel, die Eigenschaften und Besonderheiten von Neuronen der oberflächlichen und tiefen Schichten des EC im Detail zu beschreiben, um die Informationsübertragung zwischen dem EC und dem Hippocampus besser zu verstehen. Besonderes Gewicht wurde dabei auf intrinsische und synaptische Eigenschaften der Projektionszellen gelegt. Die Ergebnisse tragen somit zum Verständnis von Mechanismen bei, die bei der Informationsübertragung und –speicherung *in vivo* von Bedeutung sind.

Unsere Untersuchungen der intrinsischen und synaptischen Eigenschaften der Projektionszellen des EC zeigen, daß die Projektionen von den Schichten II und III des EC zum Hippocampus unter unterschiedlichen Bedingungen aktiviert bzw. gehemmt werden können (Gloveli *et al.*, 1997b). Die Befunde sprechen dafür, daß die beiden Eingänge des Hippocampus frequenzabhängig moduliert werden. Niederfrequente Aktivität aus dem rhinalen Cortex wird über den EC bevorzugt zur CA1-Region und dem Subiculum

durchgeschaltet, während höherfrequente Aktivität bevorzugt den Weg über die AD nimmt. Stellate-Zellen der Schicht II und Pyramiden-Zellen der Schicht III stellen die Hauptprojektionszellen des medialen EC dar. Stellate-Zellen der Schicht II zeigen unter-schwellige Membranpotential-Oszillationen (Alonso & Llinás, 1989; Alonso & Klink, 1993), die in den Zellen der Schicht III nicht auftreten (Gloveli *et al.*, 1997a). Eigene Untersuchungen zeigen, daß ein wichtiges elektrophysiologisches Merkmal der Stellate-Zellen eine hohe Schwelle für die Auslösung von Aktionspotentialen auf einzel- oder niedrigfrequente (• 5 Hz) repetitive Stimulation des lateralen EC ist (Gloveli *et al.*, 1997b). Im Gegensatz zu den Stellate-Zellen, sind Pyramidenzellen der Schicht III leichter erregbar und zeigen eine signifikant niedrigere Schwelle zur Auslösung von Aktionspotentialen. Diese Situation ändert sich jedoch während hochfrequenter (> 10 Hz) synaptischer Reizung des lateralen EC. Hochfrequente Stimulation führt zu einer selektiven Aktivierung der Stellate-Zellen der Schicht II und zu einer deutlichen Hemmung der Pyramiden-Zellen der Schicht III, welche nicht nur während der repetitiven Reizung, sondern bis zu 20 s nach der Stimulation anhält (Gloveli *et al.*, 1997c). Unsere Ergebnisse zeigen somit, daß für den Informationstransfer vom EC zur AD eine hochfrequente synaptische Aktivierung von Projektionszellen der Schicht II des EC erforderlich ist. Zahlreiche Studien an Neuronen des perirhinalen Cortex [welcher den Haupteingang des lateralen EC darstellt (Naber *et al.*, 1997)] und des EC zeigen tatsächlich, daß diese Strukturen auf bestimmte neue Reize mit einer hochfrequenten Entladungsrate reagieren. Diese selektiven Antworten nehmen allerdings bei wiederholter Präsentation des Reizes systematisch ab. In hippocampalen Neuronen konnten keine vergleichbaren Reaktionen entdeckt werden (zum Überblick siehe Suzuki, 1999). *In vivo* Untersuchungen hippocampaler Zellen zeigen ebenfalls, daß die frequenzabhängige Aktivierung der Schicht II und III Zellen des EC für die Informationsübertragung im EC-Hippocampus Komplex notwendig ist. Es wurde gezeigt, daß polysynaptische Aktivierung des EC mit hohen (6 Hz) Frequenzen eher zu einer Erregung der AD führt als mit niedrigerer (0.5 Hz) Frequenz (Deadwyler *et al.*, 1975a;b). Zudem wurde bei niederfrequenter Reizung (0.2 Hz) des Tractus perforans eine überschwellige monosynaptische Aktivierung der CA1- und CA3-Region beobachtet, während die polysynaptische Reizung über die trisynaptische Schleife eine unter-schwellige Aktivierung hervorruft. Die Wahrscheinlichkeit für eine überschwellige polysynaptische Erregung

nimmt bei höheren Frequenzen (5-10 Hz) zu (Yeckel & Berger, 1990). Es wurde zudem *in vivo* gezeigt, daß repetitive (10 – 20 Hz) Reizung von EC Efferenzen zur AD Langzeitpotenzierung (LTP) der Mossy-Synapsen in der CA3-Region induziert (Yeckel & Berger, 1998). Diese frequenzabhängige Neurotransmission über die AD scheint von funktioneller Bedeutung für Lern- und Gedächtnis Prozesse zu sein. Die letzte Station der trisynaptischen entorhinal-hippocampalen Schleife stellt die CA1-Region dar. Die Aktivierung von CA1-Zellen kann der Langzeit-Speicherung von zuvor im Hippocampus bearbeiteter Information im Cortex dienen (Lisman, 1999). Zur Erfüllung dieser Funktion ist jedoch die Aktivierung von CA1-Zellen erforderlich, die eine vorwiegend hemmende Wirkung von Schicht III-Zellen des EC erhält (Empson & Heinemann, 1995b; Soltesz, 1995). Unsere Experimente zeigen, daß der hochfrequente Eingang der Schicht III-Zellen zu einer langhaltenden Inhibition dieser Neurone führt (Gloveli *et al.*, 1997b). Diese Befunde unterstreichen, daß die Hemmung von Schicht III-Zellen für die Disinhibition von CA1-Zellen und damit für die Gedächtnisbildung von Bedeutung ist.

Einfluß cholinerg und serotonerg Eingänge im EC bei Lern- und Gedächtnisprozessen

Es ist bekannt, daß das cholinerge System für Lern- und Gedächtnisprozesse von wesentlicher Bedeutung ist (Bland, 1996; Shen *et al.*, 1996). Es ist gezeigt worden, daß die oberflächlichen und tiefen Schichten des EC cholinerge Afferenzen vom basalen Vorderhirn erhalten (Lewis & Shute, 1967; Mellgren & Srebro, 1973; Milner *et al.*, 1983; Alonso & Köhler, 1984; Lysakowski *et al.*, 1989; Gaykema *et al.*, 1990). Unsere Befunde deuten darauf hin, daß die cholinerge Aktivierung der tiefen Schichten des EC verantwortlich ist für die synaptischen Oszillationen der oberflächlichen Zellen des EC (Gloveli *et al.*, 1999) und zu der für Lern- und Gedächtnisprozesse erforderlichen neuronalen Synchronisierung beitragen. Unsere Experimente zeigen, daß Druckapplikation des muskarinergen Azetylcholin-Rezeptor-Agonisten CCh zu rhythmischen synaptischen Oszillationen in den oberflächlichen Zellen des EC führt (Gloveli *et al.*, 1999). Besonders bemerkenswert ist, daß Applikation von CCh in den tiefen Schichten wesentlich eher (d.h. mit niedrigeren Konzentrationen) zu Membranpotential-Oszillationen (Theta- und Gamma-Frequenz-Bereich) in den oberflächlichen Zellen des EC führte als durch

Applikation von CCh in oberflächlichen Schichten (Gloveli *et al.*, 1999). In verhaltensphysiologischen Studien repräsentieren Gamma-Oszillationen (40-100 Hz) im EC die synchronisierten synaptischen Potentiale der Neurone der Schichten II und III (Chrobak & Buzsáki, 1998). Sie überlagern dabei häufig gleichzeitig auftretende Theta-Oszillationen (Penttonen *et al.*, 1998), in deren Gegenwart sie stärker ausgeprägt sind (Chrobak & Buzsáki, 1998). Unsere *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, daß die Zellen der tiefen Schichten bei einem Membranpotential von -50 mV in der Lage sind, spannungsabhängige unterschwellige Theta-Oszillationen zu generieren (Schmitz *et al.*, 1998c). Dabei muß berücksichtigt werden, daß die Frequenz bei geringfügig positiverem Potential (-44 mV) schon 20 Hz betrug und die Oszillationen von Clustern nicht-adaptierender Aktionspotentiale mit höherer Frequenz unterbrochen wurden. Wir folgern daraus, daß die Zellen der tiefen Schichten in die Generierung rhythmischer synaptischer Potentiale im Thetafrequenzbereich der oberflächlichen Schichten involviert sind. Unklar ist weiterhin, ob diese Zellen auch für Gamma-Oszillationen wichtig sind. Alternativ sollte man die Möglichkeit bedenken, daß es eine Untergruppe anderer Prinzipalneurone im EC gibt, die für die Gamma-Oszillationen verantwortlich sind. In neueren Untersuchungen wurden im visuellen Kortex Pyramidenzellen gefunden, die bei überschwelliger Depolarisation Gamma-Oszillationen generieren (Gray & McCormick, 1996).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das cholinerge System für die Synchronisierung im Theta und Gamma-Frequenz-Bereich innerhalb des EC eine wichtige Rolle spielt. Gamma-Oszillationen stellen eine kohärente Entladung mehrerer Neurone dar, die im Cortex und Hippocampus *in vivo* und *in vitro* abgeleitet werden können und vermutlich die gleichzeitige Aktivierung von Engrammen verschiedener Eigenschaften eines Objektes widerspiegeln (sog. „binding“, siehe Singer & Gray, 1995). Dieses Merkmal kann wichtig für den Abrufsprozess von vorher gespeicherten Informationen sein. Erkennen eines im Gedächtnis gespeicherten Objekts aus der Summe seiner Eigenschaften (wie z.B. Form, Farbe und so weiter) wäre dann durch den Funktionszustand kohärent oszillierender Ensembles von Neuronen definiert, die jeweils auf die einzelnen Modalitäten reagieren. Es ist denkbar, daß die Interaktion zwischen den durch cholinerge

Eingänge aktivierten tiefen und oberflächlichen Schichten des EC eine wesentliche Rolle bei Abrufsprozessen spielt.

Eine wichtige Funktion bei Lern- und Gedächtnisbildung wird auch dem serotoninergeren System zugesprochen (Richter-Levin *et al.*, 1993; Richter-Levin *et al.*, 1994). Unsere Arbeit hat gezeigt, daß im Gegensatz zum cholinergen System Serotonin die synaptische Erregung der Projektionszellen in den oberflächlichen Schichten des EC unterdrückt (Schmitz *et al.*, 1998d). Eine entgegengesetzte Wirkung zeigt 5-HT im Hippocampus, wo es die synaptische Hemmung in den Projektionszellen unterdrückt (Segal, 1990; Oleskevich & Lacaille, 1992; Ghadimi *et al.*, 1994; Schmitz *et al.*, 1995b) und dadurch die Erregbarkeit der Projektionszellen erhöht. Der stark hemmende Effekt von 5-HT auf Schicht III Zellen des EC (Schmitz *et al.*, 1995c; Schmitz *et al.*, 1998d), welche überwiegend hemmende Zellen in der CA1-Region aktivieren (Empson & Heinemann, 1995a;b; Soltesz, 1995) kann somit zu einer Zunahme der Erregbarkeit in dieser Region führen. Diese Wirkung von Serotonin kann für den Informationstransfer von zuvor im Hippocampus bearbeiteter Information zum Cortex von Bedeutung sein.

Interaktion zwischen EC und Hippocampus bei Temporallappenepilepsie

Die Prinzipalneurone des EC, des Hippocampus und des Subiculum sind nicht nur in Lern- und Gedächtnisprozesse, sondern auch in verschiedene neurologische Erkrankungen involviert. Es sind Läsionen im EC bei Temporallappenepilepsien beschrieben worden, wobei vor allem die Schicht III des EC betroffen ist (Du *et al.*, 1993). Der EC zeigt sowohl beim Patienten mit Temporallappenepilepsie als auch im Temporallappenepilepsie-Modell des Tieres eine erhöhte Anfallbereitschaft (Dasheiff & McNamara, 1982; Collins *et al.*, 1983; Rutecki *et al.*, 1989; Spencer & Spencer, 1994). Schließlich unterstreichen elektrophysiologische *in vitro* Untersuchungen die Beteiligung des EC an der Generierung und Ausbreitung von epileptiformen Anfallsereignissen im EC-Hippocampuskomplex (Jones & Heinemann, 1988; Jones & Lambert, 1990a; Dreier & Heinemann, 1991; Paré *et al.*, 1992). *In vitro* Untersuchungen der epileptiformen Entladungen zeigen, daß diese Aktivität meistens in den tiefen Schichten des EC beginnt (Walther *et al.*, 1986; Jones & Heinemann, 1988; Jones *et al.*, 1992) und synchronisierte Entladungen in den oberflächlichen Schichten induziert (Jones & Lambert, 1990a;b). Untersuchungen zum

Ausbreitungsverhalten epileptiformer Aktivität im kombinierten hippocampal-entorhinalen Hirnschnittpräparat (Niedrig-Mg²⁺-Epilepsiemodell) zeigen, daß keine Ausbreitung entorhinaler epileptiformer Entladungen vom EC zum Hippocampus stattfindet (Walther *et al.*, 1986; Dreier & Heinemann, 1991). Unsere Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die Projektionszellen der Schicht III durch hochfrequente synaptische Aktivierung der tiefen Schichten langanhaltend gehemmt werden (Gloveli *et al.*, 1997b;c). Obwohl die epileptische Aktivität der tiefen Schichten auch Schicht II Stellate-Zellen aktiviert, erreicht diese Aktivität im adulten Tier in der Regel nicht den Hippocampus, da der AD eine Filterfunktion zugesprochen wird, welche die Ausbreitung epileptischer Aktivität vom EC zum Hippocampus unterbindet (Heinemann *et al.*, 1992; Lothman *et al.*, 1992). Wie unsere Experimente zeigen, scheint diese Filterfunktion der AD jedoch modulierbar zu sein. Untersuchungen der Ausbreitung von im EC generierter epileptiformer Aktivität am tierexperimentellen Epilepsiemodell (Amygdala-Kindling) zeigen (Behr *et al.*, 1996), daß die epileptiforme Aktivität aus dem EC auch den Hippocampus rekrutieren kann. Demzufolge scheint die Filterfunktion der AD nach Kindlingepilepsie aufgehoben zu sein. Unsere Untersuchungen am Niedrig-Mg²⁺-Epilepsiemodell zeigen zudem, daß auch in der juvenilen Ratte, im Gegensatz zum adulten Tier, im Hippocampus es zu einer Beteiligung langanhaltender elektrographischer Anfallsereignisse kommt (Gloveli *et al.*, 1995). Diese Experimente deuten darauf hin, daß auch im juvenilen Tiere die Filterfunktion der AD aufgehoben ist (Gloveli *et al.*, 1995). Es stellt sich die Frage, welche Konsequenzen die Fortleitung epileptiformer Entladungen aus dem EC in den Hippocampus hat. Es ist zu vermuten, daß bei Abwesenheit der Filterfunktion der AD die Möglichkeit zirkulierender epileptiformer Aktivität vom EC über die trisynaptische Schaltkreis zur CA1-Region und zum Subiculum besteht. Welche Bedeutung der bei der Temporallappenepilepsie vorliegende Untergang der Schicht III-Zellen des EC (Du *et al.*, 1993) für die Ausbreitung epileptiformer Entladungen vom EC zum Hippocampus besitzt ist bislang unklar.

Die hier zusammengefaßten experimentellen *in vitro* Studien zeigen, daß der EC nicht nur eine corticale Schaltstation ist und der passiven Weiterleitung von sensorischen Informationen zum und vom Hippocampus dient, sondern durch aktive Signalverarbeitung in verschiedenen Schichten auch eine wesentliche Informationsverarbeitung leistet. Zum weiteren Verständnis der spezifischen Rolle dieser Struktur in der

Informationsverarbeitung sowie Informationsübertragung vom EC zum Hippocampus sind zukünftig vor allem die Interaktion zwischen den Zellen der tiefen und oberflächlichen Schichten des EC von besonderem Interesse.

6. Zitierte Literatur

- AIGNER, T. G. & MISHKIN, M. (1986) . The effects of physostigmine and scopolamine on recognition memory in monkeys. *Behav. Neural Biol.* **45**, 81-87.
- ALONSO, A. & GARCÍA-AUSTT, E. (1987a) . Neuronal sources of theta rhythm in the entorhinal cortex of the rat. I. Laminar distribution of theta field potentials. *Exp. Brain Res.* **67**, 493-501.
- ALONSO, A. & GARCIA-AUSTT, E. (1987b) . Neuronal sources of theta rhythm in the entorhinal cortex of the rat. II. Phase relations between unit discharges and theta field potentials. *Exp. Brain Res.* **67**, 502-509.
- ALONSO, A. & KLINK, R. (1993) . Differential electroresponsiveness of stellate and pyramidal-like cells of medial entorhinal cortex layer II. *J. Neurophysiol.* **70**, 128-143.
- ALONSO, A. & KÖHLER, C. (1984) . A study of the reciprocal connections between the septum and the entorhinal area using anterograde and retrograde axonal transport methods in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **225**, 327-343.
- ALONSO, A. & LLINÁS, R. R. (1989) . Subthreshold Na⁺-dependent theta-like rhythmicity in stellate cells of entorhinal cortex layer II. *Nature* **342**, 175-177.
- AMARAL, D. G. & WITTER, M. P. (1989) . The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* **31**, 571-591.
- AMARAL, D. G. & WITTER, M. P. (1995) . The hippocampal formation. In *The rat nervous system*, ed. Paxinos, G., pp. 443-494. Academic Press, New York.
- ANDERSEN, P., BLISS, T. V. P., & SKREDE, K. K. (1971) . Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp. Brain Res.* **13**, 222-238.
- ASCHER, P. & NOWAK, L. (1988) . The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J. Physiol. Lond.* **399**, 247-266
- AULT, B., EVANS, R. H., FRANCIS, A. A., OAKES, D. J., & WATKINS, J. C. (1980) . Selective depression of excitatory amino acid induced depolarizations by magnesium ions in isolated spinal cord preparations. *J. Physiol. Lond.* **387**, 413-428
- BARTUS, R. T., DEAN, R. L., BEER, B., & LIPPA, A. S. (1982) . The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* **217**, 408-414.
- BECKSTEAD, R. M. (1978) . Afferent connections of the entorhinal area in the rat as demonstrated by retrograde cell-labeling with horseradish peroxidase. *Brain Res.* **152**, 249-264.

- BEHR, J., GLOVELI, T., GUTIÉRREZ, R., & HEINEMANN, U. (1996) . Spread of low Mg²⁺ induced epileptiform activity from the rat entorhinal cortex to the hippocampus after kindling studied in vitro. *Neurosci.Lett.* **216**, 41-44.
- BEN-ARI, Y., TSEEB, V., RAGGOZZINO, D., KHAZIPOV, R., & GAIARSA, J.-L. (1994) . gamma-Aminobutyric acid GABA: a fast excitatory transmitter which may regulate the development of hippocampal neurones in early postnatal life. *Prog.Brain Res.* **102**, 261-273
- BENARDO, L. S. & PRINCE, D. A. (1982) . Ionic mechanisms of cholinergic excitation in mammalian hippocampal pyramidal cells. *Brain Res.* **249**, 333-344.
- 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**, 417-538.
- BLAND, B. H. (1996) . The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog.Neurobiol.* **26**, 1-54.
- BOBILLIER, P., PETITJEAN, F., SALVERT, D., LIGIER, M., & SEGUIN, S. (1975) . Differential projections of the nucleus Raphe dorsalis and nucleus Raphe centralis as revealed by autoradiography. *Brain Res.* **85**, 205-210.
- BOULTON, C. L., VON HAEBLER, D., & HEINEMANN, U. (1992) . Tracing of axonal connections by rhodamine-dextran-amine in the rat hippocampal-entorhinal cortex slice preparation. *Hippocampus* **2**, 99-106.
- BRAAK, H. & BRAAK, E. (1991) . Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.Berl.* **82**, 239-259.
- BRAAK, H. & BRAAK, E. (1993) . Entorhinal-hippocampal interaction in mnestic disorders. *Hippocampus* **3 Suppl.**, 239-246.
- BRAMHAM, C. R., ERRINGTON, M. L., & BLISS, T. V. P. (1988) . Naloxone blocks the induction of long-term potentiation in the lateral but not the medial perforant pathway in the anesthetized rat. *Brain Res.* **449**, 352-356.
- BURWELL, R. D. & AMARAL, D. G. (1998a) . Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *J.Comp.Neurol.* **398**, 179-205.
- BURWELL, R. D. & AMARAL, D. G. (1998b) . Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: Interconnectivity and connections with the entorhinal cortex. *J.Comp.Neurol.* **391**, 293-321.
- BURWELL, R. D., WITTER, M. P., & AMARAL, D. G. (1995) . Perirhinal and postrhinal cortices of the rat: a review of the neuroanatomical literature and comparison with findings from the monkey brain [published erratum appears in *Hippocampus* 1996 **6** 3:340]. *Hippocampus* **5**, 390-408

- BUZSÁKI, G. (1984) . Feed-forward inhibition in the hippocampal formation. *Prog.Neurobiol.* **22**, 131-153.
- BUZSÁKI, G., HORVÁTH, Z., URIOSTE, R., HETKE, J., & WISE, K. (1992) . High-frequency network oscillation in the hippocampus. *Science* **256**, 1025-1027.
- CAPOGNA, M., GAHWILER, B. H., & THOMPSON, S. M. (1996) . Presynaptic inhibition of calcium-dependent and -independent release elicited with ionomycin, gadolinium, and alpha-latrotoxin in the hippocampus. *J.Neurophysiol.* **75**, 2017-2028.
- CASTRÉN, E., DA PENHA BERZAGHI, M., LINDHOLM, D., & THOENEN, H. (1993) . Differential effects of MK-801 on brain-derived neurotrophic factor mRNA levels in different regions of the rat brain. *Exp.Neurol.* **122**, 244-252.
- CHEN, G. & VAN DEN POL, A. N. (1998) . Presynaptic GABAB autoreceptor modulation of P/Q-type calcium channels and GABA release in rat suprachiasmatic nucleus neurons. *J.Neurosci.* **18**, 1913-1922.
- CHERUBINI, E., GAIARSA, J.-L., & BEN-ARI, Y. (1991) . GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.* **14**, 515-519.
- CHROBAK, J. J. & BUZSÁKI, G. (1994) . Selective activation of deep layer V-VI retrohippocampal cortical neurons during hippocampal sharp waves in the behaving rat. *J.Neurosci.* **14**, 6160-6170
- CHROBAK, J. J. & BUZSÁKI, G. (1996) . High-frequency oscillations in the output networks of the hippocampal-entorhinal axis of the freely behaving rat. *J.Neurosci.* **16**, 3056-3066.
- CHROBAK, J. J. & BUZSÁKI, G. (1998) . Gamma oscillations in the entorhinal cortex of the freely behaving rat. *J.Neurosci.* **18**, 388-398.
- COLE, A. E. & NICOLL, R. A. (1983) . Acetylcholine mediates a slow synaptic potential in hippocampal pyramidal cells. *Science* **221**, 1299-1301.
- COLINO, A. & HALLIWELL, J. V. (1987) . Differential modulation of three separate K-conductances in hippocampal CA1 neurons by serotonin. *Nature* **328**, 73-77.
- COLLINS, R. C., TEARSE, R. G., & LOTHMAN, E. W. (1983) . Functional anatomy of limbic seizures: focal discharges from medial entorhinal cortex in rat. *Brain Res.* **280**, 25-40.
- COYLE, J. T., PRICE, D. L., & DELONG, M. R. (1983) . Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* **219**, 1184-1190.
- CUTTING, G. R., LU, L., O'HARA, B. F., KASCH, L. M., MONTROSE-RAFIZADEH, C., DONOVAN, D. M., SHIMADA, S., ANTONARAKIS, S. E., GUGGINO, W. B., UHL, G. R., & KAZAZIAN, H. H., JR. (1991) . Cloning of the α -aminobutyric

acid GABA rho 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 2673-2677.

- DASHEIFF, R. M. & MCNAMARA, J. O. (1982) . Electrolytic entorhinal lesions cause seizures. *Brain Res.* **231**, 444-450.
- DAVIES, P. & MALONEY, A. J. (1976) . Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet* **2**, 1403-1403.
- DE LACALLE, S., KULKARNI, S., & WILEY, R. G. (1998) . Lesion-induced transneuronal plasticity of the cholinergic innervation in the adult rat entorhinal cortex. *Eur.J.Neurosci.* **10**, 1054-1062.
- DEADWYLER, S. A., WEST, J. R., COTMAN, C. W., & LYNCH, G. (1975a) . Physiological studies of the reciprocal connections between the hippocampus and entorhinal cortex. *Exp.Neurol.* **49**, 35-57.
- DEADWYLER, S. A., WEST, J. R., COTMAN, C. W., & LYNCH, G. S. (1975b) . A neurophysiological analysis of commissural projections to dentate gyrus of the rat. *J.Neurophysiol.* **38**, 167-184.
- DELLER, T., MARTÍNEZ, A., NITSCH, R., & FROTSCHER, M. (1996) . A novel entorhinal projection to the rat dentate gyrus: Direct innervation of proximal dendrites and cell bodies of granule cells and GABAergic neurons. *J.Neurosci.* **16**, 3322-3333.
- DELLER, T., NITSCH, R., & FROTSCHER, M. (1994) . Associational and commissural afferents of parvalbumin- immunoreactive neurons in the rat hippocampus: A combined immunocytochemical and PHA-L study. *J.Comp.Neurol.* **350**, 612-622.
- DELLER, T., NITSCH, R., & FROTSCHER, M. (1995) . Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin tracing of commissural fibers to the rat dentate gyrus: evidence for a previously unknown commissural projection to the outer molecular layer. *J.Comp.Neurol.* **352**, 55-68.
- DERRICK, B. E., RODRIGUEZ, S. B., LIEBERMAN, D. N., & MARTINEZ, J. L., JR. (1992) . Mu opioid receptors are associated with the induction of hippocampal mossy fiber long-term potentiation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **263**, 725-733.
- DICKSON, C. T. & ALONSO, A. (1997) . Muscarinic induction of synchronous population activity in the entorhinal cortex. *J.Neurosci.* **17**, 6729-6744.
- DIRNAGL, U., TANABE, J., & PULSINELLI, W. (1990) . Pre- and post-treatment with MK-801 but not pretreatment alone reduces neocortical damage after focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res.* **527**, 62-68.
- DRAGUHN, A., TRAUB, R. D., SCHMITZ, D., & JEFFERYS, J. G. R. (1998) . Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus in vitro. *Nature* **394**, 189-192.

- DREIER, J. P. & HEINEMANN, U. (1990) . Late low magnesium-induced epileptiform activity in rat entorhinal cortex slices becomes insensitive to the anticonvulsant valproic acid. *Neurosci.Lett.* **119**, 68-70.
- DREIER, J. P. & HEINEMANN, U. (1991) . Regional and time dependent variations of low magnesium induced epileptiform activity in rat temporal cortex. *Exp.Brain Res.* **87**, 581-596.
- DU, F., EID, T., LOTHMAN, E. W., KÖHLER, C., & SCHWARCZ, R. (1995) . Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rat models of temporal lobe epilepsy. *J.Neurosci.* **15**, 6301-6313.
- DU, F., WHETSELL, W. O., JR., ABOU-KHALIL, B., BLUMENKOPF, B., LOTHMAN, E. W., & SCHWARCZ, R. (1993) . Preferential neuronal loss in layer III of the entorhinal cortex in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res.* **16**, 223-233.
- DUGGAN, A. W. & NORTH, R. A. (1983) . Electrophysiology of opioids. *Pharmacol.Rev.* **35**, 221-281.
- ECKENSTEIN, F. P., BAUGHMAN, R. W., & QUINN, J. (1988) . An anatomical study of cholinergic innervation in rat cerebral cortex. *Neuroscience* **25**, 457-474.
- EICHENBAUM, H., OTTO, T., & COHEN, N. J. (1994) . Two functional components of the hippocampal memory system. *Behav.Brain Sci.* **17**, 449-518.
- EMPSON, R. M., GLOVELI, T., SCHMITZ, D., & HEINEMANN, U. (1995) . Electrophysiology and morphology of a new type of cell within layer II of the rat lateral entorhinal cortex in vitro. *Neurosci.Lett.* **193**, 149-152.
- EMPSON, R. M. & HEINEMANN, U. (1995a) . Perforant path connections to area CA1 are predominantly inhibitory in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice preparation. *Hippocampus* **5**, 104-107.
- EMPSON, R. M. & HEINEMANN, U. (1995b) . The perforant path projection to hippocampal area CA1 in the rat hippocampal-entorhinal cortex combined slice. *J.Physiol. Lond.* **484**, 707-729
- FARBER, N. B., PRICE, M. T., LABRUYERE, J., NEMNICH, J., PETER, H. S., WOZNIAK, D. F., & OLNEY, J. W. (1993) . Antipsychotic drugs block phencyclidine receptor-mediated neurotoxicity. *Biol.Psychiatry* **34**, 119-121.
- FLICKER, C., FERRIS, S. H., & REISBERG, B. (1991) . Mild cognitive impairment in the elderly: predictors of dementia. *Neurology* **41**, 1006-1009.
- FOSTER, T. C., CASTRO, C. A., & MCNAUGHTON, B. L. (1989) . Spatial selectivity of rat hippocampal neurons: Dependence on preparedness for movement. *Science* **244**, 1580-1582.

- FREUND, T. F. & BUZSÁKI, G. (1996) . Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* **6**, 347-470.
- GAYKEMA, R. P. A., LUITEN, P. G. M., NYAKAS, C., & TRABER, J. (1990) . Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J.Comp.Neurol.* **293**, 103-124.
- GERBER, U., STEVENS, D. R., MCCARLEY, R. W., & GREENE, R. W. (1991) . Muscarinic agonists activate an inwardly rectifying potassium conductance in medial pontine reticular formation neurons of the rat in vitro. *J.Neurosci.* **11**, 3861-3867.
- GERMROTH, P., SCHWERDTFEGER, W. K., & BUHL, E. H. (1989a) . GABAergic neurons in the entorhinal cortex project to the hippocampus. *Brain Res.* **494**, 187-192.
- GERMROTH, P., SCHWERDTFEGER, W. K., & BUHL, E. H. (1989b) . Morphology of identified entorhinal neurons projecting to the hippocampus. A light microscopical study combining retrograde tracing and intracellular injection. *Neuroscience* **30**, 683-691.
- GHADIMI, B. M., JAROLIMEK, W., & MISGELD, U. (1994) . Effects of serotonin on hilar neurons and granule cell inhibition in the guinea pig hippocampal slice. *Brain Res.* **633**, 27-32.
- GLOVELI, T., ALBRECHT, D., & HEINEMANN, U. (1995) . Properties of low Mg²⁺ induced epileptiform activity in rat hippocampal and entorhinal cortex slices during adolescence. *Dev.Brain Res.* **87**, 145-152.
- GLOVELI, T., DUGLADZE, T., SCHMITZ, D., & HEINEMANN, U.) 2000) . Properties of the entorhinal cortex deep layer neurons projecting to the rat dentate gyrus. *J.Neurosci.*, submitted.
- GLOVELI, T., EGOROV, A. V., SCHMITZ, D., HEINEMANN, U., & MÜLLER, W. (1999) . Carbachol-induced changes in excitability and [Ca²⁺]_i signalling in projection cells of medial entorhinal cortex layers II and III. *Eur.J.Neurosci.* **11**, 3626-3636.
- GLOVELI, T., SCHMITZ, D., EMPSON, R. M., DUGLADZE, T., & HEINEMANN, U. (1997a) . Morphological and electrophysiological characterisation of layer III cells of the medial entorhinal cortex of the rat. *Neuroscience* **77**, 629-648.
- GLOVELI, T., SCHMITZ, D., EMPSON, R. M., & HEINEMANN, U. (1997b) . Frequency-dependent information flow from the entorhinal cortex to the hippocampus. *J.Neurophysiol.* **78**, 3444-3449.
- GLOVELI, T., SCHMITZ, D., & HEINEMANN, U. (1997c) . Prolonged inhibitory potentials in layer III projection cells of the rat medial entorhinal cortex induced by synaptic stimulation in vitro. *Neuroscience* **80**, 119-131.

- GLOVELI, T., ISERHOT, C., SCHMITZ, D., CASTRÉN, E., BEHR, J., & HEINEMANN, U. (1997d) . Systemic administration of the phencyclidine compound MK-801 affects stimulus-induced field potentials selectively in layer III of rat medial entorhinal cortex. *Neurosci.Lett.* **221**, 93-96.
- GLOVELI, T., SCHMITZ, D., & HEINEMANN, U. (1998) . Interaction between superficial layers of the entorhinal cortex and the hippocampus in normal and epileptic temporal lobe. *Epilepsy Res.* **32**, 183-193.
- GÓMEZ-ISLA, T., PRICE, J. L., MCKEEL, D. W., JR., MORRIS, J. C., GROWDON, J. H., & HYMAN, B. T. (1996) . Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J.Neurosci.* **16**, 4491-4500.
- GRAY, C. M. & MCCORMICK, D. A. (1996) . Chattering cells: superficial pyramidal neurons contributing to the generation of synchronous oscillations in the visual cortex [see comments]. *Science* **274**, 109-113.
- HAAS, H. L. & JEFFERYS, J. G. R. (1984) . Low-calcium field burst discharges of CA1 pyramidal neurones in rat hippocampal slices. *J.Physiol. Lond* **354**, 185-201
- HAJ-DAHMANE, S. & ANDRADE, R. (1996) . Muscarinic activation of a voltage-dependent cation nonselective current in rat association cortex. *J.Neurosci.* **16**, 3848-3861.
- HALLIWELL, J. V. & ADAMS, P. R. (1982) . Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.* **250**, 71-92.
- HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., & SIGWORTH, F. J. (1981) . Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflug.Arch.Eur.J.Phy.* **391**, 85-100.
- HAMON, B., STANTON, P. K., & HEINEMANN, U. (1987) . An N-methyl-D-aspartate receptor-independent excitatory action of partial reduction of extracellular [Mg²⁺] in CA 1-region of rat hippocampal slices. *Neurosci.Lett.* **75**, 240-245.
- HATFIELD, R. H., GILL, R., & BRAZELL, C. (1992) . The dose-response relationship and therapeutic window for dizocilpine MK-801 in a rat focal ischaemia model *Eur.J.Pharmacol.* **216**, 1-7
- HEINEMANN, U. (1987) . Basic mechanisms of the epilepsies. In *A textbook of clinical neurophysiology*, eds. Halliday, A. M., Butler, S. R., & Paul, R., pp. 497-534. John Wiley & Sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- HEINEMANN, U., BECK, H., DREIER, J. P., FICKER, E., STABEL, J., & ZHANG, C. L. (1992) . The dentate gyrus as a regulated gate for the propagation of epileptiform activity. In *The dentate gyrus and its role in seizures*, eds. Ribak, C. E., Gall, C. M., & Mody, I., pp. 273-280. Elsevier Science Publishers BV., Amsterdam.

- HEINEMANN, U. & JONES, R. S. G. (1990) . Neurophysiology. In *Comprehensive Epileptology*, eds. Dam, M. & Gram, L., pp. 17-42. Raven Press,. New York
- HERRON, C. E., WILLIAMSON, R., & COLLINGRIDGE, G. L. (1985) . A selective N-methyl-D-aspartate antagonist depresses epileptiform activity in rat hippocampal slices. *Neurosci.Lett.* **61**, 255-260.
- HJORTH-SIMONSEN, A. & JEUNE, B. (1972) . Origin and termination of the hippocampal perforant path in the rat studied by silver impregnation. *J.Comp.Neurol.* **144**, 215-232.
- INSAUSTI, R. (1993) . Comparative anatomy of the entorhinal cortex and hippocampus in mammals. *Hippocampus* **3 Suppl.**, 19-26.
- JAKOB, H. & BECKMANN, H. (1994) . Circumscribed malformation and nerve cell alterations in the entorhinal cortex of schizophrenics. Pathogenetic and clinical aspects. *J.Neural Transm.* **98**, 83-106.
- JAVITT, D. C. & ZUKIN, S. R. (1991) . Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am.J.Psychiatry* **148**, 1301-1308.
- JEFFERYS, J. G. R. & HAAS, H. L. (1982) . Synchronized bursting of CA1 hippocampal pyramidal cells in the absence of synaptic transmission. *Nature* **300**, 448-450.
- JONES, R. S. G. (1993) . Entorhinal-hippocampal connections: A speculative view of their function. *Trends Neurosci.* **16**, 58-64.
- JONES, R. S. G. & HEINEMANN, U. (1988) . Synaptic and intrinsic responses of medial entorhinal cortical cells in normal and magnesium-free medium in vitro. *J.Neurophysiol.* **59**, 1476-1497.
- JONES, R. S. G., HEINEMANN, U., & LAMBERT, J. D. C. (1992) . The entorhinal cortex and generation of seizures activity: studies of normal synaptic transmission and epileptogenesis in vitro. In *Neurotransmitters in Epilepsy*, eds. Avanzini, G., Engel, J., Fariello, R., & Heinemann, U., pp. 173-180. Elsevier, Amsterdam.
- JONES, R. S. G. & LAMBERT, J. D. C. (1990a) . The role of excitatory amino acid receptors in the propagation of epileptiform discharges from the entorhinal cortex to the dentate gyrus in vitro. *Exp.Brain Res.* **80**, 310-322.
- JONES, R. S. G. & LAMBERT, J. D. C. (1990b) . Synchronous discharges in the rat entorhinal cortex in vitro: Site of initiation and the role of excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* **34**, 657-670.
- JOUVET, M. (1973) . Serotonin and sleep in the cat. In *Serotonin and Behavior*, eds. Barchas, J. & Usdin, E., pp. 385-400. Academic Press, New York, London.
- KINON, B. J. & LIEBERMAN, J. A. (1996) . Mechanisms of action of atypical antipsychotic drugs: A critical analysis. *Psychopharmacology* **124**, 2-34.

- KLINK, R. & ALONSO, A. (1993) . Ionic mechanisms for the subthreshold oscillations and differential electroresponsiveness of medial entorhinal cortex layer II neurons. *J.Neurophysiol.* **70**, 144-157.
- KLINK, R. & ALONSO, A. (1997) . Muscarinic modulation of the oscillatory and repetitive firing properties of entorhinal cortex layer II neurons. *J.Neurophysiol.* **77**, 1813-1828.
- KONNERTH, A. & HEINEMANN, U. (1983) . Effects of GABA on presumed presynaptic Ca²⁺ entry in hippocampal slices. *Brain Res.* **270**, 185-189.
- KÖHLER, C. (1988) . Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain: III. The lateral entorhinal area. *J.Comp.Neurol.* **271**, 208-228.
- LAMBERT, J. D. C. & HEINEMANN, U. (1986) . Extracellular calcium changes accompanying the action of excitatory amino acids in area CA1 of the hippocampus. Possible implications for the initiation and spread of epileptic discharges. In *Epilepsy and calcium*, eds. Speckmann, E.-J., Schulze, H., & Walden, J., pp. 35-61. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
- LAMBERT, J. D. C. & JONES, R. S. G. (1990) . A reevaluation of excitatory amino acid-mediated synaptic transmission in rat dentate gyrus. *J.Neurophysiol.* **64**, 119-132.
- LAMBERT, N. A. & WILSON, W. A. (1996) . High-threshold Ca²⁺ currents in rat hippocampal interneurons and their selective inhibition by activation of GABAB receptors. *J.Physiol. Lond* **492**, 115-127.
- LESCHINGER, A., STABEL, J., IGELMUND, P., & HEINEMANN, U. (1993) . Pharmacological and electrographic properties of epileptiform activity induced by elevated K⁺ and lowered Ca²⁺ and Mg²⁺ concentration in rat hippocampal slices. *Exp.Brain Res.* **96**, 230-240.
- LEWIS, P. R. & SHUTE, C. C. D. (1967) . The cholinergic limbic system: projections to hippocampal formation, medial cortex, nuclei of the ascending cholinergic reticular system, and the subfornical organ and supra-optic crest. *Brain* **90**, 521-540.
- LINDÉN, A. M., VÄSÄINEN, J., WONG, G., & CASTRÉN, E. (1997) . NMDA receptor 2C subunit is selectively decreased by MK- 801 in the entorhinal cortex. *Eur.J.Pharmacol.* **319**, R1-R2.
- LINGENHÖHL, K. & FINCH, D. M. (1991) . Morphological characterization of rat entorhinal neurons in vivo: Soma-dendritic structure and axonal domains. *Exp.Brain Res.* **84**, 57-74.
- LISMAN, J. E. (1999) . Relating hippocampal circuitry to function: recall of memory sequences by reciprocal dentate-CA3 interactions. *Neuron* **22**, 233-242.
- LORENTE DE NO, R. (1933) . Studies on the structure of the cerebral cortex. *J.Psychol.Neurol.* **45**, 381-438.

- LORENTE DE NO, R. (1934) . Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *J.Psychol.Neurol.* **46**, 113-177.
- LOTHMAN, E. W., STRINGER, J. L., & BERTRAM, E. H. (1992) . The dentate gyrus as a control point for seizures in the hippocampus and beyond. In *The dentate gyrus and its role in seizures*, eds. Ribak, C. E., Gall, C. M., & Mody, I., pp. 273-280. Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam.
- LUINE, V. N., RENNER, K. J., FRANKFURT, M., & AZMITIA, E. (1984) . Facilitated sexual behavior reversed and serotonin restored by raphe nuclei transplanted into denervated hypothalamus. *Science* **226**, 1436-1439.
- LYSAKOWSKI, A., WAINER, B. H., BRUCE, G., & HERSH, L. B. (1989) . An atlas of the regional and laminar distribution of choline acetyltransferase immunoreactivity in rat cerebral cortex. *Neuroscience* **28**, 291-336.
- MACDERMOTT, A. B., MAYER, M. L., WESTBROOK, G. L., SMITH, S. J., & BARKER, J. L. (1986) . NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* **321**, 519-522.
- MADISON, D. V., LANCASTER, B., & NICOLL, R. A. (1987) . Voltage clamp analysis of cholinergic action in the hippocampus. *J.Neurosci.* **7**, 733-741.
- MANSOUR, A., FOX, C. A., AKIL, H., & WATSON, S. J. (1995) . Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: Anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.* **18**, 22-29.
- MATSUMOTO, H. & AJMONE-MARSAN, C. (1964a) . Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: Interictal manifestations. *Exp.Neurol.* **9**, 286-304.
- MATSUMOTO, H. & AJMONE-MARSAN, C. (1964b) . Cortical cellular phenomena in experimental epilepsy: Ictal manifestations. *Exp.Neurol.* **9**, 305-326.
- MAUREL REMY, S., BERVOETS, K., & MILLAN, M. J. (1995) . Blockade of phencyclidine-induced hyperlocomotion by clozapine and MDL 100,907 in rats reflects antagonism of 5-HT_{2A} receptors. *Eur.J.Pharmacol.* **280**, R9-11.
- MAYER, M. L. & WESTBROOK, G. L. (1987) . The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog.Neurobiol.* **28**, 197-276.
- MAYER, M. L., WESTBROOK, G. L., & GUTHRIE, P. B. (1984) . Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* **309**, 261-263.
- MCCORMICK, D. A. & BAL, T. (1997) . Sleep an arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu.Rev.Neurosci.* **20**, 185-215.
- MCNAUGHTON, B. L., BARNES, C. A., MELTZER, J., & SUTHERLAND, R. J. (1989) . Hippocampal granule cells are necessary for normal spatial learning but not for spatially-selective pyramidal cell discharge. *Exp.Brain Res.* **76**, 485-496.

- MELLGREN, S. I. & SREBRO, B. (1973) . Changes in acetylcholinesterase and distribution of degenerating fibres in the hippocampal region after septal lesions in the rat. *Brain Res.* **52**, 19-36.
- MILNER, T. A. & AMARAL, D. G. (1984) . Evidence for a ventral septal projection to the hippocampal formation of the rat. *Exp.Brain Res.* **55**, 579-585.
- MILNER, T. A., LOY, R., & AMARAL, D. G. (1983) . An anatomical study of the development of the septo-hippocampal projection in the rat. *Dev.Brain Res.* **8**, 343-371.
- MINTZ, I. M. & BEAN, B. P. (1993) . GABAB receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. *Neuron* **10**, 889-898.
- MISGELD, U., BIJAK, M., & JAROLIMEK, W. (1995) . A physiological role for GABAB receptors and the effects of baclofen in the mammalian central nervous system. *Prog.Neurobiol.* **46**, 423-462.
- MODY, I., LAMBERT, J. D. C., & HEINEMANN, U. (1987) . Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J.Neurophysiol.* **57**, No.3, 869-888.
- MÜLLER, W. & MISGELD, U. (1986) . Slow cholinergic excitation of guinea pig hippocampal neurons is mediated by two muscarinic receptor subtypes. *Neurosci.Lett.* **67**, 107-112.
- NABER, P. A., CABALLERO-BLEDA, M., JORRITSMA-BYHAM, B., & WITTER, M. P. (1997) . Parallel input to the hippocampal memory system through peri- and postrhinal cortices. *NeuroReport* **8**, 2617-2621.
- OLESKEVICH, S. & LACAÏLLE, J.-C. (1992) . Reduction of GABA-B inhibitory postsynaptic potentials by serotonin via pre- and postsynaptic mechanisms in CA3 pyramidal cells of rat hippocampus in vitro. *Synapse* **12**, 173-188.
- OLNEY, J. W. & FARBER, N. B. (1995) . Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch.Gen.Psychiatry* **52**, 998-1007.
- OLNEY, J. W., LABRUYERE, J., & PRICE, M. T. (1989) . Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. *Science* **244**, 1360-1362.
- OLNEY, J. W., LABRUYERE, J., WANG, G., WOZNIAK, D. F., PRICE, M. T., & SESMA, M. A. (1991) . NMDA antagonist neurotoxicity: Mechanism and prevention. *Science* **254**, 1515-1518.
- PAN, Z. Z. & WILLIAMS, J. T. (1994) . Muscarine hyperpolarizes a subpopulation of neurons by activating an M2 muscarinic receptor in rat nucleus raphe magnus in vitro. *J.Neurosci.* **14**, 1332-1338.

- PARE, D., DECURTIS, M., & LLINAS, R. R. (1992) . Role of the hippocampal-entorhinal loop in temporal lobe epilepsy: Extra- and intracellular study in the isolated guinea pig brain in vitro. *J.Neurosci.* **12**, 1867-1881.
- PARK, C. K., NEHLS, D. G., GRAHAM, D. I., TEASDALE, G. M., & MCCULLOCH, J. (1988) . Focal cerebral ischaemia in the cat: Treatment with the glutamate antagonist MK-801 after induction of ischaemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* **8**, 757-762.
- PATTON, P. E. & MCNAUGHTON, B. (1995) . Connection matrix of the hippocampal formation: I. The dentate gyrus. *Hippocampus* **5**, 245-286.
- PAZOS, A., CORTES, R., & PALACIOS, J. M. (1985) . Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2-receptors. *Brain Res.* **346**, 231-249.
- PAZOS, A. & PALACIOS, J. M. (1985) . Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res.* **346**, 205-230.
- PENTTONEN, M., KAMONDI, A., ACSÁDY, L., & BUZSÁKI, G. (1998) . Gamma frequency oscillation in the hippocampus of the rat: intracellular analysis in vivo. *Eur.J.Neurosci.* **10**, 718-728.
- RAMON Y CAJAL, S. (1893) . Über die feinere Struktur des Ammonshornes. *Z.Wiss.Zoologie* **56**, 613-663.
- RAUSCHE, G., SARVEY, J. M., & HEINEMANN, U. (1989) . Slow synaptic inhibition in relation to frequency habituation in dentate granule cells of rat hippocampal slices. *Exp.Brain Res.* **78**, 233-242.
- RICHTER-LEVIN, G., ACSÁDY, L., FREUND, T. F., & SEGAL, M. (1994) . Differential effects of serotonin and raphe grafts in the hippocampus and hypothalamus: a combined behavioural and anatomical study in the rat. *Eur.J.Neurosci.* **6**, 1720-1728.
- RICHTER-LEVIN, G., GREENBERGER, V., & SEGAL, M. (1993) . Regional specificity of raphe graft-induced recovery of behavioral functions impaired by combined serotonergic/cholinergic lesions. *Exp.Neurol.* **121**, 256-260.
- RICHTER-LEVIN, G. & SEGAL, M. (1990) . Grafting of midbrain neurons into the hippocampus restores serotonergic modulation of hippocampal activity in the rat. *Brain Res.* **521**, 1-6.
- ROBERTS, G. W. (1990) . Schizophrenia: the cellular biology of a functional psychosis. *Trends Neurosci.* **13**, 207-211.
- RUBERG, M., PLOSKA, A., JAVOY-AGID, F., & AGID, Y. (1982) . Muscarinic binding and choline acetyltransferase activity in Parkinsonian subjects with reference to dementia. *Brain Res.* **232**, 129-139.

- RUTECKI, P. A., GROSSMAN, R. G., ARMSTRONG, D., & IRISH-LOEWEN, S. (1989) . Electrophysiological connections between the hippocampus and entorhinal cortex in patients with complex partial seizures. *J.Neurosurg.* **70**, 667-675.
- RUTH, R. E., COLLIER, T. J., & RUTTENBERG, A. (1982) . Topography between the entorhinal cortex and the dentate septotemporal axis in rats: I. Medial and intermediate entorhinal projecting cells. *J.Comp.Neurol.* **209**, 69-78.
- RUTH, R. E., COLLIER, T. J., & RUTTENBERG, A. (1988) . Topographical relationship between the entorhinal cortex and the septotemporal axis of the dentate gyrus in rats: II. Cells projecting from lateral entorhinal subdivisions. *J.Comp.Neurol.* **270**, 506-516.
- SALLANON, M., BUDA, C., JANIN, M., & JOUVET, M. (1982) . 5-HT antagonists suppress sleep and delay its restoration after 5-HTP in p-chlorophenylalanine-pretreated cats. *Eur.J.Pharmacol.* **82**, 29-35.
- SARTER, M. & BRUNO, J. P. (1999) . Abnormal regulation of corticopetal cholinergic neurons and impaired information processing in neuropsychiatric disorders. *Trends Neurosci.* **22**, 67-74.
- SCHMITZ, D., EMPSON, R. M., GLOVELI, T., & HEINEMANN, U. (1995c) . Serotonin reduces synaptic excitation of principal cells in the superficial layers of rat hippocampal-entorhinal cortex combined slices. *Neurosci.Lett.* **190**, 37-40.
- SCHMITZ, D., EMPSON, R. M., GLOVELI, T., & HEINEMANN, U. (1997) . Serotonin blocks different pattern of low Mg²⁺-induced epileptiform activity in rat entorhinal cortex, but not hippocampus. *Neuroscience* **76**, 449-458.
- SCHMITZ, D., EMPSON, R. M., & HEINEMANN, U. (1995a) . Serotonin and 8-OH-DPAT reduce excitatory transmission in rat hippocampal area CA1 via reduction in presumed presynaptic Ca²⁺ entry. *Brain Res.* **701**, 249-254.
- SCHMITZ, D., EMPSON, R. M., & HEINEMANN, U. (1995b) . Serotonin reduces inhibition via 5-HT_{1A} receptors in area CA1 of rat ventral hippocampal slices in vitro. *J.Neurosci.* **15**, 7217-7225.
- SCHMITZ, D., GLOVELI, T., BEHR, J., DUGLADZE, T., & HEINEMANN, U. (1998c) . Subthreshold membrane potential oscillations in neurones of deep layers of the entorhinal cortex. *Neuroscience* **85**, 999-1004.
- SCHMITZ, D., GLOVELI, T., EMPSON, R. M., DRAGUHN, A., & HEINEMANN, U. (1998d) . Serotonin reduces synaptic excitation in the superficial medial entorhinal cortex of the rat via a presynaptic mechanism. *J.Physiol. Lond* **508**, 119-129.
- SCHMITZ, D., GLOVELI, T., EMPSON, R. M., & HEINEMANN, U. (1998a) . Comparison of the effects of serotonin in the hippocampus and the entorhinal cortex. *Mol.Neurobiol.* **17**, 59-72.

- SCHMITZ, D., GLOVELI, T., EMPSON, R. M., & HEINEMANN, U. (1998b) . Serotonin reduces polysynaptic inhibition via 5-HT_{1A} receptors in the superficial entorhinal cortex. *J.Neurophysiol.* **80**, 1116-1121.
- SCHMUED, L., KYRIAKIDIS, K., & HEIMER, L. (1990) . In vivo anterograde and retrograde axonal transport of the fluorescent rhodamine-dextran-amine, Fluoro-Ruby, within the CNS. *Brain Res.* **526**, 127-134.
- SCHWARTZ, S. P. & COLEMAN, P. D. (1981) . Neurons of origin of the perforant path. *Exp.Neurol.* **74**, 305-312.
- SEGAL, M. (1990) . Serotonin attenuates a slow inhibitory postsynaptic potential in rat hippocampal neurons. *Neuroscience* **36**, 631-641.
- SEGAL, M., AZMITIA, E. C., & WHITAKER-AZMITIA, P. M. (1989) . Physiological effects of selective 5-HT_{1a} and 5-HT_{1b} ligands in rat hippocampus: Comparison to 5-HT. *Brain Res.* **502**, 67-74.
- SHEN, Y., SPECHT, S. M., DE SAINT GHISLAIN, I., & LI, R. (1996) . The hippocampus: a biological model for studying learning and memory. *Prog.Neurobiol.* **44**, 485-496.
- SIAPAS, A. G. & WILSON, M. A. (1998) . Coordinated interactions between hippocampal ripples and cortical spindles during slow-wave sleep. *Neuron* **21**, 1123-1128.
- SINGER, W. & GRAY, C. M. (1995) . Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. *Annu.Rev.Neurosci.* **18**, 555-586.
- SIZER, A. R., KILPATRICK, G. J., & ROBERTS, M. H. T. (1992) . A post-synaptic depressant modulatory action of 5-hydroxytryptamine on excitatory amino acid responses in rat entorhinal cortex in vitro. *Neuropharmacology* **31**, 531-539.
- SKAGGS, W. E. & MCNAUGHTON, B. L. (1996) . Replay of neuronal firing sequences in rat hippocampus during sleep following spatial experience. *Science* **271**, 1870-1873.
- SOLTESZ, I. (1995) . Brief history of cortico-hippocampal time with a special reference to the direct entorhinal input to CA1. *Hippocampus* **5**, 120-124.
- SPENCER, D. D. & SPENCER, S. S. (1994) . Hippocampal resections and the use of human tissue in defining temporal lobe epilepsy syndromes. *Hippocampus* **4**, 243-249.
- SQUIRE, L. R. (1992) . Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol.Rev.* **99**, 195-221.
- SQUIRE, L. R. & ZOLA, S. M. (1996) . Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 13515-13522.

- STAUBLI, U. & LYNCH, G. (1987) . Stable hippocampal long-term potentiation elicited by 'theta' pattern stimulation. *Brain Res.* **435**, 227-234.
- STEINBUSCH, H. W. M. (1981) . Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience* **6**, 557-618.
- STEWART, O. & SCOVILLE, S. A. (1976) . Cells of origin of entorhinal cortical afferents to the hippocampus and fascia dentata of the rat. *J.Comp.Neurol.* **169**, 347-370.
- STEWART, D. J., MACFABE, D. F., & LEUG, L. W. (1985) . Topographical projection of cholinergic neurons in the basal forebrain to the cingulate cortex in the rat. *Brain Res.* **358**, 404-407.
- STEWART, M., QUIRK, G. J., BARRY, M., & FOX, S. E. (1992) . Firing relations of medial entorhinal neurons to the hippocampal theta rhythm in urethane anesthetized and walking rats. *Exp.Brain Res.* **90**, 21-28.
- STORM-MATHISEN, J. & OTTERSEN, O. P. (1984) . Neurotransmitter in the hippocampal formation. In *Cortical integration: basic, archicortical, cortical association*, eds. Reinoso-Suárez, F. & Ajmone-Marsan, C., pp. 105-130. Raven Press, New York.
- SUZUKI, W. A. (1996) . The anatomy, physiology and functions of the perirhinal cortex. *Curr.Opin.Neurobiol.* **6**, 179-186.
- SUZUKI, W. A. (1999) . The long and the short of it: memory signals in the medial temporal lobe. *Neuron* **24**, 295-298.
- SUZUKI, W. A., MILLER, E. K., & DESIMONE, R. (1997) . Object and place memory in the macaque entorhinal cortex. *J.Neurophysiol.* **78**, 1062-1081.
- SWANSON, L. W. & COWAN, W. M. (1977) . An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J.Comp.Neurol.* **172**, 49-84.
- SWANSON, L. W., WYSS, J. M., & COWAN, W. M. (1978) . An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J.Comp.Neurol.* **181**, 681-715.
- SZERB, J. C. (1967) . Cortical acetylcholine release and electroencephalographic arousal. *J.Physiol. Lond.* **192**, 329-343.
- TAMAMAKI, N. & NOJYO, Y. (1993) . Projection of the entorhinal layer II neurons in the rat as revealed by intracellular pressure-injection of neurobiotin. *Hippocampus* **3**, 471-480.

- TAMAMAKI, N. & NOJYO, Y. (1995) . Preservation of topography in the connections between the subiculum, field CA1, and the entorhinal cortex in rats. *J.Comp.Neurol.* **353**, 379-390.
- TEJANI-BUTT, S. M., YANG, J., & PAWLYK, A. C. (1995) . Altered serotonin transporter sites in Alzheimer's disease raphe and hippocampus. *NeuroReport* **6**, 1207-1210.
- TERMAN, G. W., WAGNER, J. J., & CHAVKIN, C. (1994) . Kappa opioids inhibit induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of the guinea pig hippocampus. *J.Neurosci.* **14**, 4740-4747.
- THOMPSON, S. M., CAPOGNA, M., & SCANZIANI, M. (1993) . Presynaptic inhibition in the hippocampus. *Trends Neurosci.* **16**, 222-227.
- WADA, Y., HASEGAWA, H., NAKAMURA, M., & YAMAGUCHI, N. (1992a) . Behavioral and electroencephalographic effects of a serotonin receptor agonist 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine in a feline model of photosensitive epilepsy. *Neurosci.Lett.* **138**, 115-118
- WADA, Y., NAKAMURA, M., HASEGAWA, H., & YAMAGUCHI, N. (1992b) . Role of serotonin receptor subtype in seizures kindled from the feline hippocampus. *Neurosci.Lett.* **141**, 21-24.
- WALTHER, H., LAMBERT, J. D. C., JONES, R. S. G., HEINEMANN, U., & HAMON, B. (1986) . Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium. *Neurosci.Lett.* **69**, 156-161.
- WEISSKOPF, M. G., ZALUTSKY, R. A., & NICOLL, R. A. (1993) . The opioid peptide dynorphin mediates heterosynaptic depression of hippocampal mossy fibre synapses and modulates long-term potentiation. *Nature* **362**, 423-427.
- WERZ, M. A. & MACDONALD, R. L. (1983) . Opioid peptides selective for μ and δ opiate receptors reduce calcium-dependent action potential duration by increasing a potassium conductance. *Neurosci.Lett.* **42**, 173-178.
- WILLIS, C. L., BRAZELL, C., & FOSTER, A. C. (1991) . Plasma and CSF levels of dizocilpine MK-801 required for neuroprotection in the quinolinate-injected rat striatum. *Eur.J.Pharmacol.* **196**, 285-290.
- WILLIS, W. D. (1981) . Role of serotonin in processing of nociceptive information. *Adv.Exp.Med.Biol.* **133** , 101-104.
- WILSON, M. A. & MCNAUGHTON, B. L. (1994) . Reactivation of hippocampal ensemble memories during sleep. *Science* **265**, 676-679.

- WILSON, R. C. & STEWARD, O. (1978) . Polysynaptic activation of the dentate gyrus of the hippocampal formation: An olfactory input via the lateral entorhinal cortex. *Exp.Brain Res.* **33**, 523-534.
- WITTER, M. P. (1993) . Organization of the entorhinal-hippocampal system: A review of current anatomical data. *Hippocampus* **3 Suppl.**, 33-44.
- WITTER, M. P., GRIFFIOEN, A. W., JORRITSMA-BYHAM, B., & KRIJNEN, J. L. M. (1988) . Entorhinal projections to the hippocampal CA1 region in the rat: an underestimated pathway. *Neurosci.Lett.* **85**, 193-198.
- WITTER, M. P. & GROENEWEGEN, H. J. (1990) . The subiculum: cytoarchitectonically a simple structure, but hodologically complex. *Prog.Brain Res.* **83**, 47-58.
- WITTER, M. P., GROENEWEGEN, H. J., DA SILVA, F. H. L., & LOHMAN, A. H. M. (1989a) . Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog.Neurobiol.* **33**, 161-253.
- WITTER, M. P., VAN HOESEN, G. W., & AMARAL, D. G. (1989b) . Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J.Neurosci.* **9**, 216-228.
- WITTER, M. P., OSTENDORF, R. H., & GROENEWEGEN, H. J. (1990) . Heterogeneity in the dorsal subiculum of the rat: distinct neuronal zones project to different cortical and subcortical targets. *Eur.J.Neurosci.* **2**, 718-725.
- WOOLF, N. J., ECKENSTEIN, F., & BUTCHER, L. L. (1984) . Cholinergic systems in the rat brain: I. projections to the limbic telencephalon. *Brain Res.Bull.* **13**, 751-784.
- WU, L.-G. & SAGGAU, P. (1997) . Presynaptic inhibition of elicited neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* **20**, 204-212.
- XIE, C. W. & LEWIS, D. V. (1995) . Depression of LTP in rat dentate gyrus by naloxone is reversed by GABAA blockade. *Brain Res.* **688**, 56-60.
- YAARI, Y., KONNERTH, A., & HEINEMANN, U. (1983) . Spontaneous epileptiform activity of CA1 hippocampal neurons in low extracellular calcium solutions. *Exp.Brain Res.* **51**, 153-156.
- YECKEL, M. F. & BERGER, T. W. (1990) . Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: Redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**, 5832-5836.
- YECKEL, M. F. & BERGER, T. W. (1998) . Spatial distribution of potentiated synapses in hippocampus: Dependence on cellular mechanisms and network properties. *J.Neurosci.* **18**, 438-450.
- YOUNG, B. J., OTTO, T., FOX, G. D., & EICHENBAUM, H. (1997) . Memory representation within the parahippocampal region. *J.Neurosci.* **17**, 5183-5195.

- ZANATTA, M. S., SCHAEFFER, E., SCHMITZ, P. K., MEDINA, J. H., QUEVEDO, J., QUILLFELDT, J. A., & IZQUIERDO, I. (1996) . Sequential involvement of NMDA receptor-dependent processes in hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in memory processing. *Behav.Pharmacol.* **7**, 341-345.
- ZHANG, C. L., DREIER, J. P., & HEINEMANN, U. (1995) . Paroxysmal epileptiform discharges in temporal lobe slices after prolonged exposure to low magnesium are resistant to clinically used anticonvulsants. *Epilepsy Res.* **20**, 105-111.
- ZHANG, C. L., GLOVELI, T., & HEINEMANN, U. (1994) . Effects of NMDA- and AMPA-receptor antagonists on different forms of epileptiform activity in rat temporal cortex slices. *Epilepsia* **35 Suppl.** 5, S68-S73.
- ZIMMER, J. (1971) . Ipsilateral afferents to the commissural zone of the fascia dentata demonstrated in decommissurated rats by silver impregnation. *J.Comp.Neurol.* **142**, 393-416.

7. Eigene Veröffentlichungen im Original

7.1. Gloveli et al., *Neuroscience* 77, 629-648, 1997 ..(Ref. 1)

GLOVELI, T., SCHMITZ, D., EMPSON, R. M., DUGLADZE, T., & HEINEMANN, U. (1997a). Morphological and electrophysiological characterization of layer III cells of the medial entorhinal cortex of the rat. *Neuroscience* 77, 629-648 (Ref. 1).

7.2. Gloveli et al., *J.Neurophysiol.* 78, 3444-3449, 1997 ..(Ref. 2)

GLOVELI, T., SCHMITZ, D., EMPSON, R. M., & HEINEMANN, U. (1997b). Frequency-dependent information flow from the entorhinal cortex to the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 78, 3444-3449 (Ref. 2).

7.3. Schmitz et al., *Neuroscience* 85, 999-1004, 1998 ..(Ref. 3)

SCHMITZ, D., GLOVELI, T., BEHR, J., DUGLADZE, T., & HEINEMANN, U. (1998a). Subthreshold membrane potential oscillations in neurones of deep layers of the entorhinal cortex. *Neuroscience* 85, 999-1004 (Ref. 3).

7.4. Gloveli et al., *J.Neurosci.*, eingereicht ..(Ref. 4)

. GLOVELI, T., DUGLADZE, T., SCHMITZ, D., & HEINEMANN, U. (2000). Properties of entorhinal cortex deep layer neurons projecting to the rat dentate gyrus. *J. Neurosci.*, submitted (Ref. 4).

7.5. Gloveli et al., *Neuroscience* 80, 119-131, 1997 ..(Ref. 5)

GLOVELI, T., SCHMITZ, D., & HEINEMANN, U. (1997c). Prolonged inhibitory potentials in layer III projection cells of the rat medial entorhinal cortex induced by synaptic stimulation in vitro. *Neuroscience* 80,119-131 (Ref. 5).

7.6. Gloveli et al., *Eur.J.Neurosci.* 11, 3626-3636, 1999.(Ref. 6)

GLOVELI, T., EGOROV, A. V., SCHMITZ, D., HEINEMANN, U., & MÜLLER, W. (1999). Carbachol-induced changes in excitability and $[Ca^{2+}]_i$ signalling in projection cells of medial entorhinal cortex layers II and III. *Eur.J.Neurosci.* **11**, 3626-3636 (Ref. 6).

7.7. Schmitz et al., *J.Physiol.(Lond.)* 508, 119-129, 1998.(Ref. 7)

SCHMITZ, D., GLOVELI, T., EMPSON, R. M., DRAGUHN, A., & HEINEMANN, U. (1998b). Serotonin reduces synaptic excitation in the superficial medial entorhinal cortex of the rat via a presynaptic mechanism. *J.Physiol.(Lond.)* **508**, 119-129 (Ref. 7).

7.8. Gloveli et al., *Neurosci. Lett.* 221, 93-96, 1997.(Ref. 8)

GLOVELI, T., ISERHOT, C., SCHMITZ, D., CASTRÉN, E., BEHR, J., & HEINEMANN, U. (1997d). Systemic administration of the phencyclidine compound MK-801 affects stimulus-induced field potentials selectively in layer III of rat medial entorhinal cortex. *Neurosci. Lett.* **221**, 93-96 (Ref. 8).

7.9. Gloveli et al., *Dev.Brain Res.* 87, 145-152, 1995 .(Ref. 9)

GLOVELI, T., ALBRECHT, D., & HEINEMANN, U. (1995). Properties of low Mg^{2+} induced epileptiform activity in rat hippocampal and entorhinal cortex slices during adolescence. *Dev.Brain Res.* **87**, 145-152 (Ref. 9).