

Aus dem Physiologischen Institut, Lehrstuhl für Physiologische Genomik, der Ludwig-Maximilians-Universität München

Fakultät für Medizin

Vorstand: Prof. Dr. Magdalena Götz



**Diversität und Funktion von Somatostatin-exprimierenden Interneuronen im
cingulären Cortex der Maus**

Habilitationsschrift

zur Erlangung der *Venia legendi*

für das Fach Physiologie

vorgelegt von Therese Riedemann, PhD

2019

Inhalt

I. Einleitung	4
A. Überblick über unterschiedliche Klassifizierungsschemata GABAerger Interneurone	4
B. Synaptische Konnektivität SOM-Interneurone.....	8
C. Aufbau und Funktion des cingulären Cortex	9
II. Zielstellung der Arbeit.....	13
III. Ergebnisse	15
A. Etablierung der Phasen-sensitiven Technik zur Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften von Somatostatin-exprimierenden Interneuronen	15
B. Validierung der transgenen Mauslinie als Model für SOM-Interneurone.....	22
C. Quantitative Klassifizierung von Somatostatin-exprimierenden Interneuronen im cingulären Cortex der Maus	28
D. Wirkung des Neuropeptides SOM+ auf die Erregbarkeit von Pyramidenzellen im cingulären Cortex der Maus	34
IV. Zusammenfassung und Ausblick.....	37
V. Referenzen.....	44
VI. Abbildungsverzeichnis.....	54
VII. Verzeichnis eigener Publikationen.....	55
VIII. Curriculum Vitae.....	57

Danksagung

Die vorliegende Habilitationsschrift wäre ohne die wertvolle Unterstützung und Förderung folgender Personen nicht möglich gewesen. Sie haben meinen wissenschaftlichen Werdegang maßgeblich geprägt.

Prof. Magdalena Götz möchte ich herzlich dafür danken, dass sie meine Habilitation unterstützt hat und gerne den Vorsitz des Fachmentorats übernommen hat. Sie hat mir größtmöglichen wissenschaftlichen Freiraum gewährt. Die Infrastruktur in ihrem Lehrstuhl hat maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Michael Kiebler bedanken, der bereitwillig dem Fachmentorat für meine Habilitation beigetreten ist und jederzeit Ansprechperson für mich war - sogar zwischen Weihnachten und Neujahr. Herzlichen Dank dafür.

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die Hilfe und Hingabe von Prof. Bernd Sutor nicht möglich gewesen: er hat mich seit meiner Post-Doc Phase stets gefördert und mich in meiner Forschungstätigkeit entscheidend geprägt. Er hat mich wissenschaftlich wachsen lassen und durch ihn habe ich gelernt, Lehre und Forschung unter einen Hut zu bringen und beides mit Leidenschaft, Verantwortungsbewusstsein und Hingabe zu bewältigen. Vielen, vielen Dank für alles.

Des Weiteren möchte ich Prof. Christa Neumeyer, Prof. Christoph von Campenhausen, Dr. Konstantin Behrend und Dr. Carlos Mora-Ferrer danken: Sie haben mich bei den ersten Gehversuchen des wissenschaftlichen Arbeitens begleitet und geleitet und Ihnen verdanke ich meine Begeisterung für die Neurobiologie.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Heiko Luhmann bedanken, der mich sehr herzlich in seinem Lehrstuhl aufgenommen und meine Wissbegier in der Neurobiologie stets gefördert hat. In seinem Lehrstuhl habe ich wertvolle Einblicke in neurophysiologische Ableitetechniken und Erfahrungen in Bezug auf wissenschaftliches Arbeiten gesammelt. Herzlichen Dank dafür.

Ein großes Dankeschön auch an Dr. Osborne Almeida, der mich immer gefördert und unterstützt hat. Er hat mir in einer schwierigen Zeit sehr viel Freiräume bei der Forschung gewährt und war rund um die Uhr ansprechbar. Von ihm habe Leidenschaft, Ausdauer, Menschlichkeit und wissenschaftlichen Weitblick gelernt.

Prof. Kei Cho möchte ich danken dafür, dass er mich herzlich in sein Labor aufgenommen und mit Präzision und Akribie Projekte geplant hat.

Ich möchte mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Lehrstuhls physiologische Genomik für die zuverlässige Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft, insbesondere unter den Lehrenden, bedanken. Ein besonderes Dankeschön geht an Gabi Horn, deren technische Assistenz und Hilfe unbezahlbar waren, sowie an Franz Rucker, auf den bei feinmotorischen Arbeiten oder Computerangelegenheiten immer 100% Verlass war.

Zu guter Letzt möchte ich mich herzlich bei meiner Familie bedanken. Ich danke meinen Eltern für Eure fortwährende, bedingungslose und liebevolle Unterstützung sowie meinen Schwestern und meinem Bruder dafür, dass ich immer auf Euch zählen konnte und kann. Außerdem ein großes Dankeschön an Marlene, Ella und Jonas: ihr holt mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurück und dafür hab ich Euch sehr lieb.

I. Einleitung

Interneurone sind Nervenzellen, die über lokale axonale Verzweigungen die Projektionszellen eines Gehirnareals innervieren und auf diese Weise die Netzwerkaktivität in diesem Bereich kontrollieren. Die Neuronenpopulation des Neocortex besteht zum größten Teil aus exzitatorischen Projektionsneuronen (i.e. Pyramidenzellen, 70-80%), während die Interneurone nur etwa 15-25% der Gesamtneuronenzahl ausmachen (Ascoli et al., 2008). Die meisten neocorticalen Interneurone sind inhibitorisch und verwenden überwiegend die γ -Aminobuttersäure (GABA) als Neurotransmitter. Im Unterschied zu Pyramidenzellen zeichnen sich GABAerge Interneurone durch eine riesige Vielfalt an zellulären Eigenschaften aus. Um ein Muster in dieser Vielfalt erkennen zu können, ist eine Klassifizierung von Interneuronen unabdingbar. Ziel von Klassifizierungsstudien ist dabei, die Neurone in ihrer Gesamtheit abzubilden und diejenigen Eigenschaften zu finden, die in der Lage sind, den einen Zelltyp gegen den anderen klar abzugrenzen (Ascoli et al., 2008; DeFelipe et al., 2013). Allerdings gibt es bisher leider keinen geeigneten experimentellen Ansatz, bei dem sich eine Zelle in ihrer Gesamtheit abbilden lässt. Daher basieren die meisten Klassifizierungsstudien auf einer begrenzten Anzahl von Parametern wie zum Beispiel der Morphologie, der Elektrophysiologie, der Neurochemie oder der Transkriptom-Analyse. Die unterschiedlichen Versuchsansätze haben zur Folge, dass parallel unterschiedliche Klassifizierungsschemata existieren, die nicht immer deckungsgleich sind (DeFelipe et al., 2013; Riedemann, 2019).

A. Überblick über unterschiedliche Klassifizierungsschemata GABAerger Interneurone

Morphologisch lassen sich GABAerge Interneurone in circa sieben Klassen einteilen, darunter 1) Korbzellen, 2) neurogliaforme Zellen, 3) sog. *Chandelier* Zellen, 4) Cajal-Retzius Zellen, 5) sog. *double-bouquet* Zellen, 6) sog. *long-range projecting* Interneurone und 7) Martinotti-Zellen. Korbzellen wiederum lassen sich in große und kleine Korbzellen unterteilen (Riedemann, 2019; Druga, 2008). Elektrophysiologische Klassifizierungsstudien hingegen zeigen sechs unterschiedliche elektrophysiologische Klassen: 1) sog. *fast spiking cells*, 2) nicht-adaptierende, nicht-schnell feuernde Zellen, 3) adaptierende Zellen, 4) beschleunigende Zellen, 5) irregulär entladende Zellen und 6) *burstartig* entladende Zellen. Teilweise lassen sich diese Klassen wiederum in Unterklassen unterteilen.

Basierend auf dem Einzelzell *RNA-sequencing* lassen sich GABAerge Interneurone in acht separate Zellgruppen einteilen, von denen sich sechs in weitere Unterklassen aufteilen lassen, so dass insgesamt 50 GABAerge Subtypen unterscheiden werden können (Tasic et al., 2016, 2018). Während sich elektrophysiologische, morphologische und/oder neurochemische Versuchsansätze gut kombinieren lassen, ist eine genaue elektrophysiologische Charakterisierung einer Zelle, gefolgt von deren Transkriptom-Analyse auf Grund der schnellen Degradation der RNA immer noch schwierig.

Die beliebteste Klassifizierungsart ist nach wie vor der Nachweis eines Markerproteins. Die Expression eines bestimmten Markerproteins in einer Zellpopulation bietet die Möglichkeit genau diese Zellpopulation genetisch zu manipulieren und somit dem Untersuchenden leichter zugänglich zu machen. Dementsprechend werden Interneurone oftmals entsprechend ihrer Expression von Calcium-bindenden Proteinen wie Calretinin, Calbindin oder Parvalbumin oder entsprechend des Vorhandenseins von Neuropeptiden wie Somatostatin oder vasoaktives intestinales Peptid eingeteilt (Ascoli et al., 2008; Riedemann, 2019). Die große Mehrheit der Interneurone zeichnet sich allerdings durch das Vorhandensein von mehreren dieser Markerproteine aus, so dass sich nicht alle Marker gleichermaßen zu einer klaren Abgrenzung unterschiedlicher Interneurongruppen eignen (Gonchar et al., 2008; Kubota et al., 2011; Riedemann et al., 2016, Tremblay et al., 2016; Feldmeyer et al., 2018). Anhand der Expression von Parvalbumin (PV), Somatostatin (SOM) und dem Serotonin-Rezeptor Subtyp 5-HT_{3A}R lassen sich drei separate, größtenteils nicht-überlappende Interneurone definieren (Abb. 1, Lee et al., 2010; Xu et al., 2010; Rudy et al., 2011). Die Gruppe der 5-HT_{3A}R-exprimierenden Interneurone (5-HT_{3A}R-Interneurone) kann wiederum in solche Interneurone unterteilt werden, die das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) exprimieren oder es nicht exprimieren. Weiterhin lassen sich alle drei Überklassen in mehrere Unterklassen aufteilen.

Wie aus Abb. 1 ersichtlich, bilden Parvalbumin-exprimierende Interneurone (PV-Interneurone) mit ca. 40-50% die größte Gruppe GABAerger Interneurone. Der Anteil an SOM- und 5-HT_{3A}R-Interneurone ist in etwa gleich.

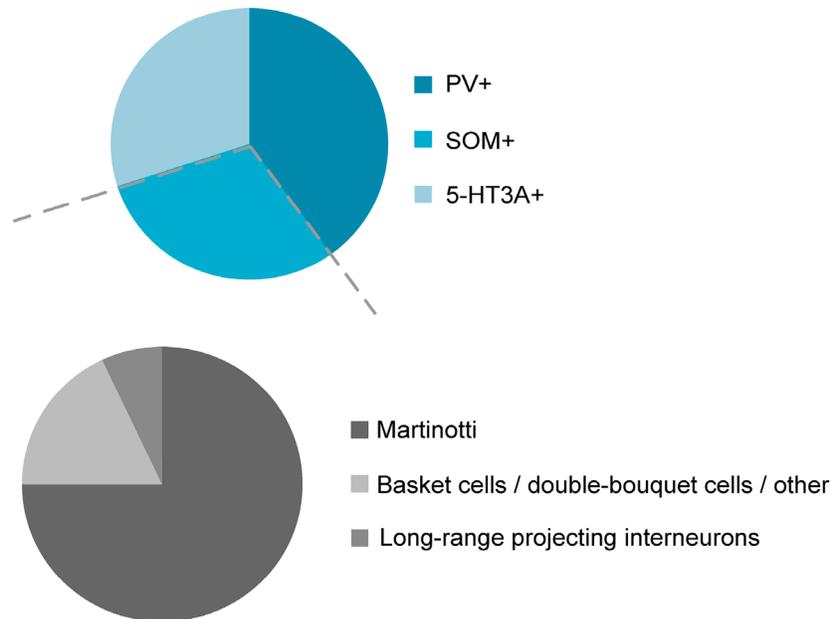


Abb. 1: GABAerge Interneurone lassen sich in drei nicht-überlappende neurochemische Klassen einteilen. 1) Parvalbumin-exprimierende (PV⁺), Somatostatin-exprimierende (SOM⁺), und 5-HT_{3A}-Rezeptor-exprimierende (5-HT_{3A}R⁺) Interneurone (oberes Panel). Die Klasse der SOM-Interneurone lässt sich wiederum in Martinotti und Nicht-Martinotti Zellen einteilen. Nicht-Martinotti-Zellen setzen sich wiederum hauptsächlich aus *long-range projecting* Zellen, Korbzellen und *double-bouquet* Zellen zusammen (unteres Panel; aus Riedemann, 2019).

Morphologisch lassen sich SOM-Interneurone grob in zwei Unterklassen aufteilen: 1) Martinotti-Zellen und 2) Nicht-Martinotti-Zellen (Tremblay et al., 2018; Riedemann, 2019). Letztere wiederum können größtenteils in Korbzellen, *double-bouquet* und *long-range GABAergic projecting* Zellen aufgeteilt werden (Druga, 2009; Riedemann, 2019). Etwa 15% aller GABAergen Interneurone sind Martinotti-Zellen. Allerdings sind Martinotti-Zellen innerhalb des Cortex nicht gleichmäßig verteilt. Hauptsächlich befinden sie sich in den Schichten II, III und V: dort sind zwischen 55-100% aller SOM-Interneurone Martinotti Zellen. Anders als in der Ratte enthält die corticale Schicht IV in der Maus quasi keine Martinotti-Zellen, was wahrscheinlich auf Spezies-abhängige Unterschiede zurückzuführen ist (Ma et al., 2006; Markram et al., 2015). Gemeinsames Kennzeichen aller Martinotti Zellen ist das Vorhandensein von dendritischen Dornfortsätzen und eine charakteristische Axonverzweigung in der Ursprungsschicht und in Richtung Schicht I (Marin-Padilla, 1990; Wang et al., 2004; Riedemann, 2019). Sehr unterschiedlich hingegen ist die somatodendritische Morphologie von Martinotti-Zellen (Riedemann, 2019).

Elektrophysiologische Klassifizierungsschemata basieren hauptsächlich auf dem Aktionspotenzial-Entladungsmuster einer Zelle, der Kinetik eines einzelnen Aktionspotenzials und auf deren passiven Membranparametern. Im Vergleich zu *fast-spiking* Interneuronen zeigen SOM-Interneurone ein depolarisiertes Membranpotenzial, einen höheren Eingangswiderstand, eine längere somatische Zeitkonstante und einen höheren Rektifizierungsindex auf (Kawaguchi & Kubota, 1996; Karagiannis et al., 2009; Perrenoud et al., 2012; Riedemann, 2019). Insgesamt lässt sich die Population der SOM-Interneurone gut von den *fast-spiking* Interneuronen abgrenzen. Um jedoch Untergruppen innerhalb der Population von SOM-Interneuronen zu finden, reichen die oben beschriebenen Parameter nur bedingt aus (Halabisky et al., 2006; Ma et al., 2006; McGarry et al., 2010; Riedemann et al., 2018).

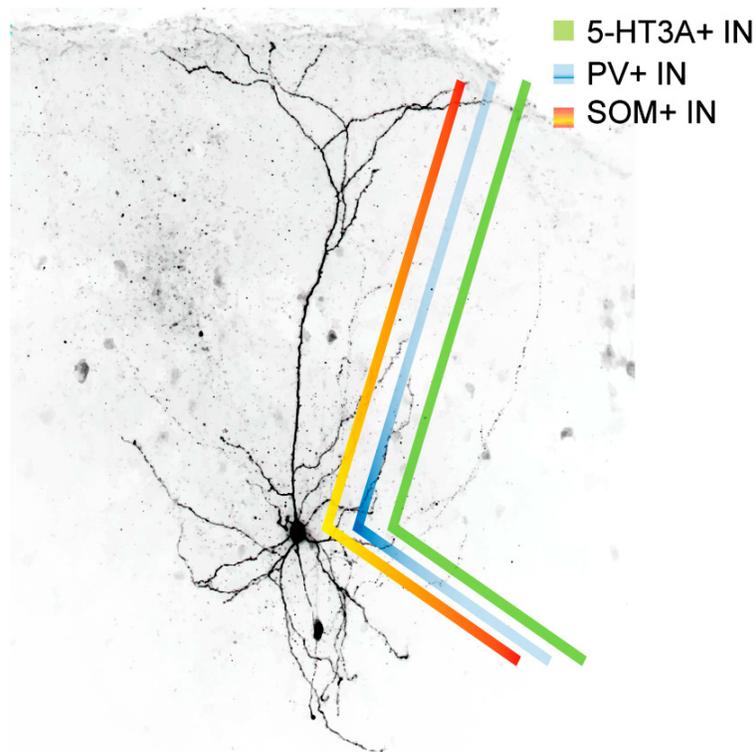


Abb. 2: Schematische Abbildung der postsynaptischen Innervationsdichte von PV- (blau, PV+ IN), SOM- (rot, SOM+ IN) und 5-HT_{3A}R-Interneuronen (grün, 5-HT_{3A}+ IN) an Pyramidenzellen (schwarz). PV-Interneurone innervieren hauptsächlich die proximalen Dendriten und das Soma einer Pyramidenzellen. Im Gegensatz dazu innervieren 5-HT_{3A}R-Interneurone, in Abhängigkeit von dem genauen Subtyp, entweder präferenziell die distalen und/oder proximalen Dendriten und/oder den Somabereich. SOM-Interneurone bilden vor allem mit den distalen Dendriten einer gegebenen Pyramidenzelle Synapsen (aus Riedemann, 2019).

B. Synaptische Konnektivität von SOM-Interneuronen

Wie eingangs erwähnt, modulieren GABAerge Interneurone unter anderem die Aktivität von Pyramidenzellen. Je nach Interneuron-Typ lassen sich hier unterschiedliche postsynaptische Ziele ausmachen. Während *fast-spiking* Interneurone mit höherer Wahrscheinlichkeit das Soma von Pyramidenzellen hemmen, gibt es je nach Subtyp 5-HT_{3A}R-Interneurone, die entweder bevorzugt das Soma (Cholecystokininterneurone, Kawaguchi & Kubota, 1998) oder den Dendriten (VIP-Interneurone, Zhou et al., 2017) von Pyramidenzellen hemmen. SOM-Interneurone wiederum innervieren hauptsächlich die distalen Dendriten von Pyramidenzellen (Abb. 2, Wang et al., 2004; Xu et al., 2013; Marlin & Carter, 2014; Tremblay et al., 2016; Nigro et al., 2018).

Der synaptische Eingang auf SOM-Interneurone ist sehr variabel (Abb. 3). Das am besten untersuchte Schaltkreis-Motiv ist das der lateralen Hemmung oder *Feedback*-Hemmung zwischen SOM-Interneuron und Pyramidenzelle: SOM-Interneurone erhalten erregenden Zustrom von einer benachbarten Pyramidenzelle und projizieren hemmend entweder auf dieselbe oder eine benachbarte Pyramidenzelle zurück (Kapfer et al., 2007; Silberberg & Markram, 2007; Obermayer et al., 2018). Dieses Schaltkreis-Motiv ist hauptsächlich in den corticalen Schichten II/III und V anzutreffen. Außerdem erhalten SOM-Interneurone der Schichten II/III und IV synaptischen Zustrom von corticocorticalen und thalamischen Afferenzen. Deshalb ist anzunehmen, dass sie auch an einer *Feedforward*-Hemmung beteiligt sind (Tan et al., 2008). Daneben projizieren vor allem VIP-Interneurone aus Schicht I hemmend auf SOM-Interneurone der Schichten II und III, was zu einer Disinhibition von Pyramidenzellen führt (Abb. 3). SOM-Interneurone der Schicht IV hingegen projizieren bevorzugt auf Parvalbumin-Interneurone, welche vorwiegend Pyramidenzellen derselben Cortexschicht hemmen, was ebenfalls die Disinhibition von Pyramidenzellen zur Folge hat. Außerdem erhalten SOM-Interneurone Afferenzen cholinerg (v.a. aus dem *Nucleus basalis Meynert*), serotonerger, noradrenerger und dopaminerger Fasern (Abb. 3).

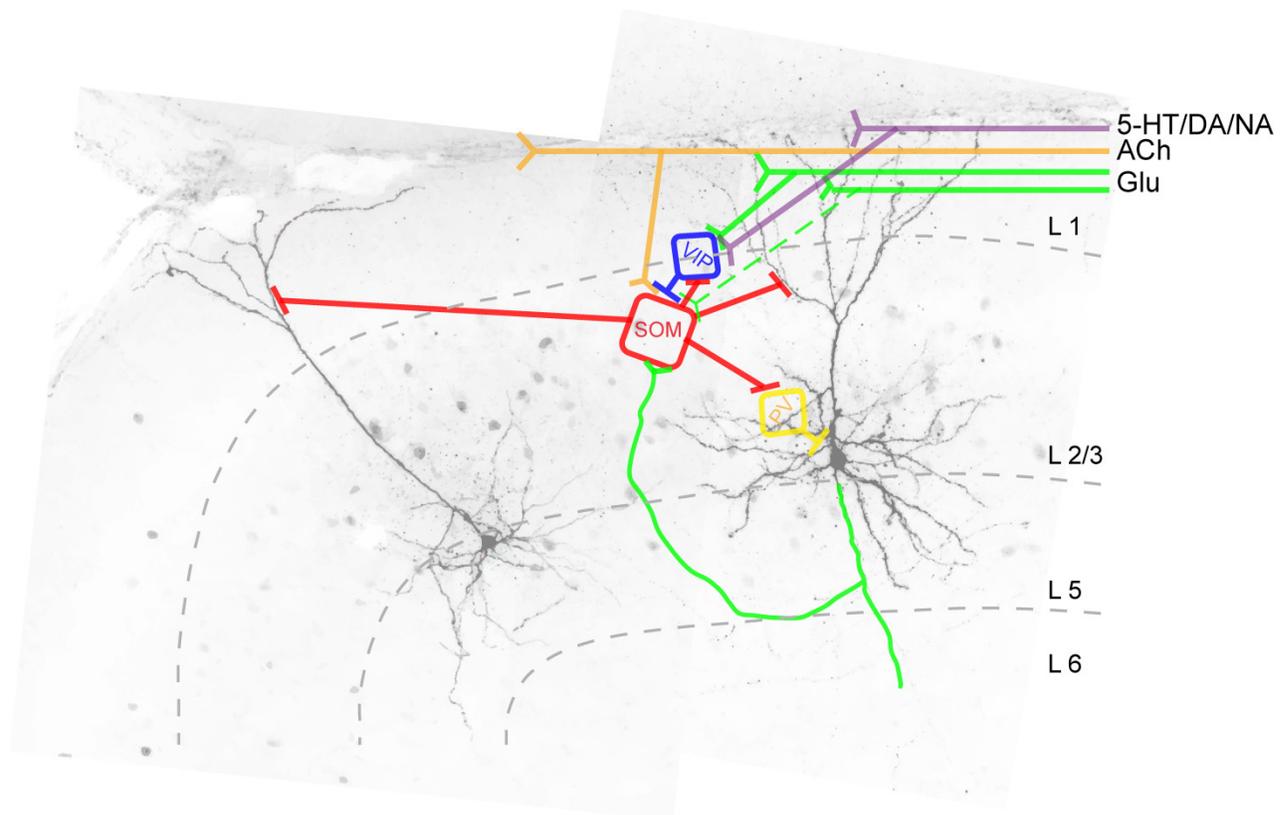


Abb. 3: Intracortical synaptische Verbindungen zwischen SOM-Interneuronen (rot) und Pyramidenzellen (schwarz) und zwischen SOM-Interneuronen und anderen GABAergen Interneuronen (blau, gelb) in Schicht II/III des agranulären anterioren cingulären Cortex. Abkürzungen: SOM: SOM-Interneuron; VIP: VIP-Interneuron; PV: PV-Interneuron; Glu: glutamaterge Projektionsfasern; ACh: cholinerge Projektionsfasern; 5-HT: serotoninerge Projektionsfasern; DA: dopaminerge Projektionsfasern; NA: noradrenerge Projektionsfasern, L: corticale Schicht ("layer", aus Riedemann, 2019).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Diversität und Funktion von SOM-Interneuronen mit Fokus auf den anterioren cingulären Cortex untersucht.

C. Aufbau und Funktion des cingulären Cortex

Der cinguläre Cortex liegt in der medialen Wand beider Gehirnhälften. Grob lässt sich der cinguläre Cortex in einen anterioren, einen posterioren und in einen retrosplenialen Teil gliedern (Vogt, 1993; Devinsky et al., 1995; Paus, 2001), wobei auch alternative Gliederungen in vier Teilgebiete existieren. Grundlage der letzteren Einteilung stellen die afferenten und efferenten Projektionen des cingulären Cortex dar (Vogt, 2005; Palomero-Gallagher et al., 2009).

Insgesamt umfasst der anteriore cinguläre Cortex (ACC) die Brodmann Areale 24, 25, 32 und 33, während der posteriore Teil die Brodmann Areale 23, 29, 30 und 31 einschließt. Sein Name leitet sich ab von der Tatsache, dass der cinguläre Cortex einen Kragen ("*cingulum*") um das *Corpus callosum* bildet.

Auf Grund seiner anatomischen Lage besitzt der cinguläre Cortex starke Verbindungen zum präfrontalen Cortex (wovon der anteriore cinguläre Cortex selbst ein Teil ist) und zum limbischen System (wovon er ebenfalls Teil ist). Im Detail konnte gezeigt werden, dass der ACC Verbindungen zum präfrontalen Cortex (Paus, 2001; Paus et al., 2001; Nacher et al., 2019), zum Motorcortex (Paus, 2001; Nimchinsky et al., 1996) und zum visuellen Cortex (Vogt & Miller, 1983; Zhang et al., 2016) besitzt, aber auch zu thalamischen Kerngebieten, welche an der Verarbeitung von schmerzhaften Stimuli und Bewegungen beteiligt sind (Vogt et al., 1979; Devinsky et al., 1995; Shyu & Vogt, 2009; Shyu et al., 2010). Außerdem weist der ACC starke Verbindungen zur Amygdala (Jhang et al., 2018; Sharma et al., 2019), zum Claustrum (Atlan et al., 2017; Wang et al., 2017; Qadir et al., 2018; White et al., 2018), zum Hypothalamus (Stevens et al., 2011; Fillinger et al., 2017, 2018), zum Hippocampus (Stevens et al., 2011; Rajasethupathy et al., 2015; Fillinger et al., 2017, 2018), zum orbitofrontalen Cortex (Stevens et al., 2011; Fillinger et al., 2017, 2018) und zum Striatum (Müller-Preuss & Jürgens, 1976; Yetarian & Van Hoesen, 1978; Baleyrier & Maugiere, 1980; Kunishio & Haber, 1994; Stevens et al., 2011) auf.

Bereits in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde postuliert, dass der cinguläre Cortex als ein rezeptives Organ angesehen werden kann, in dem Emotionen als Ergebnis von Impulsen aus der hypothalamischen Region wahrgenommen werden können, ähnlich der *Area striata* als rezeptives Organ von Lichteinwirkungen auf die Retina (Papez, 1937; Allman et al., 2001). Diese These beruhte unter anderem auf der Tatsache, dass Verletzungen des cingulären Cortex (beispielsweise durch Turmore) in Patienten einen Verlust an Spontaneität von Emotionen, Gedanken und Aktivität hervorriefen (Papez, 1937). Anders als in primär sensorischen Hirnarealen ist der cinguläre Cortex jedoch nicht an der Wahrnehmung eines spezifischen Stimulus *per se* beteiligt, sondern an dessen Bewertung innerhalb eines gegebenen Kontextes. Aus Studien mit funktionellen bildgebenden Verfahren ist bekannt, dass sowohl traurige als auch fröhliche Emotionen (Vogt, 2005; Phan et al., 2002), aber auch Schmerzen (Vogt, 2005; Shackman et al., 2011) und Angst zu erhöhter Aktivität im ACC führen. Ebenso findet sich erhöhte Aktivität im ACC wenn Probanden Aufgaben lösen sollten, welche kognitive Kontrolle, *Conflict-Monitoring*, Fehler-Erkennung oder die Evaluierung von Emotionen beinhalteten (Bush

et al., 2002; Carter & Veen, 2007; Stevens et al., 2011). Alles in allem lassen die Studien darauf schließen, dass dem (vor allem anterioren) cingulären Cortex eine wichtige Rolle bei der Regulation von Emotionen und willentlichen Kontrolle von Verhaltensäußerungen zukommt (Allman et al., 2005; Stevens et al., 2011; Lavin et al., 2013). Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass der cinguläre Cortex als Schnittstelle zwischen Emotionen und Wahrnehmung angesehen werden kann (Allman et al., 2001; Lavin et al., 2013). Auf Grund der oben beschriebenen Rolle des cingulären Cortex ist es wenig verwunderlich, dass Funktionsstörungen innerhalb des cingulären Cortex sich als neuropsychiatrische Erkrankungen manifestieren können. Läsionen des cingulären Cortex können sich durch eine veränderte Bandbreite an Emotionen oder Verhaltensäußerungen erkennbar machen. Insgesamt scheint ein Zusammenhang zwischen Pathophysiologie des cingulären Cortex und *Autism Spectrum Disorders*, Schizophrenie und Befindlichkeitsstörungen zu bestehen (Hamami et al., 2011; Tripp et al., 2011; Robinson et al., 2014; Bicks et al., 2015; Seney et al., 2015).

Auch in Nagetieren findet sich ein Zusammenhang zwischen sozialen Defiziten und Funktionsstörungen innerhalb des ACC (Bicks et al., 2015). Ein Verhaltensexperiment, welches die soziale Motivation eines Nagetieres testet, ist beispielsweise der *novel social target recognition* Test (Moy et al., 2004), bei dem verglichen wird, wie lange eine Maus sich mit einer ihr bekannten im Vergleich zu einer ihr unbekanntem (*novel*) Maus beschäftigt. Andere Tests bewerten Empathie oder soziales Verhalten wie Dominanz oder Hierarchie (Bicks et al., 2015). So konnte gezeigt werden, dass Schädigungen des ACC das soziale Gedächtnis und das soziale Interesse negativ beeinträchtigen (Rudebeck et al., 2007).

Bisher ist aber wenig darüber bekannt, auf welchen zellulären und molekularen Mechanismen diese neuropsychiatrischen Erkrankungen beruhen. Aus diesem Grund ist die Untersuchung der zellulären und physiologischen Eigenschaften des ACC unerlässlich. Es gibt Hinweise darauf, dass insbesondere GABAergen Interneuronen des cingulären Cortex eine wichtige Rolle bei neuropsychiatrischen Erkrankungen zukommt. Dementsprechend ist sowohl in schizophrenen und schizoaffektiven Patienten wie auch in Patienten, die unter Befindlichkeitsstörungen leiden, die Anzahl von GABAergen Interneuronen und/oder die Genexpression des GABA-synthetisierenden Enzyms (GAD, glutamic acid decarboxylase) speziell im ACC reduziert (Benes et al., 1991; Benes, 1993; Akbarian et al., 1995; Todtenkopf & Benes, 1998; Benes & Berretta, 2001; Benes & Lange, 2001; Hashimoto et al., 2008; Hoftman et al., 2015), während die Anzahl von Pyramidenzellen nicht verändert zu sein scheint. Interessanterweise wurde insbesondere eine veränderte Somatostatin- und Parvalbumin-Expression in schizophrenen

Patienten beobachtet (Hashimoto et al., 2008; Hoftman et al., 2015). Ähnlich wie in schizophrenen oder schizoaffektiven Patienten konnte auch in manisch depressiven Patienten oder in solchen, die an einer *Major Depression* leiden, eine verminderte Expressionsrate von Somatostatin speziell im cingulären Cortex gefunden werden (Benes et al., 2001; Seney et al., 2015; Tripp et al., 2011). Kognitions- oder Emotions-abhängige neuropsychiatrische Erkrankungen lassen sich nur bedingt in Tiermodellen untersuchen. Ein solches Tiermodell für Depressionen beruht auf der sog. *learned helplessness* induziert durch chronischen unvorhersehbaren Stress (*chronic unpredictable stress*). In Übereinstimmung mit den Befunden im Menschen, finden sich auch in Mäusen, welche chronischem unvorhersehbarem Stress ausgesetzt waren, verminderte Mengen an Somatostatin im cingulären Cortex (Banar et al., 2017).

Bisher ist nicht bekannt, warum Schizophrenie oder *Major Depression* sich speziell auch als Krankheit von SOM-Interneuronen manifestiert. In Übereinstimmung mit den oben genannten Befunden konnte aber gezeigt werden, dass eine Enthemmung von SOM-Interneuronen in Mäusen zu einem anti-depressiven Phänotyp führt (Fuchs et al., 2017a, b). Ähnliches konnte nach intracerebraler Injektion von SOM in Mäusen gezeigt werden (Engin et al., 2008). Die Tatsache, dass insbesondere SOM-Interneuronen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung eines physiologischen neuronalen Schaltkreises innerhalb des cingulären Cortex zukommt, ist Ansatzpunkt der vorliegenden Arbeit. Ein Verständnis für die Funktion und Fehlfunktion von SOM-Interneuronen kann nur gewonnen werden, wenn diese eingehend untersucht werden. Die große Mehrheit der bisherigen Klassifizierungsstudien konzentrierte sich auf primär sensorische Gehirnareale wie den somatosensorischen oder visuellen Cortex (Wang et al., 2004; Ma et al., 2006; Xu et al., 2006, 2010; Markram et al., 2015; Jiang et al., 2015). Da aber der zelluläre Aufbau und die Projektionen zum bzw. aus dem cingulären Cortex unterschiedlich sind, ist die Charakterisierung SOM-Interneurone speziell im cingulären Cortex notwendig.

II. Ziel der Arbeit

Ziel meines Habilitationsprojektes war es, die Diversität und Funktion von SOM-Interneuronen im cingulären Cortex der Maus zu untersuchen, um ausgehend von diesen Ergebnissen zukünftig physiologische Schaltkreismotive und Ansatzpunkte für krankheitsbedingte Änderungen von SOM-Interneuronen identifizieren und manipulieren zu können.

Wie unter I.A beschrieben existieren mehrere parallele Klassifizierungsschemata, die teilweise nur schwer in Einklang gebracht werden können. Das liegt unter anderem an unterschiedlich angewandten oder unklar beschriebenen Methoden. Aus diesem Grund sollten im ersten Teil meiner Arbeit elektrophysiologische Techniken implementiert werden, die eine Artefakt-freie Strominjektion in Nervenzellen während Spannungsregistrierungen (d.h. Messungen im sog. *Current-Clamp* Modus) erlauben. Hierzu wurde eine bereits bekannte, aber vergessene Technik (Phasen-sensitive Technik) mit der sog. Brückenmesstechnik kombiniert. Nach ihrer Etablierung wurde diese Technik in Neuronen und Astrozyten auf ihre Anwendbarkeit hin überprüft. In allen nachfolgenden Messungen wurde der Serienwiderstand und die Kapazität mittels dieser Methode bestimmt und kompensiert.

Im zweiten Teil meines Habilitationsprojektes wurde die transgene Mauslinie, welche für die Klassifizierung von SOM-Interneuronen verwendet werden sollte, genau untersucht, um mögliche Fehlerquellen durch falsch identifizierte SOM-Interneurone zu minimieren. Für die Untersuchung von SOM-Interneuronen verwendeten wir die sog. *GIN*-Mauslinie (GIN: GFP-expressing inhibitory interneurons, Oliva et al., 2000). Schwerpunkt der Arbeit war die genaue Untersuchung des GFP-Expressionsprofils im Gehirn der Maus und die Überprüfung, ob die Expression von GFP immer mit der von SOM übereinstimmte.

Nach Etablierung einer genauen Ableitetechnik und der Überprüfung der transgenen Mauslinie war die Untersuchung der Diversität und teilweise der Funktion von SOM-Interneuronen Schwerpunkt des dritten Teils meiner Arbeit. Hierfür sollte insbesondere der Frage nachgegangen werden, welche Eigenschaften SOM-Interneurone des cingulären Cortex besitzen und ob sich diese in mehrere Untergruppen einteilen lassen. Bisher ist es nicht gelungen, eine Korrelation zwischen elektrophysiologischen und morphologischen mit neurochemischen Eigenschaften von SOM-Interneuronen zu identifizieren. Daher sollte überprüft werden, ob so eine Korrelation existiert oder nicht.

Im letzten Teil der Arbeit sollte die Funktion und Wirkung des Neuropeptids Somatostatin auf Pyramidenzellen des cingulären Cortex untersucht werden. Dabei lag der Schwerpunkt der Arbeit vor allem auf der Frage nach der Desensibilisierung des Somatostatin-Rezeptors und der Wirkung von Somatostatin auf die Erregbarkeit von Pyramidenzellen.

III. Ergebnisse

A. **Etablierung der Phasen-sensitiven Technik zur Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften von Somatostatin-exprimierenden Interneuronen**

Ziel dieses Projektes war die genaue Bestimmung und Kompensation des Serienwiderstands mittels der Phasen-sensitiven Technik zur späteren Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften von SOM-Interneuronen. Um Ergebnisse unterschiedlicher Laboratorien miteinander vergleichen zu können, ist es wichtig, dass die Methoden klar beschrieben werden und die mit ihr verbundenen Messfehler möglichst klein gehalten werden. Vielfach werden die passiven Membranparameter wie z.B. die Membranzeitkonstanten, der Membranwiderstand oder die Membrankapazität, die Kinetik eines einzelnen Aktionspotenzials und/oder das Entladungsverhalten für diese Charakterisierung verwendet, da sie als gute *classifier* im Sinne einer multivariaten Analyse gelten. Teilweise ist es möglich, diese Daten von öffentlichen Datenbanken abzurufen und zu analysieren. So finden sich beispielsweise auf der Datenbank der *University of British Columbia* (neuroelectro.org) oder auf der des *Allen Institute for Brain Science* (cell-types.brain-map.org), welche unter anderem die passiven Membraneigenschaften unterschiedlicher Zelltypen sammeln bzw. ermitteln, somatische Membranzeitkonstanten zwischen 0.28 und 177 ms. Filtert man die Ergebnisse nach Zelltyp, ergeben sich für neocorticale SOM-Interneurone somatische Membranzeitkonstanten zwischen 4 und 75 ms (*Allen Institute for Brain Science*). Ebenso zeigt die mittlere Entladungsfrequenz von SOM-Interneuronen Werte zwischen 4 und 208 Hz an. Wie eingangs beschrieben, zeichnen sich SOM-Interneurone durch eine sehr hohe Variabilität aus, daher ist es wahrscheinlich, dass ein Großteil der unterschiedlichen Werte genau auf jene Diversität zurückzuführen ist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass zumindest ein Teil dieser Variabilität möglicherweise auf einer fehlenden oder fehlerhaften Kompensation des Serienwiderstandes beruht. Die Bestimmung der Membranzeitkonstanten bei unkompensierter Elektrodenkapazität und einer nicht abgeglichenen Brücke führt unweigerlich zu falschen Werten. Aber auch die Bestimmung der Aktionspotenzialschwelle, der Aktionspotenzial-Kinetik und -Amplitude ist in diesem Fall ungenau (Magistretti et al., 1996; 1998).

Idealerweise erreicht der gesamte Strom, der über die Pipette fließt, die Zelle. Tatsächlich fließt aber ein Teil des Stroms über die Elektrodenkapazität und den Serienwiderstand bestehend aus

zellulären Bestandteilen zwischen Elektrodenspitze und Zelle ab. Dies hat zur Folge, dass unter *Current-Clamp* Bedingungen die tatsächliche Stromamplitude, die in die Zelle injiziert wird, unter der angegebenen liegt. In Abhängigkeit von der Größe des Serienwiderstandes kann dadurch die Bestimmung der Rheobase, der Latenz bis zum Auftreten des ersten Spikes oder die Abhängigkeit der Entladungsfrequenz von der Amplitude des injizierten Stroms (sog. *F-I* Plot) ungenau werden. Die genannten Beispiele sind jedoch alle wichtige Parameter zur Einteilung GABAerger Interneurone. Um eine laborübergreifende Klassifizierung GABAerger Interneurone zu erleichtern, ist daher eine genaue Arbeitsweise nötig.

Aus diesem Grund haben wir eine Methode entwickelt und etabliert, mittels der sich die Elektrodenkapazität und der Serienwiderstand (R_S) sehr leicht bestimmen und kompensieren lassen. Grundlage der hier vorgestellten Messungen bilden Zellmodelle mit bekannten Kapazitäten und Widerständen. Zur Validierung der Methodik wurden Messungen an Neuronen und Astrozyten durchgeführt.

Im *Current-Clamp* Modus einer Ganzzell-Ableitung setzt sich ein Spannungssignal (V_{ges}) nach Beginn einer Strominjektion im Falle einer nicht-kompensierten Elektrodenkapazität (C_{EI}) und nicht eingestellten Brücke aus folgenden Bestandteilen zusammen:

$$V_{ges} = V_{EI} + V_M$$

wobei

$$V_{EI} = R_S * C_{EI} * dU_C/dt$$

und

$$V_M = R_N * C_M * dU_C/dt$$

V_{EI} = Elektrodenspannung; V_M = Membranspannung; R_{EI} = Elektrodenwiderstand; C_{EI} = Elektrodenkapazität; R_N = Eingangswiderstand Zelle; C_M = Membrankapazität

Membranzeitkonstanten und Zellkapazitäten werden aber typischerweise aus dem Spannungsverlauf direkt nach Beginn der Strominjektion bestimmt. Vor der eigentlichen Registrierung der Messungen muss daher sichergestellt werden, dass der Spannungsanteil der Elektrode kompensiert wird und nur die Spannungsänderungen der Zelle dargestellt werden.

Die hier vorgestellte Bestimmung und Kompensierung des Serienwiderstands (R_S) beruht auf der von Park et al. (1983) eingeführten Technik, die Impedanz abgeleiteter Zellen kurzzuschließen, ohne die Impedanz der Elektrode maßgeblich zu mindern. Diese Technik wurde zusammen mit einem neu entworfenen *Patch-Clamp* Verstärker angewendet, welcher mittels aktiver Brückenschaltung R_S genau bestimmen und im *Voltage-Clamp* Modus R_S um einen definierten Betrag kompensieren kann. Hierfür wurden Sinuspulse unterschiedlicher Frequenzen generiert und die resultierende Impedanzantwort des 1) Vorverstärkers, der 2) Elektroden und von 3) Neuronen und Astrozyten gemessen.

Dabei wurde die Impedanz Z wie folgt berechnet und gegen die Frequenz des Testpulses aufgetragen (sog. Bode-Plot, Abb. 4):

$$Z = R/(1 + \omega^2 R^2 C^2)$$

Anhand des Bode-Plots konnte dann die sog. *cutoff*-Frequenz bestimmt werden, i.e. die Frequenz, bei der die Impedanz nur noch $1/\sqrt{2}$ beträgt (gestrichelte Linie in Abb. 4 C). Ich konnte zeigen, dass die *cutoff*-Frequenz der von uns verwendeten, dickglasigen Elektroden bei ca. 5 kHz lag, während die von Neuronen zwischen 10 und 100 Hz lag. Auf Grund der deutlich unterschiedlichen *cutoff*-Frequenzen zwischen Elektrode und Nervenzellen war es uns möglich, Spannungsänderungen über der Elektrode darzustellen, während die Zellmembran effektiv kurzgeschlossen war. Für die Kompensation der Elektrodenkapazität wählte ich einen Sinuspuls von 3 kHz: Wie aus Abb. 4 ersichtlich, ist bei dieser Frequenz die Impedanz der Neurone fast zu 98% kurzgeschlossen, während die der Elektrode zu ungefähr 93% abgebildet werden kann.

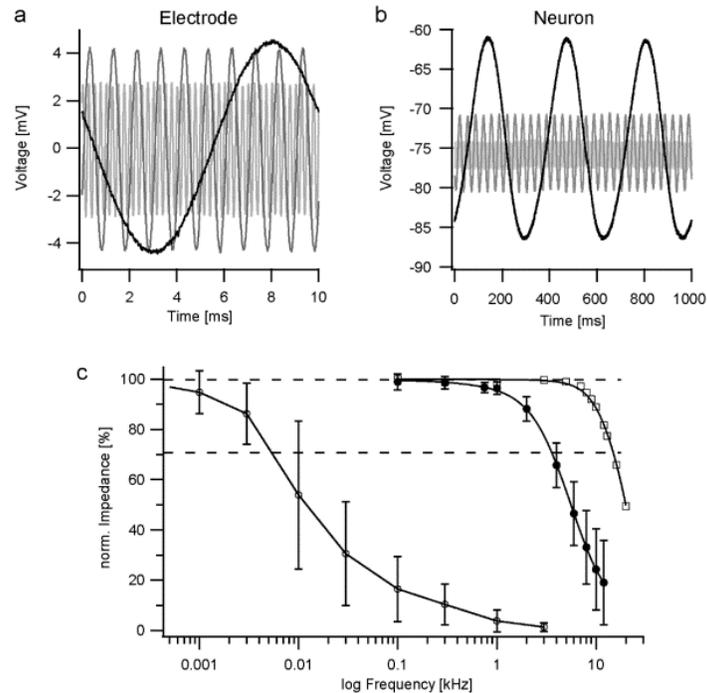


Abb. 4: Bestimmung der *cutoff*-Frequenzen. Sinuspulse mit Frequenzen zwischen 0.1 und 12 kHz wurden appliziert und die Kapazität kompensiert ohne die Brücke abzugleichen. a) Spannungsänderungen der Elektrode in Antwort auf Sinuspulse von 100 Hz (schwarz), 1 kHz (grau) und 4 kHz (grau). b) Spannungsantwort eines Neurons auf sinusförmige Strompulse zwischen 3 Hz (schwarz), 30 Hz (grau) und 300 Hz (grau). Die Amplituden der Strom-induzierten Spannungsänderungen wurden gemessen und als normalisierte Impedanz gegen die Frequenz aufgetragen (sog. Bode-Plot). Ausgehend von diesem Diagramm lässt sich die *cutoff*-Frequenz bestimmen als die Frequenz, bei der die Amplitude der Strom-induzierten Spannungsänderung um $1/\sqrt{2}$ zurückgegangen ist (gestrichelte Linie). Neurone: offene Kreise, Elektroden: schwarze Kreise, Vorverstärker: offene Rechtecke (*Supplementary material* aus Riedemann et al., 2016).

Die Elektrodenkapazität wurde nun so lange kompensiert, bis Strom- und Spannungssignal in Phase waren und keine weitere Attenuation des Spannungssignals nach Sinuspulsinjektion beobachtet wurde (Anhang A.1, Abb. 2 (Fig. 2)). Zur besseren Visualisierung wurde die vollständige Kompensation der Elektrodenkapazität auch als Lissajous-Plot (Spannung als Funktion des Sinuspulses) dargestellt. Bei vollständiger Kompensation der Elektrodenkapazität stellt sich der Lissajous-Plot idealerweise als Gerade dar, deren Steigung den Betrag des Serienwiderstands entspricht (Anhang A.1, Abb. 2 g-i (Fig. 2 g-i)).

Nach Kompensation der Elektrodenkapazität konnte der Serienwiderstand mittels aktiver Brückenschaltung sehr einfach bestimmt und kompensiert werden.

Um die Zuverlässigkeit der hier vorgestellten Technik zu bestimmen, testete ich diese an unterschiedlichen Zellmodellen mit bekannter Kapazität und bekanntem Widerstand. Der mittlere Fehler der Serienwiderstandsbestimmung lag dabei bei 1.15%. Die Tatsache, dass die Elektrodenkapazität und die Brücke im *Current-Clamp* Modus nahezu vollständig kompensiert und abgeglichen werden konnte, konnte auch durch gleichzeitige Ableitungen von Zellen mit zwei unterschiedlichen Verstärkern bestätigt werden. Dabei war die eine Elektrode mit einem Brückenverstärker und die andere Elektrode mit einem *switched current-and voltage* Verstärker (SEC) verbunden. Das Funktionsprinzip eines SEC Verstärkers beruht auf der Tatsache, dass nicht kontinuierlich die Spannung gemessen und Strom injiziert wird, sondern dass sich Spannungsmessung und Strominjektion mit hoher Frequenz abwechseln (Sutor et al., 2003) und die Operationsweise dieses Verstärkers deswegen nicht mit einem Serienwiderstandsfehler behaftet ist. Wir konnten zeigen, dass die von dem *Patch-Clamp* Verstärker registrierten Spannungsänderungen in der Zelle nach Kompensation der Elektrodenkapazität und nach Brückenabgleich sich nicht von denen mit dem SEC Verstärker unterscheiden. Hingegen beeinflusste eine unkompenzierte Elektrodenkapazität und eine nicht abgeglichene Brücke direkt den Verlauf eines Aktionspotenzials (Anhang A.1, Abb. 4 (Fig. 4)).

Für *Voltage-Clamp* Ableitungen ergeben sich ähnliche Probleme einer nicht kompensierten Kapazität bzw. eines nicht kompensierten Serienwiderstands.

Wie oben beschrieben fließt ein Teil des Stroms über die Streukapazitäten des Serienwiderstandes und der Elektrodenkapazität ab.

Dies bedeutet:

- der durch die Pipette injizierte Strom ist ungleich dem über Zellkapazität und Zellmembran fließenden Stroms ($I_{\text{ges}} = I_{\text{EI}} + I_{\text{M}}$). Somit ist das tatsächliche Haltepotenzial (V_{RN}) ungleich dem gewünschten (V_{C}). Je nach dem Verhältnis von Serienwiderstand zu Membranwiderstand und dem gewünschten Haltepotenzial kann diese Abweichung über 20 mV betragen (Anhang A.1, Abb. 7 d (Fig. 7 d)).
- ein hoher Serienwiderstand begrenzt das zeitliche Auflösungsvermögen mit dem der Zelle Spannungsänderungen aufgezwungen werden können und mit dem entsprechend Membranströme registriert werden können (Sigworth, 1995).

Da Serienwiderstand (R_S) und Membranwiderstand (R_N) zwei in Serie geschalteten Widerständen entsprechen, ist die Gesamtspannung V_C (entsprechend dem *command step*, der der Zelle aufgezwungen wird) ungleich der Spannung, die an der Zellmembran (V_{RN}) anliegt.

Im Gleichgewichtszustand nach einem gewünschten Spannungssprung gilt:

$$V_{RN} = R_N / (R_S + R_N) * V_C$$

$$\text{Somit: } V_C = V_{RN} + R_S I_T$$

wobei I_T = gesamter Strom

Je kleiner R_S umso besser der Angleich des *Command steps* (V_C) an das tatsächliche Membranpotenzial (V_{RN}) einer Zelle. Dies lässt sich mit Hilfe des Faktors α in der Gleichung berücksichtigen:

$$V_C = V_{RN} + (1-\alpha) R_S I_T.$$

Dabei entspricht der Faktor α dem kompensierten Anteil des Serienwiderstandes, welcher im *Current-Clamp* Modus bestimmt wurde.

Eine Annäherung von V_C an V_{RN} durch α hat unmittelbare Folgen auf die registrierten Stromamplituden nach Spannungssprüngen und somit auch auf die Berechnung von Leitfähigkeiten aus Strom-Spannungsbeziehungen. Aus Anhang A.1 (Abb. 7 b, c (Fig. 7 b,c)) geht klar hervor, dass der gemessene Strom nach Serienwiderstandskompensation deutlich höher ist (Verdopplung der Stromamplitude nach R_S Kompensation).

Außerdem konnten wir zeigen, dass sowohl die Amplitude von spontanen synaptischen Strömen also auch deren Amplitude nach R_S Kompensation signifikant erhöht ist.

Die hier vorgestellte Technik ermöglicht genaue Messungen von Spannungsänderungen und Strömen in einer Zelle. Prinzipiell ist zwar auch eine Serienwiderstandsbestimmung und Serienwiderstandskompensation im *Voltage-Clamp* Modus möglich, jedoch müssen dafür bestimmte Bedingungen erfüllt sein:

- es muss sich um elektrotonisch kompakte Zellen handeln (Armstrong & Gilly, 1992; Marty & Neher, 1995; Golowasch et al., 2009)

- das Verhältnis von Eingangswiderstand der Zelle zu Serienwiderstand sollte mindestens 100:1 betragen (Armstrong & Gilly, 1992; Marty & Neher, 1995).

Beide Voraussetzungen sind jedoch in tatsächlichen Ableitsituationen, vor allem bei Neuronen sehr selten gegeben. Daher sollte der Serienwiderstand korrekterweise mit der hier beschriebenen Technik bestimmt und abgeglichen werden, um mögliche Messfehler zu reduzieren. Hier leistet die Studie einen wichtigen Beitrag zu einer Vereinheitlichung und genauen Vorgehensweise bei *Patch-Clamp* Experimenten.

Themenbezogene Publikation

Riedemann T, Polder HR, Sutor B. 2016. Determination and compensation of series resistances during whole-cell patch-clamp recordings using a bridge circuit and the phase-sensitive technique. Eur J Physiol. 468:1725-1740. DOI: [10.1007/s00424-016-1868-8](https://doi.org/10.1007/s00424-016-1868-8)

B. Validierung der transgenen Mauslinie als Model für SOM-Interneurone

Für die Charakterisierung und Klassifizierung von GABAergen Interneuronen werden häufig transgene Tierlinien verwendet, die ein Reporter gen nur in einem bestimmten Interneuron-Typ exprimieren. Im Falle von SOM-Interneuronen repräsentieren die sog. GIN Mauslinie (Oliva et al., 2000) und die sog. X94 und X98 Mauslinien die am häufigsten verwendeten Mauslinien (Ma et al., 2006). Alle drei exprimieren das Reporter gen grün-fluoreszierendes Protein (GFP) in einer Subpopulation von SOM-Interneuronen. Dabei ist das GFP-Expressionsmuster in allen drei transgenen Mauslinien sehr charakteristisch. Während sich die GFP-Expression in der X94 Mauslinie vorzugsweise auf Schicht IV beschränkt, findet sich in der X98 Mauslinie eine höhere Dichte an GFP⁺ Zellen in Schicht V (Ma et al., 2006). Die GIN Mauslinie hingegen markiert hauptsächlich GFP⁺ Neurone der oberflächlichen, supragranulären Cortexschichten (Halabisky et al., 2006; Xu et al., 2006). Für die Charakterisierung SOM-Interneurone wurde von mir die sog. GIN-Mauslinie verwendet. Ich konnte zeigen, dass ca. 50% aller SOM-Interneurone des cingulären Cortex GFP exprimieren. Es ist davon auszugehen, dass die GFP⁺ Zellpopulation im Hinblick auf die Gesamtpopulation an SOM-Interneuronen als *pars pro toto* angesehen werden kann. Bei einer initial oberflächlichen Analyse des GFP-Expressionsmusters fiel jedoch eine deutlich unterschiedliche Dichte an GFP⁺ Zellen in unterschiedlichen Gehirnarealen auf. Außerdem konnte ich einen kleinen Prozentsatz an GFP⁺ Neuronen im cingulären Cortex ausmachen, die weder GABA noch SOM exprimierten. Für eine Charakterisierung eines bestimmten Zelltyps ist es jedoch unerlässlich, dass dieser zweifelsfrei identifiziert und beschrieben werden kann. Im Falle der sog. SOM-IRES-Cre Mauslinie (Taniguchi et al., 2011) konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein Teil der mit GFP markierten Neurone nicht SOM sondern Parvalbumin exprimierten und diese Zellen der Klasse der *fast-spiking* Interneurone angehörten (Hu et al., 2013). Daher wurde das GFP-Expressionsmuster in der GIN-Mauslinie eingehend untersucht. In coronalen Cryoschnitten wurde neben GFP-positiven Zellen im cerebralen Cortex auch eine auffallend hohe Dichte an GFP⁺ Zellen in einem tiefen subcorticalen Kerngebiet beobachtet.

Ziel dieses Projektes war die Charakterisierung dieser bisher nicht beschriebenen GFP-positiven Zellpopulation in diesem Kerngebiet. Die Untersuchung umfasste die Analyse ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften, die immunzytochemische Bestimmung ihres neurochemischen Profils, die Erfassung ihrer morphometrischen Daten, der anatomischen Identifikation ihres Kerngebiets und der Quantifizierung ihrer Zellzahl. Diese Daten wurden zum

einen mit denen GFP⁺ Neurone und mit denen von Pyramidenzellen aus dem cerebralen Cortex und mit GFP⁻ Zellen aus dem gleichen Kerngebiet verglichen. Die anatomische Beschreibung des Kerngebiets gelang durch Vergleich von coronalen, horizontalen und sagittalen Cryoschnitten des Gehirns dieser Mauslinie mit einem stereotaktischen Atlas des Mausgehirns (Franklin & Paxinos, 2012; Abb. 5). Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Population von GFP⁺ Neuronen im endopiriformen Nucleus lokalisiert war.

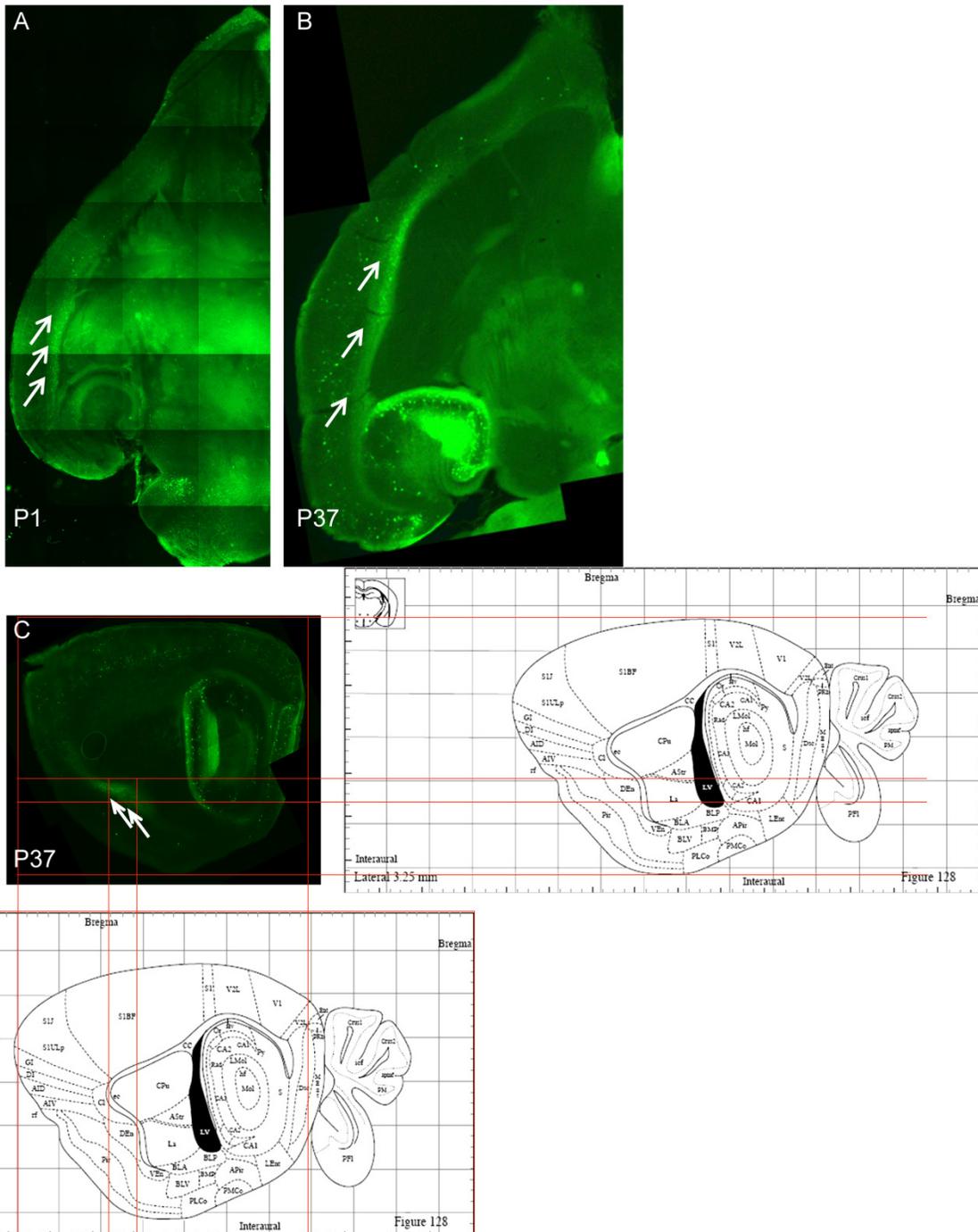


Abb. 5: Subcorticale GFP⁺ Neurone sind im *Nucleus endopiriformis* lokalisiert. A, B Lichtmikroskopische Aufnahme eines horizontalen Gehirnschnittes einer P1 (A) und einer P37 (B) GIN-Maus. C Lichtmikroskopische Aufnahme eines sagittalen Cryoschnitts einer P37 GIN-Maus mit den korrespondierenden Gehirnstrukturen nach Franklin & Paxinos (2012). Die GFP⁺ Zellpopulation befindet sich entsprechend den stereotaktischen Koordinaten von Franklin & Paxinos (2012) im *Nucleus endopiriformis* (*Supporting information* aus Riedemann et al., 2019).

Der Befund, dass dieses GFP⁺ Zellcluster im *Nucleus endopiriformis* lokalisiert ist, konnte mittels Untersuchung der Parvalbumin-Expression in dieser Gehirnregion (Anhang A.2, Abb. 1 (Fig. 1)) und mittels retrogradem Dil-*labeling* (Dil: 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) bestätigt werden (Abb. 6): Während das Claustrum sich durch eine höhere Dichte an PV-Interneuronen auszeichnet, sind diese im endopiriformen Cortex quasi nicht zu beobachten (Anhang A.2, Abb. 1 b (Fig. 1 b)). Außerdem ist bekannt, dass der anteriore cinguläre Cortex starke Verbindungen zum endopiriformen-claustralen Complex aussendet (Quadir et al., 2018; White et al., 2018; Zingg et al., 2018). Nach Dil-Injektion in den anterioren cingulären Cortex konnten wir Dil-positive Fasern in enger Nachbarschaft zu GFP⁺ Zellen des endopiriformen Cortex beobachten (Abb. 6). Um diese GFP⁺ Zellen nicht mit neocorticalen SOM-Interneuronen zu verwechseln, werden diese Zellen im Folgenden GFP⁺ EPP Neurone genannt.

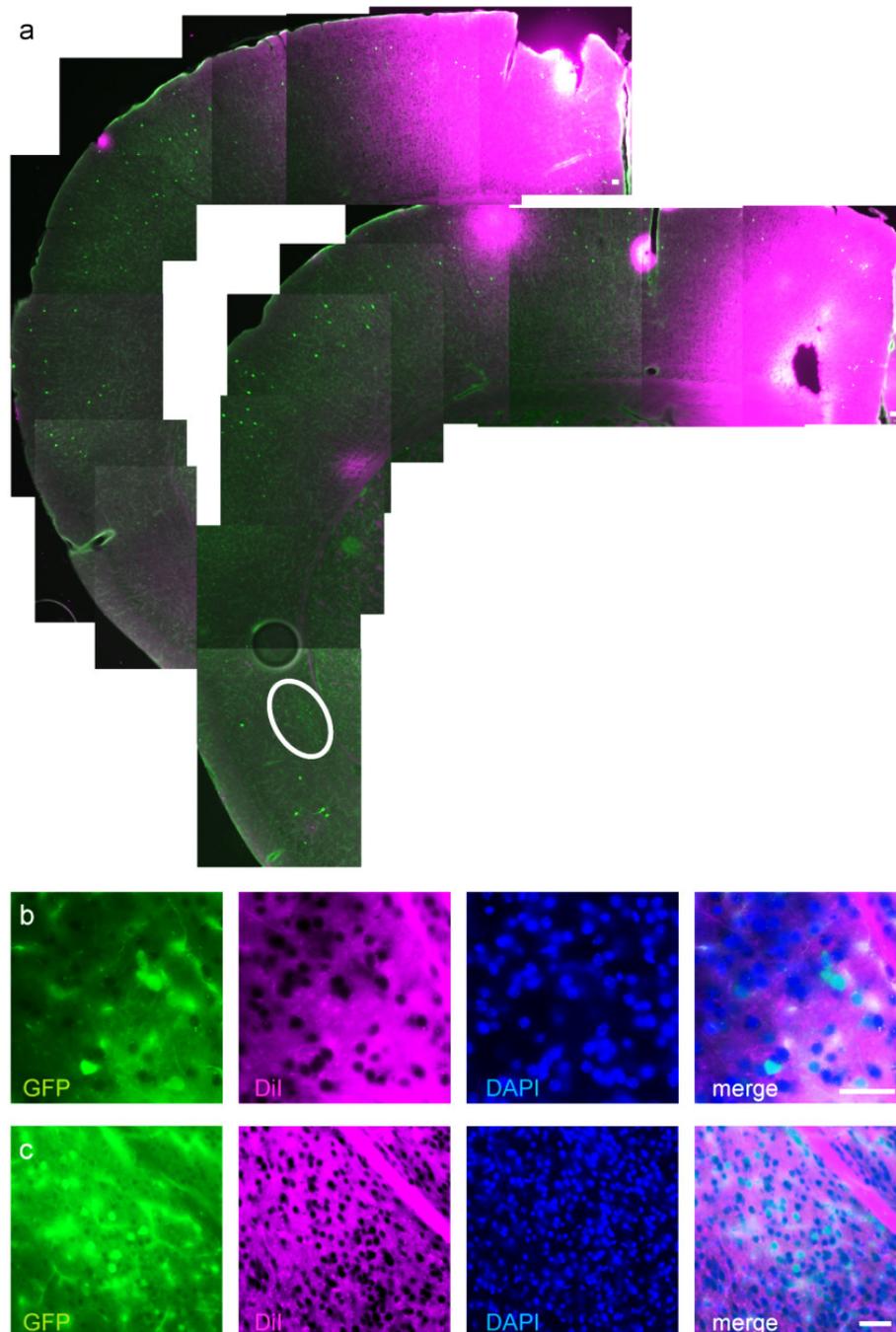


Abb. 6: Konnektivität zwischen dem cingulären Cortex und dem endopiriformen-claustralen Complex. Dil Injektion in den cingulären Cortex eines fixierten Mäusegehirns offenbarte Dil-positive Fasern in enger Nachbarschaft zu GFP⁺ Neuronen des *Nucleus endopiriformis*. A) Konfokale Übersichtsaufnahme des coronalen Hirnschnitts. Die weiße Ellipse entspricht dem *Nucleus endopiriformis*. B, C) Konfokale Nahaufnahme des *Nucleus endopiriformis*. Links: GFP, Mitte links: Dil, Mitte rechts: DAPI, rechts: Überlagerung aller Kanäle (*Supporting information* aus Riedemann et al., 2019).

Spezifisch konnte folgendes gezeigt werden:

- Anders als im cerebralen Cortex korreliert die GFP-Expression GFP⁺ EPP Neurone nicht mit der von SOM oder GAD65/67 (Anhang A.2, Abb. 1 und 2 (Figs. 1 und 2)).
- Morphologisch ähneln GFP⁺ EPP Neurone eher Pyramidenzellen als GABAergen Interneuronen. Typisch für Projektionsneurone des endopiriformen-claustralen Complexes ist dabei die Tatsache, dass der apikale Dendrit dieser GFP⁺ Neurone eine deutliche Krümmung nach ventral aufweist (Watakabe et al. 2014; Anhang A.2, Abb. 3 (Fig. 3)).
- Der pyramidale Charakter dieser GFP⁺ EPP Neurone zeigte sich auch in deren Expression von α CaMKII, einem Enzym, das fast ausschließlich in glutamatergen Neuronen exprimiert wird (McDonald et al. 2002; Wang et al., 2013; Anhang A.2, Abb. 2 c (Fig. 2 c)).
- GFP⁺ EPP Neurone unterschieden sich in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften deutlich von SOM-Interneuronen, teilweise aber auch von Pyramidenzellen des Neocortex. Im Gegensatz dazu waren die elektrophysiologischen Eigenschaften von GFP⁻ EPP Neuronen und GFP⁺ EPP Neuronen sehr ähnlich.
- Bei den GFP⁺ EPP Zellen handelt es sich nicht um in einem unreifen Zustand verharrende Nervenzellen, welche für den piriformen Cortex beschrieben wurden (Rotheneichner et al., 2018), sondern um ausgereifte Neurone, die in den neuronalen Schaltkreis des *Nucleus endopiriformis* integriert sind (Anhang A.2, Abb. 11 (Fig. 11)).

Mittels clonaler Analyse und sog. *fate mapping* konnte gezeigt werden, dass derselbe Vorläuferklon sowohl SOM- als auch PV-Interneurone generieren kann (Ciceri et al., 2013). Demzufolge wäre es möglich, dass auf Grund ihrer Entwicklung aus einem gemeinsamen Vorläuferklon GFP auch in PV-Interneuronen exprimiert werden könnte. Eine Zweifach-Markierung mit SOM und PV konnte allerdings nicht beobachtet werden. Ferner ist bekannt, dass der piriforme Cortex unreife Nervenzellen beinhaltet, die erst spät postnatal ausreifen (Rotheneichner et al., 2018). Eine ähnliche Möglichkeit könnte auf den *Nucleus endopiriformis* zutreffen. Dass dies mit großer Wahrscheinlichkeit jedoch nicht der Fall ist, beruht auf folgenden Befunden:

1) GFP Expression konnte schon in ein Tage alten Mäusejungen beobachtet werden. Auch hier konnte keine Coexpression mit SOM festgestellt werden. Das spricht dafür, dass diese Zellen bereits früh in der Entwicklung existieren und keine Ausreifung zu SOM-Interneuronen stattfindet.

2) Die Eigenschaften eines einzelnen Aktionspotenzials von GFP⁺ Zellen aus einem akuten Gehirnschnitt eines sechs Tage alten Mäusejungens ähneln eher denen einer Pyramidenzelle als denen eines SOM-Interneurons.

3) GFP⁺ EPP Neurone sind in den bestehenden neuronalen Schaltkreis integriert: Dil-Injektion im cingulären Cortex führte zu Dil-markierten Fasern in dem endopiriformen-claustralen Complex in enger Nachbarschaft zu GFP⁺ EPP Neuronen (Abb. 6).

4) Elektrische Stimulation der weißen Substanz dorsal des *Nucleus endopiriformis* löste in 77% aller GFP⁺ Zellen einen antidromen Spike, gefolgt von einer postsynaptischen Antwort aus. Unterdrückung der GABAergen Transmission wiederum löste in allen GFP⁺ EPP Neuronen paroxysmale Depolarisationen aus, welche implizieren, dass die Aktivität dieser Zellen durch GABAerge Interneurone kontrolliert wird.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie zum ersten Mal gezeigt werden, dass das GFP-Expressionsmuster eines transgenen Tiers ein spezifisches Gehirnareal, in dem Fall den *Nucleus endopiriformis*, abgrenzt. In Zukunft könnte sich somit diese Mauslinie als Modell zur Untersuchung des *Nucleus endopiriformis* erweisen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften dieser GFP⁺ EPP Neurone sich deutlich von SOM-Interneuronen des Neocortex unterscheiden.

Themenbezogene Publikation

Riedemann S, Sutor B, Bergami M, **Riedemann T**. 2019. Gad1-promotor-driven GFP expression in non-GABAergic neurons of the nucleus endopiriformis in a transgenic mouse. J Comp Neurol. 527:2215-2232. DOI: [10.1002/cne.24673](https://doi.org/10.1002/cne.24673)

C. Quantitative Klassifizierung von Somatostatin-exprimierenden Interneuronen im cingulären Cortex der Maus

Im Gegensatz zu Pyramidenzellen stellen GABAerge Interneurone eine höchst heterogene Gruppe an Nervenzellen dar. Zwar wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Gruppen an Pyramidenzellen gefunden (van Aerde & Feldmeyer, 2015), jedoch ist die Diversität von Pyramidenzellen bei weitem nicht so komplex wie die von GABAergen Interneuronen (Ascoli et al. 2008, DeFelipe et al., 2013; Tremblay et al., 2016; Riedemann, 2019). Die ausgeprägte Diversität von GABAergen Interneuronen erfordert ihre genaue Klassifizierung, um funktionell relevante Subtypen zu bestimmen. Dies ist insbesondere im Hinblick darauf wichtig, dass einige neurologische und/oder neuropsychiatrische Krankheitsbilder mit dem spezifischen Verlust eines bestimmten Interneuron-Typs korrelieren (Lewis et al., 2005, 2012; Tripp et al., 2011; Seney et al., 2015). Dieser Zusammenhang lässt darauf schließen, dass bestimmte Neurontypen sehr spezifische Rollen innerhalb eines neocorticalen Schaltkreises spielen. Um nachvollziehen zu können, warum ein bestimmter Zelltyp im Vergleich zu anderen Zelltypen anfälliger auf eine neuropathologische Erkrankung reagiert, ist die genaue Kenntnis ihrer spezifischen zellulären und Schaltkreis-technischen Eigenschaften wichtig und notwendig. Die Untersuchung eines bestimmten Zelltyps sollte sich dabei immer auf ein gegebenes Gehirnareal beziehen, da die zelluläre und neurochemische Zusammensetzung von Gehirnregion zu Gehirnregion variieren kann (z.B. granulärer vs. agranulärer Cortex) und bestimmte neurologische und/oder neuropsychiatrische Erkrankungen sich spezifisch in einer Gehirnregion manifestieren können. Der anteriore cinguläre Cortex (ACC) als Teil des präfrontalen Cortex scheint besonders von Befindlichkeitsstörungen und anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen betroffen zu sein: Mehrere Studien konnten belegen, dass im Vergleich zu menschlichen Gehirnen von gesunden Patienten Gehirne von Menschen, die an einer *Major Depression* erkrankt waren, einen deutlich reduzierten Spiegel an Somatostatin aufwiesen (Tripp et al., 2011; Seney et al., 2015). Dieses Beispiel zeigt, dass sich zum einen bestimmte Pathologien nur in einem spezifischen Gehirnareal bemerkbar machen können und zum anderen, dass diese Pathologien selektiv nur einen bestimmten Zelltyp angreifen bzw. dass der Untergang eines bestimmten Zelltyps in einem bestimmten Gehirnareal eine bestimmte neuropathologische Verfassung hervorruft. Aus diesem Grund müssen alle Eigenschaften, die einen spezifischen Zelltyp ausmachen, genauer beleuchtet werden und die Grundlage für alle Klassifizierungsstudien bieten. Um sich auf eine allgemeingültige Klassifizierung einigen zu können, ist es notwendig, möglichst viele Eigenschaften, die einen bestimmten Zelltyp ausmachen, zu untersuchen. Allerdings sind die meisten experimentellen Designs nur auf die Beschreibung einer begrenzten Anzahl an

Eigenschaften zugeschnitten, was letzten Endes mehrere Blickwinkel und somit parallele Klassifizierungsschemata zulässt. Um dieses Problem zu minimieren, wurde in der vorliegenden Versuchsreihe ein experimenteller Ansatz gewählt, der einerseits die Anzahl und Verteilung von SOM-Interneuronen im ACC genau beschreibt und andererseits deren detaillierte neurochemische, elektrophysiologische und morphologische Eigenschaften umfasste. Die vorliegenden Versuche wurden an einer transgenen Mauslinie durchgeführt, in welcher das grün-fluoreszierende Protein unter der Kontrolle des GAD1-Promotors in einer Subpopulation von SOM-Interneuronen exprimiert wird. Im ACC der Maus exprimieren ca. 50% aller SOM-Interneurone GFP (Riedemann et al., 2016). Obwohl GFP nur in einer Untergruppe von SOM-Interneuronen exprimiert wird, ist davon auszugehen, dass diese GFP⁺ Zellen als Stellvertreter der Gesamtpopulation SOM-Interneurone gelten und sich nicht von GFP⁻ aber SOM⁺ Zellen unterscheiden. Mittels eines *design-based* stereologischen Verfahrens wurde erstmals die genaue Anzahl supragranulärer SOM-Interneurone ACC der Maus quantitativ bestimmt, mit dem zukünftigen Ziel, Änderungen der Interneuron-Zahl bei einem bestimmten neuropathologischen Befund feststellen zu können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass SOM-Interneurone des ACC Cortex sich aus verschiedenen neurochemischen Subtypen zusammensetzen. Mit Hilfe von Dreifach- und Vierfach-Färbungen mittels geeigneter Antikörper-Kombinationen konnte gezeigt werden, dass die Gruppe der SOM-Interneurone sich aus mindestens fünf nicht-überlappenden, neurochemischen Untergruppen zusammensetzt. Dabei stellte sich heraus, dass SOM-Interneurone aus anderen Gehirnregionen prinzipiell zwar ein ähnlich großes Spektrum an neurochemischen Subtypen aufweisen, aber dass die relativen Anteile dieser neurochemischen Subtypen an der Gesamtpopulation von Gehirnregion zu Gehirnregion variieren.

Konkret konnte ich zeigen, dass

- GABAerge Neurone ca. 18% der Gesamtneuronpopulation des ACC ausmachen (Anhang A.3, Abb. 3 (Fig. 3)),
- ca. 4% aller Neurone des ACC Somatostatin exprimieren,
- SOM-Interneurone etwa ein Viertel (24%) aller GABAergen Neurone des ACC repräsentieren (Anhang A.4, Abb. 4 (Fig. 4)),
- die große Mehrzahl SOM-Interneurone das Calcium-bindende Protein Calretinin exprimiert und SOM in ca. 28% aller Calretinin-Interneurone exprimiert ist (Anhang A.4, Abb. 5 (Fig. 5)),

- das Calcium-bindende Protein Calbindin sich in ca. einem Drittel aller SOM-Interneurone befindet,
- das Calcium-bindende Protein Parvalbumin nie zusammen mit SOM exprimiert wird,
- Neuropeptid Y ebenfalls in ca. einem Drittel aller SOM-Interneurone exprimiert wird (Anhang A.4, Abb. 10 (Fig. 10)),
- weder vasoaktives intestinales Peptid noch Cholecystokinin zusammen mit SOM coexprimiert werden,
- die Mehrzahl aller SOM-Interneurone den Corticotropine-releasing factor exprimiert.

Insgesamt konnten zum ersten Mal durch geeignete Antikörper-Kombinationen folgende, sich nicht-überlappende, neurochemische Unterklassen an SOM-Interneuronen im ACC der Maus gefunden werden (Anhang A.3, Abb. 12 (Fig. 12)):

- 1) SOM-Interneurone, die keinen weiteren Marker exprimieren.
- 2) SOM-Interneurone, die positiv für Calretinin, nicht aber für Calbindin sind.
- 3) SOM-Interneurone, die Calbindin, nicht aber Calretinin, exprimieren.
- 4) SOM-Interneurone, die sowohl Calretinin als auch Neuropeptid Y (NPY) exprimieren.
- 5) SOM-Interneurone, die sowohl Calretinin, Calbindin als auch NPY exprimieren.

Um feststellen zu können, ob diese neurochemischen Unterklassen an SOM-Interneuronen unterschiedliche Morphologien oder elektrophysiologische Eigenschaften aufzeigen, leitete ich mittels *Ganzzell-Patch-Clamp* Technik von GFP-positiven Zellen ab. Um später in der Lage zu sein, deren elektrophysiologische Eigenschaften mit ihren morphologischen und neurochemischen Eigenschaften zu korrelieren, wurde der intrazellulären Ableitelösung Biocytin beigefügt. Dies ermöglicht die Visualisierung abgeleiteter Zellen mittels Fluorophor-gekoppeltem Streptavidin. Im Folgenden konnte festgestellt werden, ob die neurochemischen Unterklassen einer multivariaten Analyse standhalten und gegebenenfalls als gesonderte elektrophysiologische und/oder morphologische Unterklassen zu Tage treten. Die multivariate Analyse umfasste eine Hauptkomponentenanalyse mit anschließender *k-means Cluster*-Analyse und wurde in Kooperation mit der *Bioinformatics Core Facility* des *Biomedizinischen Centrums* unter Leitung

von Dr. Tobias Straub durchgeführt. Insgesamt wurden 31 elektrophysiologische und 18 morphologische Parameter gewählt und diese später mit einer neurochemischen Charakterisierung der abgeleiteten Zellen kombiniert (Riedemann et al., 2018). Um beurteilen zu können, ob die Hauptkomponentenanalyse prinzipiell in der Lage ist, unterschiedliche Zellpopulationen voneinander abzugrenzen, wurden außerdem Pyramidenzellen in die Analyse mit eingeschlossen. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die Hauptkomponentenanalyse in der Lage war, Pyramidenzellen (und neurogliaforme Zellen) von SOM-Interneuronen abzugrenzen und zum anderen, dass SOM-Interneurone sich aus mindestens zwei Untergruppen, genannt Gruppe I und Gruppe II GIN, zusammensetzen (Anhang A.4, Abb. 1 (Fig. 1)). Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- SOM-Interneurone unterscheiden sich sowohl in morphologischer als auch in elektrophysiologischer Sicht deutlich von Pyramidenzellen (Anhang A.5, Abb. 10 (Fig. 10)).
- Unter Einbeziehung elektrophysiologischer und morphologischer Parameter finden sich zwei separate Untergruppen von SOM-Interneuronen (Anhang A.4, Abb. 1 (Fig. 1)).
- Diese Untergruppen unterscheiden sich im Hinblick auf ihre passiven Membraneigenschaften: So findet sich zum Beispiel eine langsamere dendritische und somatische Zeitkonstante und einen höheren Eingangswiderstand in Gruppe I der SOM-Interneurone (Anhang A.4, Abb. 1 (Fig. 1)).
- Unterschiede finden sich außerdem in der Strom-Spannungsbeziehung beider Zelltypen und in der Kinetik eines einzelnen Aktionspotenzials (Anhang A.4, Abb. 2 und 3 (Figs. 2 und 3)).
- Generell zeigen SOM-Interneurone ein sehr variables Entladungsmuster auf. Während etwa die Hälfte aller SOM-Interneurone ein kontinuierliches Entladungsmuster aufweist, konnte ein *burstendes* Entladungsmuster nur in Gruppe I gefunden werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein SOM-Interneuron ein transientes Entladungsmuster aufweist, ist hingegen in Gruppe II der SOM-Interneurone deutlich höher (Anhang A.4, Abb. 5 (Fig. 5)).
- Während beide Zellgruppen synaptischen Input mit etwa dergleichen Frequenz erhalten, sind die postsynaptischen Potenziale in Gruppe I deutlich höher und deren Dauer verlängert (Anhang A.4, Abb. 7 (Fig. 7)).
- Zwar ist die Anzahl der dendritischen Primärprozesse in Gruppe I höher, die dendritische Gesamtlänge ist jedoch in Gruppe II höher (Anhang A.4, Abb. 10 (Fig. 10)).

- SOM-Interneurone zeichnen sich in ihrer Gesamtheit durch ein hohe somatodendritische Variabilität aus (Abb. 7).
- Die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins dendritischer Dornfortsätze ist in Gruppe I höher als in Gruppe II (Anhang A.4, Abb. 11 (Fig. 11)).
- SOM-Interneurone der Gruppe I besitzen ein komplexeres Axongeflecht in ihrer Ursprungsschicht.
- Ein wichtiges Ergebnis dieser Studie war außerdem, dass das Vorhandensein des Markers Neuropeptid Y mit Gruppenzugehörigkeit zu Gruppe II korrelierte.

Im Hinblick auf die vorliegenden Ergebnisse lässt sich festhalten, dass Gruppe I GIN auf Grund ihrer passiven Membraneigenschaften eine höhere zelluläre Erregbarkeit aufweisen. Das *burstende* Entladungsverhalten lässt darauf schließen, dass sie Pyramidenzellen effektiv hemmen können und eventuell eine höhere Menge an Somatostatin freisetzen. Die Tatsache, dass SOM-Interneurone der Gruppe I mit größerer Wahrscheinlichkeit dendritische Dornfortsätze ausbilden, lässt zudem darauf schließen, dass diese, abhängig vom synaptischen Input, häufiger plastisch moduliert werden können. Außerdem lässt sich schlussfolgern, dass Gruppe II GIN auf Grund ihrer komplexeren Axonverzweigungen in Schicht II und III aber auch in Schicht I in der Lage sind, eine insgesamt größere Zahl an postsynaptischen Pyramidenzellen zu beeinflussen. Dennoch lassen sich nur indirekt Rückschlüsse auf die Funktion beider Untergruppen an SOM-Interneurone gewinnen.

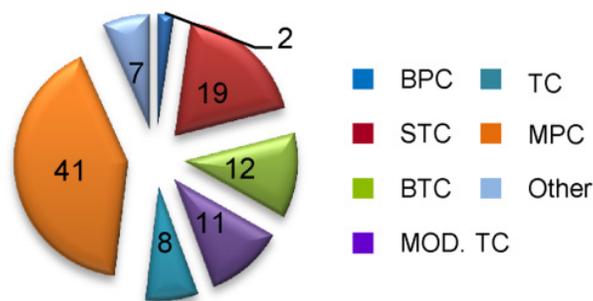


Abb. 7: Somatodendritische Variabilität in SOM-Interneuronen. Relative Größe der somatodendritischen Untergruppen aller SOM-Interneurone des cingulären Cortex als Kuchendiagramm. Die meisten SOM-Interneurone besitzen entweder eine multipolare (MPC, 41% aller SOM-Interneurone) oder eine somatodendritische Morphologie vom *tufted* Typ (entweder *single-tufted* (STC) oder *bitufted* (BTC) oder modifizierte *tufted* Zellen (mod. TC), 42% aller SOM-Interneurone). Ein kleiner Anteil der Zellen ist entweder vom bipolaren (BPC) oder tripolaren (TC) Typ oder besitzt unbekannte somatodendritische Morphologie (*other*). *Supporting information* aus Riedemann et al., 2018.

Beide Studien zusammen zeichnen ein sehr detailliertes Bild über die Eigenschaften SOM-Interneurone im cingulären Cortex der Maus. Untergruppen SOM-Interneurone wurden bisher mittels multivariater Analyse nur für den somatosensorischen Cortex der juvenilen Maus beschrieben (Halabisky et al., 2006; Xu et al., 2006; McGarry et al., 2010). Die hier beschriebene Arbeit umfasst eine deutlich größere Zellzahl an SOM-Interneuronen aus akuten Hirnschnitten von adulten Mäusen. Außerdem gelang in der vorliegenden Studie (Riedemann et al., 2018) zum ersten Mal der Nachweis, dass die Expression eines neurochemischen Markers, im vorliegenden Fall NPY, mit der Zugehörigkeit zu einer der beiden Untergruppen korrelierte. Hieraus ergeben sich viele neue Ansatzpunkte, um die Funktion beider Untergruppen zu beleuchten.

Themenbezogene Publikationen

Riedemann T, Straub T, Sutor B. 2018. Two types of somatostatin-expressing GABAergic interneurons in the superficial layers of the mouse cingulate cortex. PLoSOne. 13: e0200567. DOI: [10.1371/journal.pone.0200567](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200567)

Riedemann T, Schmitz C, Sutor B. 2016. Immunocytochemical heterogeneity of somatostatin-expressing GABAergic interneurons in layers II and III of the mouse cingulate cortex: A combined immunofluorescence/design-based stereologic study. J Comp Neurol. 524:2281-2299. DOI: [10.1002/cne.23948](https://doi.org/10.1002/cne.23948)

Riedemann T. 2019. Diversity and Function of Somatostatin-expressing interneurons in the cerebral cortex. Int J Mol Sci. 20. pii: E2952. DOI: [10.3390/ijms20122952](https://doi.org/10.3390/ijms20122952)

D. Wirkung des Neuropeptides SOM auf die Erregbarkeit von Pyramidenzellen im cingulären Cortex der Maus

Bisher konnte ich zeigen, dass SOM-Interneurone des cingulären Cortex aus einer Vielzahl von Untergruppen bestehen. Über deren Funktion konnten allerdings nur indirekt, ausgehend von ihren morphologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften, Rückschlüsse gezogen werden. Daher untersuchte ich in der vorliegenden Versuchsreihe die Wirkung des Peptids auf die nachgeschaltete postsynaptische Pyramidenzelle. Es ist bekannt, dass SOM-Interneurone in corticalen Schaltkreisen an einer lateralen Hemmung beteiligt sind. Aktionspotenzialentladung in einer Pyramidenzelle löst demnach eine, über SOM-Interneurone vermittelte, disynaptische Hemmung in einer synaptisch gekoppelten, benachbarten Pyramidenzelle aus (Silberberg et al., 2007; Obermayer et al., 2018; Kapfer et al., 2007).

Es ist davon auszugehen, dass SOM-Interneurone hierbei neben GABA auch Somatostatin freisetzen, auch wenn der Beweis hierfür bisher noch nicht erbracht worden ist (van den Pol, 2012). Somatostatin entfaltet seine biologische Wirkung über fünf unterschiedlichen Somatostatinrezeptor-Subtypen (SSTR1-5), von denen der SSTR2 wiederum aus den Isoformen SSTR2A und SSTR2B besteht (Tulipano & Schulz, 2007). Alle Somatostatin-Rezeptoren gehören der Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an. Aktivierung des Somatostatin-Rezeptors aktiviert eine einwärts-gleichrichtende Kaliumleitfähigkeit (K_{ir}) durch direkte Interaktion der $G_{\beta\gamma}$ Untereinheit mit den dazugehörigen K_{ir} -Kanälen, was sich als Abnahme der zellulären Erregbarkeit bemerkbar macht.

Eine langanhaltende Einwirkung des Peptids bewirkt eine Abnahme der SOM-induzierten Wirkung aufgrund von

- 1) Rezeptor-Desensitisierung (Hipkin et al., 1997; Liu et al., 2009; Lehmann et al., 2014),
- 2) Rezeptor Internalisierung (Boudin et al., 2000; Stroh et al., 2000; Lelouvier et al., 2008),
- 3) Abnahme der zellulären Gesamtmenge an Somatostatin-Rezeptoren (Tulipano & Schulz, 2007; Bunemann et al., 1996).

Einer Desensitisierung des SSTRs liegt die Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptor Kinase 2 (GRK-2) zugrunde (Liu et al., 2008; Lucas & Armstrong, 2015; Bou Farah et al., 2016). In mehreren Studien wurde die Wirkung repetitiver Somatostatin-Applikation auf unterschiedliche Zelltypen untersucht. Allerdings besteht weiterhin Unklarheit über die

Wirkdauer des Neuropeptids und über eine mögliche Desensibilisierung des dazugehörigen Rezeptors. Einerseits führt langandauernde SOM-Applikation in Neuronen zu einer Abnahme der Wirksamkeit des Peptids (i.e. Rezeptor-Desensibilisierung), andererseits bewirkt chronische SOM-Applikation in endokrinen Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Liganden (Meis et al., 2005; Hu et al., 2017; Hicks et al., 1998; Presky & Schonbrunn, 1988; Tannenbaum et al., 2001). Angesichts dieser teils widersprüchlichen Ergebnisse zielte die vorliegende Versuchsreihe darauf ab, den physiologischen Zeitverlauf der SOM-induzierten Antwort in Pyramidenzellen des cingulären Cortex zu bestimmen. Hierzu wurden *Ganzzell-Patch-Clamp*-Messungen an Pyramidenzellen der Schichten II und III des cingulären Cortex durchgeführt.

In Übereinstimmung mit früheren Studien konnte ich zeigen, dass die Aktivierung des SOM-Rezeptors einen Membranstrom induziert, der zwischen einem Haltepotenzial von -100 mV und -80 mV umkehrt (Anhang A.6, Abb. 1 C (Fig. 1 C)). Dies entspricht einer durch Somatostatin induzierten Kaliumleitfähigkeit (Inoue et al., 1988; Meis et al., 2005; Pittman & Siggins, 1981). Die spezifische Aktivierung des SSTR2 löste hierbei den Somatostatin-vermittelten Strom aus (Anhang A.6, Abb. 1 F (Fig. 1 F)). Die Erhöhung einer Kaliumleitfähigkeit durch Somatostatin verursachte des Weiteren eine Hyperpolarisation des Membranpotenzials und eine Abnahme des Membranwiderstands (Anhang A.6, Abb. 1 G-J (Fig. 1 G-J)). Rezeptor-Desensibilisierung ist definiert als eine Abnahme der Wirkung eines Rezeptor trotz Anwesenheit des Liganden. Um zu überprüfen, ob SSTR Aktivierung zu einer möglichen Rezeptor-Desensibilisierung führte, untersuchte ich den Zeitverlauf der SOM-vermittelten Kaliumleitfähigkeit, indem SOM für 5 Minuten dem Bad zugefügt wurde. Ich konnte zeigen, dass die SOM-vermittelte Membranhyperpolarisation und Abnahme des Membranwiderstandes bis zu 25 min nach Entfernung des Peptids aus der Badlösung anhielten.

Es war davon auszugehen, dass die SOM-vermittelte Wirkung auf das Membranpotenzial und den Membranwiderstand nach repetitiver Badapplikation und vermeintlicher Rezeptordesensibilisierung kleiner ausfallen würde. Tatsächlich konnte jedoch kein Unterschied in der Amplitude der SOM-vermittelten Wirkung beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Aktivierung des SSTRs nicht unbedingt zu seiner Desensibilisierung führen muss. Diese Hypothese konnte bestätigt werden, indem SOM in unterschiedlichen Zeitabständen repetitiv mittels kurzzeitigem Druck (500 ms à 500 mbar) appliziert wurde. Die Intervalle reichten von 600 s bis zu 60 s. Unabhängig von der Dauer des Applikations-Intervalls verursachte SOM auch nach der dritten oder vierten Applikation in etwa die gleiche Wirkungsamplitude (Anhang A.6, Abb. 4 (Fig. 4)). Um sicherzustellen, dass SOM in

saturierender Konzentration druck-appliziert wurde, wurde in dem nächsten Schritt die SOM Konzentration von 5 μM auf 20 μM erhöht. Es erfolgte eine repetitive SOM Applikation in einem Abstand von 150 s (zehn Mal). Unter dieser Bedingung konnte zwar eine Abnahme der SOM-vermittelten Antwort beobachtet werden, allerdings wurde die Abnahme der SOM-vermittelten Wirkung ebenfalls in Anwesenheit eines GRK2 Inhibitors Gallein beobachtet (Anhang A.6, Abb. 5 (Fig. 5)). Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass neben GRK2 auch andere Kinasen an einer Rezeptor-Desensibilisierung beteiligt sein müssen.

Außerdem wurde der Einfluss des Peptids auf die zelluläre Erregbarkeit von Pyramidenzellen untersucht. Die SOM-vermittelte Membranhyperpolarisation und Abnahme des Membranwiderstandes hatten zur Folge, dass die Entladungsfrequenz von Pyramidenzellen und die Latenz bis zum ersten Spike nach Injektion eines überschwelligen Strompulses langfristig herabgesetzt war, der Effekt jedoch reversibel war (Anhang A.6, Abb. 2 und 3 (Fig. 2 und 3)). Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass Somatostatin auch einen Einfluss auf das Entladungsmuster hatte und die Regularität der Aktionspotenzialentladung in Pyramidenzellen positiv beeinflusste.

Themenbezogene Publikation

Riedemann T, Sutor B. 2019. Long-lasting actions of somatostatin on pyramidal cell excitability in the mouse cingulate cortex. *Neurosci Lett.* 698:217-223. DOI: [10.1016/j.neulet.2019.01.034](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.01.034)

IV. Zusammenfassung und Ausblick

SOM-Interneurone zeichnen sich durch ihre große Diversität aus. Bisher konzentrierte sich die große Mehrheit aller Studien, welche die Vielfalt und Funktion von SOM-Interneuronen genauer beschreiben, auf den somatosensorischen oder auf den visuellen Cortex. Anders als die beiden primären sensorischen Cortexareale, besitzt der anteriore cinguläre Cortex (ACC) jedoch keine innere Körnerschicht und gehört damit wie der motorische Cortex zu den agranulären Cortices. Dementsprechend ist auch die neuronale Verschaltung und Informationsverarbeitung innerhalb des ACC unterschiedlich.

Wir konnten zeigen, dass sich diese Unterschiede auch in zellulärer Hinsicht manifestieren: Im Vergleich zu SOM-Interneuronen des visuellen oder somatosensorischen Cortex (Ma et al., 2006; Xu et al., 2006; Halabisky et al., 2006) weisen SOM-Interneurone des ACC eine unterschiedliche neurochemische Zusammensetzung auf (Riedemann et al., 2016). Der Anteil an NPY- und an CR-exprimierenden SOM-Interneuronen im ACC ist verglichen mit den beiden Cortexarealen deutlich höher. Auch morphologisch konnten wir Unterschiede beobachten: Anders als im somatosensorischen Cortex scheint der Anteil an Martinotti-Zellen in Bezug auf die Gesamtpopulation aller SOM-Interneurone im ACC kleiner zu sein (Ma et al., 2006; Markram et al., 2015; Riedemann et al., 2018). Außerdem zeichnen sich SOM-Interneurone des ACC durch eine höhere somatodendritische Variabilität aus (Riedemann et al., 2018; Markram et al., 2015). Anders als im somatosensorischen Cortex lassen sich SOM-Interneurone des ACC mittels multivariater Analyse in zwei anstatt vier Untergruppen aufteilen (Halabisky et al., 2006, McGarry et al., 2010; Riedemann et al., 2018). Da sowohl das Alter der Versuchstiere (juvenil vs. adult) als auch die Gehirnregion unterschiedlich sind, lassen sich diese Studien nur bedingt miteinander vergleichen. Ein Schlüsselergebnis unserer Studie war die Tatsache, dass das Vorhandensein des Neuropeptids Y mit der Zugehörigkeit zu einer der beiden Untergruppen korrelierte (Riedemann et al., 2018). In Bezug auf die dendritische Komplexität konnten wir zeigen, dass die Gesamtlänge aller dendritischen Fortsätze beider SOM-Interneuron Untergruppen des cingulären Cortex höher ist als die SOM-Interneurone des somatosensorischen Cortex oder des Präsubiculum (McGarry et al., 2010; Nassar et al., 2015, Riedemann et al., 2018). Die gefundenen neurochemischen und morphologischen Unterschiede SOM-Interneurone des ACC spiegeln sich auch in elektrophysiologischer Hinsicht wider. Anders als im somatosensorischen und visuellen Cortex findet sich im ACC ein kleinerer Anteil regulär entladender SOM-Interneurone (McGarry et al., 2010; Ma et al., 2006; Riedemann et al., 2018; Markram et al., 2015). In Übereinstimmung mit den von uns gefundenen Beobachtungen, zeigen

SOM-Interneurone des präfrontalen Cortex der Ratte ebenfalls eine größere Variabilität an Aktionspotenzial-Entladungsmustern auf (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi & Kubota, 1993).

Methodisch gilt es zu beachten, dass ein kleiner Prozentsatz an *gelabelten* Zellen in transgenen Tieren vorkommen kann, die trotz Anwesenheit von GFP oder RFP nicht dem zu erwartenden Zelltyp entsprechen. Dies kann bei Klassifizierungsstudien dazu führen, dass eine Untergruppe von beispielsweise SOM-Interneuronen beschrieben wird, die in erster Linie gar nicht der Gruppe von SOM-Interneuronen zuzuordnen sind. So wurde bei Nassar et al. (2015) ein Cluster beschrieben und diskutiert, dass sich möglicherweise GFP⁺, aber SOM⁻ Interneuronen der *fast-spiking* Kategorie zusammensetzt. Nassar und Kollegen zeigten, dass die Expression eines Markerproteins (*tdTomato*) nur zu ca. 71% mit der von SOM übereinstimmte und dass ca. 23% aller tdTomato-exprimierenden Neurone positiv für Parvalbumin waren. In früheren Studien mit derselben Mauslinie wurde hingegen eine hohe Spezifität des Transgens beschrieben (Gentet et al., 2012; Cottam et al., 2013; Xu et al., 2013). Auch die von uns verwendete Mauslinie zeigt teilweise GFP-Expression in nicht SOM-Interneuronen. Allerdings konnten wir zeigen, dass dieser Anteil im ACC unter 3% beträgt und in subcorticalen Gehirnregionen größer ist (Riedemann et al., 2019).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zellulären Eigenschaften von SOM-Interneuronen von Gehirnregion zu Gehirnregion variieren und dass die Eigenschaften dieser Zellpopulation immer auf einen bestimmten neuronalen Schaltkreis bezogen analysiert werden müssen. Hier konnten unsere Arbeiten einen wichtigen Beitrag über die Diversität von SOM-Interneuronen des cingulären Cortex leisten (Riedemann et al., 2016; 2018, 2019; Riedemann, 2019).

Ich konnte zeigen, dass die Population der SOM-Interneurone des cingulären Cortex in zwei große Untergruppen, deren Alleinstellungsmerkmal die An- oder Abwesenheit von NPY zu sein scheint, eingeteilt werden kann. Es bleibt zu untersuchen, welchen Einfluss die gleichzeitige Freisetzung von GABA, SOM und NPY auf die nachgeschaltete Zelle hat. Bisher konzentrierten sich meine die Beobachtungen auf die postsynaptische Wirkung von SOM in Pyramidenzellen (Riedemann & Sutor, 2019). Anders als bisher beschrieben, konnten wir zeigen, dass repetitive Exposition mit dem Liganden zwar zu einer Abnahme der SSTR-induzierten Wirkung führen kann, dass diese aber nicht abhängig von der Aktivität der G-Protein abhängigen Kinase 2 ist. Badapplikation von SOM hingegen führte, anders als bei einer Desensibilisierung zu erwarten wäre, zu einer dauerhaften Abnahme der zellulären Erregbarkeit. Auf Grund der von uns beobachteten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass GRK-2 nicht die einzige Kinase ist, die die Desensibilisierung des SSTRs initiiert und/oder, dass SOM direkt den K_{ir} Kanal desensibilisiert,

wie bereits für den μ opioid Rezeptor beschrieben wurde (Kovoor et al., 1995; Hu et al., 2017; Lucas & Armstrong, 2015; Young Shim et al., 2006). Außerdem konnten wir erstmalig zeigen, dass SOM nicht nur einen Einfluss auf die zelluläre Erregbarkeit hat, sondern sich auch auf das Entladungsmuster von Pyramidenzellen auswirkt. In Zukunft soll untersucht werden, inwieweit die Peptide SOM und NPY ihre Wirkung gegenseitig beeinflussen.

Basierend auf den beobachteten Wirkungen ist davon auszugehen, dass SOM auch die synaptische Transmission moduliert. Diese Hypothese wird derzeit mittels optogenetischer und elektrischer Stimulation und Paareleitungen zwischen SOM-Interneuronen und Pyramidenzellen von uns untersucht. Es werden Schaltkreismotive innerhalb des cingulären Cortex identifiziert und die Wirkung beider Peptide auf die synaptische Transmission innerhalb dieser Schaltkreise analysiert.

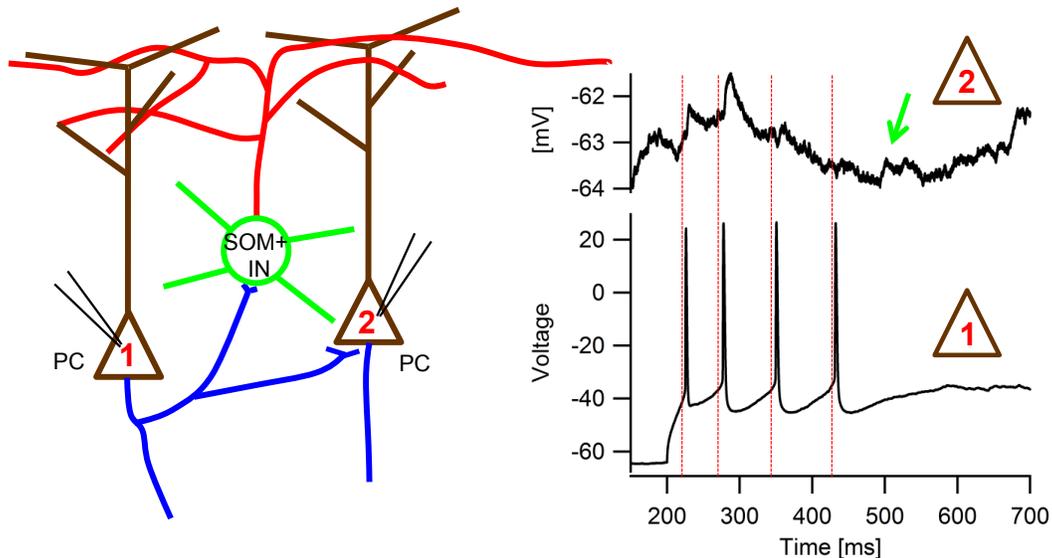


Abb. 8: SOM-Interneurone sind an einer disynaptischen Hemmung/Feedback Hemmung beteiligt. Paareleitung von zwei benachbarten Pyramidenzellen (PC1 und PC 2, braun), die sowohl monosynaptisch als auch disynaptisch über ein vermeintliches SOM-Interneuron (SOM+IN, grün) gekoppelt sind. Aktionspotentialentladung in Pyramidenzelle 1 (linkes Panel, untere Aufnahmespur) löst unitäre exzitatorische postsynaptische Potenziale in Pyramidenzelle 2, gefolgt von einem inhibitorischen postsynaptischen Potenzial (rechtes Panel, grüner Pfeil in oberer Aufnahmespur) aus.

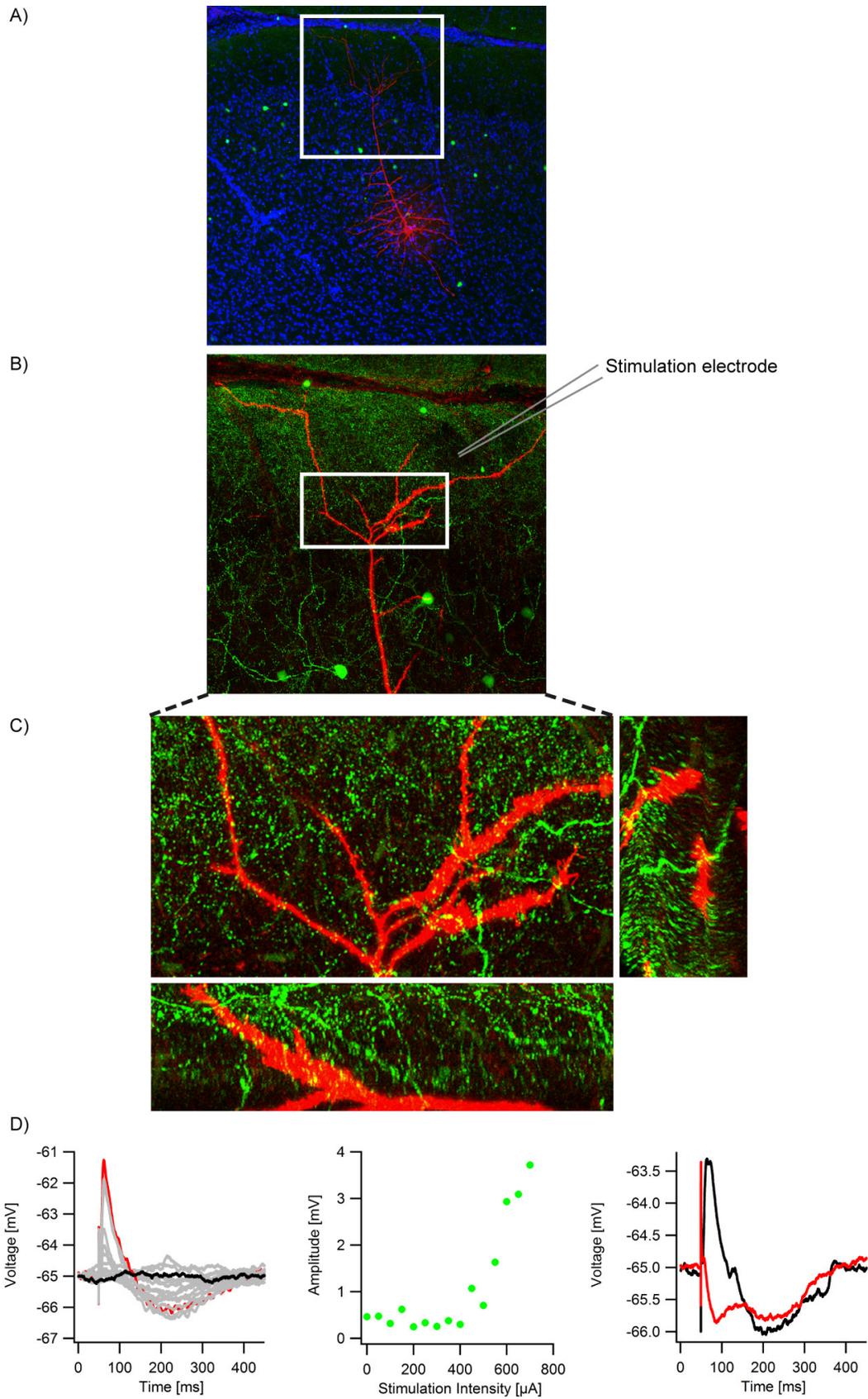


Abb. 9: Elektrische Stimulation in Schicht I löst erregende und hemmende postsynaptische Potenziale in Pyramidenzellen aus. A) Konfokale Übersichtsaufnahme der in (D) abgeleiteten Pyramidenzelle (rot). Das weiße Rechteck zeigt die vergrößerte Aufnahme mit apikalem Dendrit in (B) an. B) Vergrößerte konfokale Aufnahme des apikalen Dendriten mit Platzierung der Stimulationselektrode. Das weiße Rechteck repräsentiert die vergrößerte Aufnahme in (C). (C) Mögliche synaptische Kontaktstellen zwischen SOM-Interneuronen und Pyramidenzelle. Frontale Ansicht links oben, transversale Ansicht rechts oben und sagittale Ansicht links unten. D) *Current-Clamp* Messung der Pyramidenzelle aus A-C. *Input-Output* Analyse nach elektrischer Stimulation in Schicht I mit Einzelantworten (linkes Panel) und als Diagramm, bei dem die Amplitude der postsynaptischen Antwort gegen die Stimulationsstärke aufgetragen ist (mittleres Panel), dargestellt. Nach Hemmung der glutamatergen synaptischen Transmission durch NBQX und D-AP5 bleibt ein zweiphasiges monosynaptisches hemmendes postsynaptisches Potenzial (rechtes Panel) zurück. Schwarz: Kontrollbedingung mit maximaler Stromstärke, rot: nach Applikation von NBQX und D-AP5

Die schon beschriebene laterale Hemmung/*Feedback* Hemmung durch SOM-Interneurone konnten wir im cingulären Cortex bestätigen (Abb. 8). Repetitive Aktionspotenzialentladung in einer Pyramidenzelle bewirkt eine disynaptische Antwort in der Nachbarpyramidenzelle. Außerdem deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass SOM-Interneurone im cingulären Cortex nicht nur an einer lateralen Hemmung/*Feedback* Hemmung, sondern auch an einer *Feedforward*-Hemmung beteiligt sind (Abb. 9).

Zwar ist bekannt, dass SOM-Interneurone bevorzugt die distalen Dendriten von Pyramidenzellen innervieren (Tremblay et al., 2016; Wang et al., 2004; Xu et al., 2013; Marlin et al., 2014; Nigro et al., 2018), *vice versa* ist aber wenig bekannt darüber, ob Pyramidenzellen auch bevorzugt das Soma oder die Dendriten von SOM-Interneuronen innervieren. Dieser Frage gehen wir derzeit nach, indem wir synaptisch gekoppelte Pyramidenzellen und SOM-Interneurone vollständig rekonstruieren und in Zusammenarbeit mit der *Bioimaging Core Facility* die synaptischen Verbindungen zwischen SOM-Interneuronen und Pyramidenzellen untersuchen (Abb. 9, 10). Basierend auf den erhaltenen elektrophysiologischen und morphologischen Daten lassen sich gezielt synaptische Innervationsarten und deren physiologische Funktion modellieren.

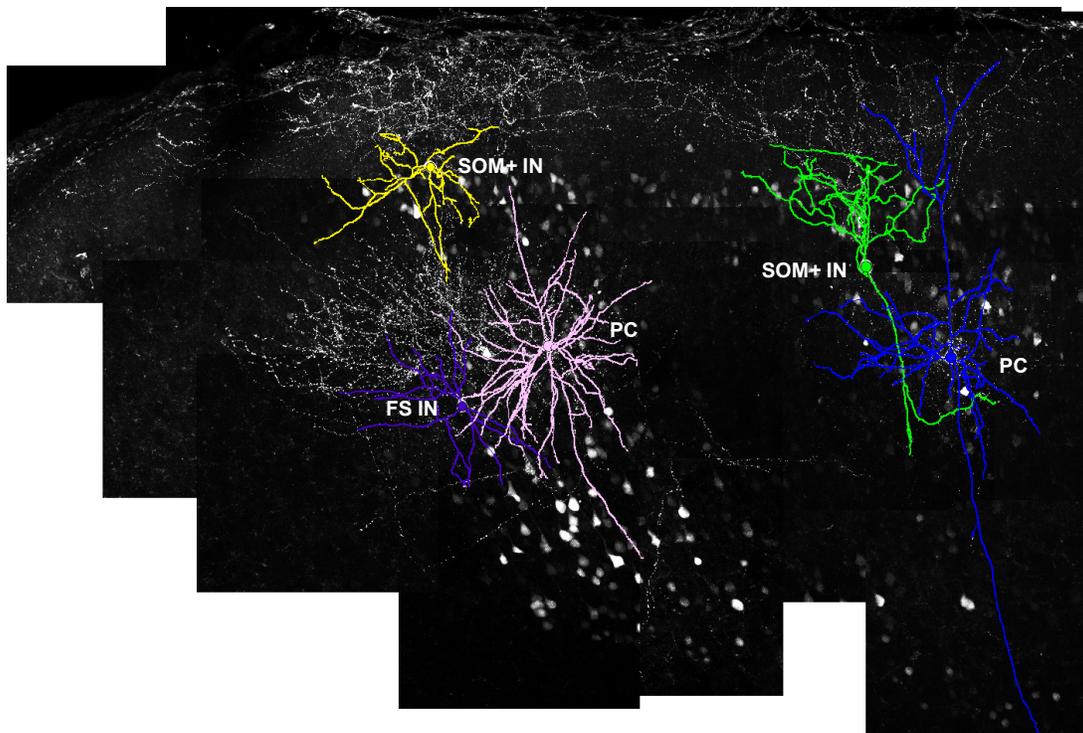


Abb. 10: Zellrekonstruktionen von Pyramidenzellen (rosa und blau), SOM-Interneuronen (gelb und grün) und einem *fast-spiking* Interneuron (lila) im cingulären Cortex. Konfokale *tile-* und *z-stack* Aufnahme von fünf Biocytin-injizierten und abgeleiteten Neuronen aus dem cingulären Cortex mit kompletter Rekonstruktion des Dendritenbaums und unvollständiger Rekonstruktion des Axons.

Die bisherigen Versuche konzentrierten sich auf die physiologische Wirkung von SOM (und NPY) auf Pyramidenzellen im cingulären Cortex. In Zukunft soll die Wirkung dieser Peptide unter pathologischen Bedingungen analysiert werden. Wie unter Kapitel *I.C* beschrieben, deuten einige Studien darauf hin, dass SOM-Interneuronen speziell im cingulären Cortex eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von Befindlichkeitsstörungen (Tripp et al., 2011; Ito-Ishida et al., 2015; Seney et al., 2015) zukommt. Aus diesem Grund soll die Funktion von SOM-Interneuronen und die Schaltkreis-Motive, an denen SOM-Interneurone im cingulären Cortex beteiligt sind, an geeigneten Mausmodellen für Befindlichkeitsstörungen untersucht werden.

Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass dem Neuropeptid Somatostatin und/oder SOM-Interneuronen eine wichtige Rolle bei der Netzwerkkontrolle zukommt. Patienten, die unter bestimmten Epilepsieformen leiden, zeigen veränderte Liquorkonzentrationen an Somatostatin und Frontal- und Temporallappenepilepsien gehen mit einem Verlust an SOM-Interneuronen (Sloviter, 1987; Drexel et al., 2012; Robbins et al., 1991; Strowbridge et al., 1992; Huusko et al., 2013; Xu et al., 2016) einher. In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte gezeigt werden,

dass das Neuropeptid die epileptiforme Aktivität in hippocampalen Neuronen *in vitro* aber auch *in vivo* reduzieren kann (Tallent & Siggins, 1999; Ledri et al., 2015). Außerdem konnte in Epilepsie-Patienten eine Veränderung der vorhandenen Somatostatin-Rezeptoren beobachtet werden (Csaba et al., 2005). Die Tatsache, dass SOM in der Lage ist epileptiforme Aktivität in Pyramidenzellen zu reduzieren, konnten wir ebenfalls im cingulären Cortex beobachten. Hier soll in Zukunft 1) mittels Feldableitungen die Wirkung von SOM, aber auch von NPY auf die epileptiforme Aktivität untersucht werden und 2) die synaptische Transmission zwischen SOM-Interneuron und Pyramidenzelle unter pathologischen Bedingungen analysiert werden.

V. Referenzen

- Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hagman JO, Tafazzoli A, Bunney WE Jr, Jones EG. 1995. Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry*. 52:258-266.
- Allman JM, Hakeem A, Erwin JM, Nimchinsky E, Hof P. The anterior cingulate cortex. 2001. The evolution of an interface between emotion and cognition. *Ann N Y Acad Sci*. 935:107-17.
- Armstrong CM, Gilly WF. 1992. Access resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping. In *Methods in Enzymology*, Vol 207, Ion channels, ed. Rudy B & Iverson LE, pp. 100-122. Academic Press. San Diego.
- Atlan G, Terem A, Peretz-Rivlin N, Groysman M, Citri A. 2017. Mapping synaptic cortico-claustral connectivity in the mouse. *J Comp Neurol*. 525:1381-1402.
- Baleydier C, Mauguiere F. 1980. The duality of the cingulate gyrus in monkey. Neuroanatomical study and functional hypothesis. *Brain*. 103:525-54.
- Banasr M, Lepack A, Fee C, Duric V, Maldonado-Aviles J, DiLeone R, Sibille E, Duman RS, Sanacora G. 2017. Characterization of GABAergic marker expression in the chronic unpredictable stress model of depression. *Chronic Stress (Thousand Oaks)*. 1.
- Benes FM, Berretta S. 2001. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 25:1-27.
- Benes FM, McSparren J, Bird ED, SanGiovanni JP, Vincent SL. 1991. Deficits in small interneurons in prefrontal and cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. *Arch Gen Psychiatry*. 48:996-1001.
- Benes FM, Todtenkopf MS, Kostoulakos P. 2011. GluR5,6,7 subunit immunoreactivity on apical pyramidal cell dendrites in hippocampus of schizophrenics and manic depressives. *Hippocampus*. 11:482-91.
- Benes FM. 1993. Neurobiological investigations in cingulate cortex of schizophrenic brain. *Schizophr Bull*. 19:537-49.
- Bicks LK, Koike H, Akbarian S, Morishita H. 2015. Prefrontal Cortex and Social Cognition in Mouse and Man. *Front Psychol*. 6:1805.
- Bou Farah L, Bowman BR, Bokinić P, Karim S, Le S, Goodchild AK, McMullan S. 2016. Somatostatin in the rat rostral ventrolateral medulla: Origins and mechanism of action. *J Comp Neurol*. 524:323-42.
- Boudin H, Sarret P, Mazella J, Schonbrunn A, Beaudet A. 2000. Somatostatin-induced regulation of SST(2A) receptor expression and cell surface availability in central neurons: role of receptor internalization. *J Neurosci*. 20:5932-9.
- Bünemann M, Brandts B, Pott L. 1996. Downregulation of muscarinic M2 receptors linked to K⁺ current in cultured guinea-pig atrial myocytes. *J Physiol*. 494:351-62.
- Bush G, Vogt BA, Holmes J, Dale AM, Greve D, Jenike MA, Rosen BR. 2002. Dorsal anterior cingulate cortex: a role in reward-based decision making. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:523-8.
- Carter CS, van Veen V. 2007. Anterior cingulate cortex and conflict detection: an update of theory and data. *Cogn Affect Behav Neurosci*. 7:367-79.

- Ciceri G, Dehorter N, Sols I, Huang ZJ, Maravall M, Marín O. 2013. Lineage-specific laminar organization of cortical GABAergic interneurons. *Nat Neurosci.* 16:1199-210.
- Cottam JC, Smith SL, Häusser M. 2013. Target-specific effects of somatostatin-expressing interneurons on neocortical visual processing. *J Neurosci.* 33:19567-78.
- Csaba Z, Pirker S, Lelouvier B, Simon A, Videau C, Epelbaum J, Czech T, Baumgartner C, Sperk G, Dournaud P. 2005. Somatostatin receptor type 2 undergoes plastic changes in the human epileptic dentate gyrus. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64:956-69.
- DeFelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larrañaga P, Anderson S, Burkhalter A, Cauli B, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fitzpatrick D, Freund TF, González-Burgos G, Hestrin S, Hill S, Hof PR, Huang J, Jones EG, Kawaguchi Y, Kisvárdy Z, Kubota Y, Lewis DA, Marín O, Markram H, McBain CJ, Meyer HS, Monyer H, Nelson SB, Rockland K, Rossier J, Rubenstein JL, Rudy B, Scanziani M, Shepherd GM, Sherwood CC, Staiger JF, Tamás G, Thomson A, Wang Y, Yuste R, Ascoli GA. 2013. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat Rev Neurosci* 14:202-216.
- Devinsky O, Morrell MJ, Vogt BA. 1995. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. *Brain.* 118:279-306.
- Drexel M, Kirchmair E, Wieselthaler-Hözl A, Preidt AP, Sperk G. 2012. Somatostatin and neuropeptide Y neurons undergo different plasticity in parahippocampal regions in kainic acid-induced epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 71:312-29.
- Drga R. 2009. Neocortical inhibitory system. *Folia Biol (Praha).* 55:201-17.
- Engin E, Stellbrink J, Treit D, Dickson CT. 2008. Anxiolytic and antidepressant effects of intracerebroventricularly administered somatostatin: behavioral and neurophysiological evidence. *Neuroscience.* 157:666-76.
- Feldmeyer D, Qi G, Emmenegger V, Staiger JF. 2017. Inhibitory interneurons and their circuit motifs in the many layers of the barrel cortex. *Neuroscience.* pii: S0306-4522:30352-4.
- Fillinger C, Yalcin I, Barrot M, Veinante P. 2017. Afferents to anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a' and 24b' in the mouse. *Brain Struct Funct.* 222:1509-1532.
- Fillinger C, Yalcin I, Barrot M, Veinante P. 2018. Efferents of anterior cingulate areas 24a and 24b and midcingulate areas 24a' and 24b' in the mouse. *Brain Struct Funct.* 223:1747-1778.
- Franklin K.B.J., Paxinos G. 2012. The mouse brain in stereotaxic coordinates, 4th edn. *Academic Press.* San Diego.
- Fuchs T, Jefferson SJ, Hooper A, Yee PH, Maguire J, Luscher B. 2017a. Disinhibition of somatostatin-positive GABAergic interneurons results in an anxiolytic and antidepressant-like brain state. *Mol Psychiatry.* 22:920-930.
- Fuchs T, Jefferson SJ, Hooper A, Yee PP, Maguire J, Luscher B. 2017b. Disinhibition of somatostatin-positive interneurons by deletion of postsynaptic GABA(A) receptors. *Mol Psychiatry.* 22:787.
- Gentet LJ, Kremer Y, Taniguchi H, Huang ZJ, Staiger JF, Petersen CC. 2012. Unique functional properties of somatostatin-expressing GABAergic neurons in mouse barrel cortex. *Nat Neurosci.* 15:607-12.
- Golowasch J, Thomas G, Taylor AL, Patel A, Pineda A, Khalil C, Nadim F. 2009. Membrane capacitance measurements revisited: Dependence of capacitance value on measurement method in nonisopotential neurons. *J Neurophysiol* 102, 2161-2175.

- Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A. 2008. Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. *Front Neuroanat.* 1: 3.
- Halabisky B, Shen F, Huguenard JR, Prince DA. 2006. Electrophysiological classification of somatostatin-positive interneurons in mouse sensorimotor cortex. *J Neurophysiol* 96: 834-845.
- Hamani C, Mayberg H, Stone S, Laxton A, Haber S, Lozano AM. 2011. The subcallosal cingulate gyrus in the context of major depression. *Biol Psychiatry.* 69:301-8.
- Hashimoto T, Bazmi HH, Mirnics K, Wu Q, Sampson AR, Lewis DA. 2008. Conserved regional patterns of GABA-related transcript expression in the neocortex of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 165:479-89.
- Hicks GA, Feniuk W, Humphrey PP. 1998. Outward current produced by somatostatin (SRIF) in rat anterior cingulate pyramidal cells in vitro. *Br J Pharmacol.* 124:252-8.
- Hipkin RW, Friedman J, Clark RB, Eppler CM, Schonbrunn A. 1997. Agonist-induced desensitization, internalization, and phosphorylation of the sst2A somatostatin receptor. *J Biol Chem.* 272:13869-76.
- Hoftman GD, Volk DW, Bazmi HH, Li S, Sampson AR, Lewis DA. 2015. Altered cortical expression of GABA-related genes in schizophrenia: illness progression vs developmental disturbance. *Schizophr Bull.* 41:180-91.
- Hu B, Cilz NI, Lei S. 2017. Somatostatin depresses the excitability of subicular bursting cells: Roles of inward rectifier K(+) channels, KCNQ channels and Epac. *Hippocampus.* 27:971-984.
- Hu H, Cavendish JZ, Agmon A. 2013. Not all that glitters is gold: off-target recombination in the somatostatin-IRES-Cre mouse line labels a subset of fast-spiking interneurons. *Front Neural Circuits* 7:195.
- Huusko N, Römer C, Ndoe-Ekane XE, Lukasiuk K, Pitkänen A. 2015. Loss of hippocampal interneurons and epileptogenesis: a comparison of two animal models of acquired epilepsy. *Brain Struct Funct.* 220:153-91.
- Inoue M, Nakajima S, Nakajima Y. 1988. Somatostatin induces an inward rectification in rat locus coeruleus neurones through a pertussis toxin-sensitive mechanism. *J Physiol.* 407:177-98.
- Ito-Ishida A, Ure K, Chen H, Swann JW, Zoghbi HY. 2015. Loss of MeCP2 in Parvalbumin- and Somatostatin-Expressing Neurons in Mice Leads to Distinct Rett Syndrome-like Phenotypes. *Neuron.* 88:651-8.
- Jhang J, Lee H, Kang MS, Lee HS, Park H, Han JH. 2018. Anterior cingulate cortex and its input to the basolateral amygdala control innate fear response. *Nat Commun.* 9:2744.
- Jiang X, Shen S, Cadwell CR, Berens P, Sinz F, Ecker AS, Patel S, Tolias AS. 2015. Principles of connectivity among morphologically defined cell types in adult neocortex. *Science.* 350:aac9462.
- Kapfer C, Glickfeld LL, Atallah BV, Scanziani M. 2007. Supralinear increase of recurrent inhibition during sparse activity in the somatosensory cortex. *Nat Neurosci.* 10:743-53. Erratum in: *Nat Neurosci.* 2007. 10:1073.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. 1996. Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci* 16: 2701-2715.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. 1997. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex.* 7: 476-486.

- Kawaguchi Y, Kubota Y. 1993. Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindin D28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J Neurophysiol.* 70:387-96.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. 1998. Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience.* 85:677-701.
- Kawaguchi Y, Kubota Y. 1996. Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex. *J Neurosci.* 16:2701-15.
- Kawaguchi Y. 1993. Groupings of nonpyramidal and pyramidal cells with specific physiological and morphological characteristics in rat frontal cortex. *J Neurophysiol.* 69:416-31.
- Kovoor A, Henry DJ, Chavkin C. 1995. Agonist-induced desensitization of the mu opioid receptor-coupled potassium channel (GIRK1). *J Biol Chem.* 270:589-95.
- Kubota Y, Shigematsu N, Karube F, Sekigawa A, Kato S, Yamaguchi N, Hirai Y, Morishima M, Kawaguchi Y. 2011. Selective coexpression of multiple chemical markers defines discrete populations of neocortical GABAergic neurons. *Cereb Cortex* 21:1803-1817.
- Kunishio K, Haber SN. 1994. Primate cingulostriatal projection: limbic striatal versus sensorimotor striatal input. *J Comp Neurol.* 350:337-56.
- Lavin C, Melis C, Mikulan E, Gelormini C, Huepe D, Ibañez A. 2013. The anterior cingulate cortex: an integrative hub for human socially-driven interactions. *Front Neurosci.* 7:64.
- Ledri M, Sørensen AT, Madsen MG, Christiansen SH, Ledri LN, Cifra A, Bengzon J, Lindberg E, Pinborg LH, Jespersen B, Gøtzsche CR, Woldbye DP, Andersson M, Kokaia M. 2015. Differential Effect of Neuropeptides on Excitatory Synaptic Transmission in Human Epileptic Hippocampus. *J Neurosci.* 35:9622-31.
- Lee S, Hjerling-Leffler J, Zagha E, Fishell G, Rudy B. 2010. The largest group of superficial neocortical GABAergic interneurons expresses ionotropic serotonin receptors. *J Neurosci.* 30:16796-808.
- Lehmann A, Kliewer A, Schütz D, Nagel F, Stumm R, Schulz S. 2014. Carboxyl-terminal multi-site phosphorylation regulates internalization and desensitization of the human sst2 somatostatin receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 387:44-51.
- Lelouvier B, Tamagno G, Kaindl AM, Roland A, Lelievre V, Le Verche V, Loudes C, Gressens P, Faivre-Baumann A, Lenkei Z, Dournaud P. 2008. Dynamics of somatostatin type 2A receptor cargoes in living hippocampal neurons. *J Neurosci.* 28:4336-49.
- Lewis DA, Curley AA, Glausier JR, Volk DW. 2012. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends Neurosci.* 35:57-67.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. 2005. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci.* 6:312-24.
- Liu Q, Bee MS, Schonbrunn A. 2009. Site specificity of agonist and second messenger-activated kinases for somatostatin receptor subtype 2A (Sst2A) phosphorylation. *Mol Pharmacol.* 76:68-80.
- Liu Q, Dewi DA, Liu W, Bee MS, Schonbrunn A. 2008. Distinct phosphorylation sites in the SST2A somatostatin receptor control internalization, desensitization, and arrestin binding. *Mol Pharmacol.* 73:292-304.
- Lucas SJ, Armstrong DL. 2015. Protein phosphatase modulation of somatostatin receptor signaling in the mouse hippocampus. *Neuropharmacology.* 99:232-41.

- Ma Y, Hu H, Berrebi AS, Mathers PH, Agmon A. 2006. Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. *J Neurosci* 26:5069-5082.
- Magistretti J, Mantegazza M, de Curtis M, Wanke E. 1998. Modalities of distortion of physiological voltage signals by patch-clamp amplifiers: a modeling study. *Biophys J.* 74:831-42.
- Magistretti J, Mantegazza M, Guatteo E, Wanke E. 1996. Action potentials recorded with patch-clamp amplifiers: are they genuine? *Trends Neurosci.* 19:530-4.
- Marín O. 2012. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci.* 13:107-20.
- Marín-Padilla M. 1990. The pyramidal cell and its local-circuit interneurons: a hypothetical unit of the Mammalian cerebral cortex. *J Cogn Neurosci.* 2:180-94.
- Markram H, Muller E, Ramaswamy S, Reimann MW, Abdellah M, Sanchez CA, Ailamaki A, Alonso-Nanclares L, Antille N, Arsever S, Kahou GA, Berger TK, Bilgili A, Buncic N, Chalimourda A, Chindemi G, Courcol JD, Delalondre F, Delattre V, Druckmann S, Dumusc R, Dynes J, Eilemann S, Gal E, Gevaert ME, Ghobril JP, Gidon A, Graham JW, Gupta A, Haenel V, Hay E, Heinis T, Hernando JB, Hines M, Kanari L, Keller D, Kenyon J, Khazen G, Kim Y, King JG, Kisvarday Z, Kumbhar P, Lasserre S, Le Bé JV, Magalhães BR, Merchán-Pérez A, Meystre J, Morrice BR, Muller J, Muñoz-Céspedes A, Muralidhar S, Muthurasa K, Nachbaur D, Newton TH, Nolte M, Ovcharenko A, Palacios J, Pastor L, Perin R, Ranjan R, Riachi I, Rodríguez JR, Riquelme JL, Rössert C, Sfyakis K, Shi Y, Shillcock JC, Silberberg G, Silva R, Tauheed F, Telefont M, Toledo-Rodriguez M, Tränkler T, Van Geit W, Díaz JV, Walker R, Wang Y, Zaninetta SM, DeFelipe J, Hill SL, Segev I, Schürmann F. 2015. Reconstruction and Simulation of Neocortical Microcircuitry. *Cell.* 163:456-92.
- Marlin JJ, Carter AG. 2014. GABA-A receptor inhibition of local calcium signaling in spines and dendrites. *J Neurosci.* 34:15898-911.
- Marty A, Neher E. 1995. Tight-seal whole-cell recording. In *Single channel recording*, 2nd edn, ed. Sakmann B & Neher E, pp 31-52, Plenum Press, NewYork and London.
- McDonald A.J., Muller J.F., Mascagni F. 2002. GABAergic innervation of alpha type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase immunoreactive pyramidal neurons in the rat basolateral amygdala. *J Comp Neurol.* 446:199-218.
- McGarry LM, Packer AM, Fino E, Nikolenko V, Sippy T, Yuste R. 2010. Quantitative classification of somatostatin-positive neocortical interneurons identifies three interneuron subtypes. *Front Neural Circuits* 4: 12.
- Meis S, Munsch T, Sosulina L, Pape HC. 2007. Postsynaptic mechanisms underlying responsiveness of amygdaloid neurons to cholecystokinin are mediated by a transient receptor potential-like current. *Mol Cell Neurosci.* 35:356-67.
- Moy SS, Nadler JJ, Perez A, Barbaro RP, Johns JM, Magnuson TR, Piven J, Crawley JN. 2004. Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic like behavior in mice. *Genes Brain Behav.* 3:287-302.
- Müller-Preuss P, Jürgens U. 1976. Projections from the 'cingular' vocalization area in the squirrel monkey. *Brain Res.* 103:29-43.
- Nácher V, Hassani SA, Womelsdorf T. 2019. Asymmetric effective connectivity between primate anterior cingulate and lateral prefrontal cortex revealed by electrical microstimulation. *Brain Struct Funct.* 224:779-793.
- Nassar M, Simonnet J, Lofredi R, Cohen I, Savary E, Yanagawa Y, Miles R, Fricker D. 2015. Diversity and overlap of parvalbumin and somatostatin expressing interneurons in mouse presubiculum. *Front Neural Circuits.* 9:20.

- Nigro MJ, Hashikawa-Yamasaki Y, Rudy B. 2018. Diversity and Connectivity of Layer 5 Somatostatin-Expressing Interneurons in the Mouse Barrel Cortex. *J Neurosci.* 38:1622-1633.
- Nimchinsky EA, Hof PR, Young WG, Morrison JH. 1996. Neurochemical, morphologic, and laminar characterization of cortical projection neurons in the cingulate motor areas of the macaque monkey. *J Comp Neurol.* 374:136-60.
- Obermayer J, Heistek TS, Kerkhofs A, Goriounova NA, Kroon T, Baayen JC, Idema S, Testa-Silva G, Couey JJ, Mansvelder HD. 2018. Lateral inhibition by Martinotti interneurons is facilitated by cholinergic inputs in human and mouse neocortex. *Nat Commun.* 9:4101.
- Oliva AA, Jr., Jiang M, Lam T, Smith KL, Swann JW. 2000. Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *J Neurosci* 20:3354-3368.
- Palomero-Gallagher N, Vogt BA, Schleicher A, Mayberg HS, Zilles K. 2009. Receptor architecture of human cingulate cortex: evaluation of the four-region neurobiological model. *Hum Brain Mapp.* 30:2336-55.
- Papez JW. 1937. A proposed mechanism of emotion. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1995. 7:103-12.
- Park MR, Kita H, Klee MR, Oomura Y. 1983. Bridge balance in intracellular recording: introduction of the phase-sensitive method. *J Neurosci Meth* 8, 105-125.
- Paus T, Castro-Alamancos MA, Petrides M. 2001. Cortico-cortical connectivity of the human mid-dorsolateral frontal cortex and its modulation by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Eur J Neurosci.* 14:1405-11.
- Paus T. Primate anterior cingulate cortex: where motor control, drive and cognition interface. *Nat Rev Neurosci.* 2001 2:417-24.
- Perrenoud Q, Geoffroy H, Gauthier B, Rancillac A, Alfonis F, Kessarlis N, Rossier J, Vitalis T, Gallopin T. 2012. Characterization of Type I and Type II nNOS-expressing interneurons in the barrel cortex of mouse. *Front Neural Circuits* 6: 36
- Petilla Interneuron Nomenclature Group, Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A, Buzsáki G, Cauli B, Defelipe J, Fairén A, Feldmeyer D, Fishell G, Fregnac Y, Freund TF, Gardner D, Gardner EP, Goldberg JH, Helmstaedter M, Hestrin S, Karube F, Kisvárdy ZF, Lambolez B, Lewis DA, Marin O, Markram H, Muñoz A, Packer A, Petersen CC, Rockland KS, Rossier J, Rudy B, Somogyi P, Staiger JF, Tamas G, Thomson AM, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, West DC, Yuste R. 2008. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 9: 557-568.
- Phan KL, Wager T, Taylor SF, Liberzon I. 2002. Functional neuroanatomy of emotion: a meta-analysis of emotion activation studies in PET and fMRI. *Neuroimage.* 16:331-48.
- Pittman QJ, Siggins GR. 1981. Somatostatin hyperpolarizes hippocampal pyramidal cells in vitro. *Brain Res.* 221:402-8.
- Presky DH, Schonbrunn A. 1988. Somatostatin pretreatment increases the number of somatostatin receptors in GH4C1 pituitary cells and does not reduce cellular responsiveness to somatostatin. *J Biol Chem.* 263:714-21.
- Qadir H, Krimmel SR, Mu C, Pouloupoulos A, Seminowicz DA, Mathur BN. 2018. Structural Connectivity of the Anterior Cingulate Cortex, Claustrum, and the Anterior Insula of the Mouse. *Front Neuroanat.* 12:100.

- Rajasethupathy P, Sankaran S, Marshel JH, Kim CK, Ferenczi E, Lee SY, Berndt A, Ramakrishnan C, Jaffe A, Lo M, Liston C, Deisseroth K. 2015. Projections from neocortex mediate top-down control of memory retrieval. *Nature*. 526:653-9.
- Riedemann S, Sutor B, Bergami M, Riedemann T. 2019. Gad1-promotor-driven GFP expression in non-GABAergic neurons of the nucleus endopiriformis in a transgenic mouse line. *J Comp Neurol*. 527:2215-2232.
- Riedemann T, Polder HR, Sutor B. 2016. Determination and compensation of series resistances during whole-cell patch-clamp recordings using an active bridge circuit and the phase-sensitive technique. *Pflugers Arch*. 468:1725-40.
- Riedemann T, Schmitz C, Sutor B. 2016. Immunocytochemical heterogeneity of somatostatin-expressing GABAergic interneurons in layers II and III of the mouse cingulate cortex: A combined immunofluorescence/design-based stereologic study. *J Comp Neurol*. 524:2281-99.
- Riedemann T, Straub T, Sutor B. 2018. Two types of somatostatin-expressing GABAergic interneurons in the superficial layers of the mouse cingulate cortex. *PLoS One*. 13:e0200567
- Riedemann T, Sutor B. 2019. Long-lasting actions of somatostatin on pyramidal cell excitability in the mouse cingulate cortex. *Neurosci Lett*. 698:217-223.
- Riedemann T. 2019. Diversity and Function of Somatostatin-Expressing Interneurons in the Cerebral Cortex. *Int J Mol Sci*. 20. pii: E2952.
- Robbins RJ, Brines ML, Kim JH, Adrian T, de Lanerolle N, Welsh S, Spencer DD. 1991. A selective loss of somatostatin in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Ann Neurol*. 29:325-32.
- Robinson KE, Pearson MM, Cannistraci CJ, Anderson AW, Kuttesch JF, Wymer K, Smith SE, Compas BE. 2014. Neuroimaging of executive function in survivors of pediatric brain tumors and healthy controls. *Neuropsychology*. 28:791-800.
- Rotheneichner P., Belles M., Benedetti B., König R., Dannehl D., Kreutzer C., Zaunmair P., Engelhardt M., Aigner L., Nacher J., Couillard-Despres S. 2018. Cellular Plasticity in the Adult Murine Piriform Cortex: Continuous Maturation of Dormant Precursors Into Excitatory Neurons. *Cereb Cortex*, 28:2610-2621.
- Rudebeck PH, Walton ME, Millette BH, Shirley E, Rushworth MF, Bannerman DM. 2007. Distinct contributions of frontal areas to emotion and social behaviour in the rat. *Eur J Neurosci*. 26:2315-26.
- Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J. 2011. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol*. 71:45-61.
- Seney ML, Tripp A, McCune S, Lewis DA, Sibille E. 2015. Lamina and cellular analyses of reduced somatostatin gene expression in the subgenual anterior cingulate cortex in major depression. *Neurobiol Dis* 73:213-219.
- Shackman AJ, Salomons TV, Slagter HA, Fox AS, Winter JJ, Davidson RJ. 2011. The integration of negative affect, pain and cognitive control in the cingulate cortex. *Nat Rev Neurosci*. 12:154-67.
- Sharma KK, Kelly EA, Pfeifer CW, Fudge JL. 2019. Translating Fear Circuitry: Amygdala Projections to Subgenual and Perigenual Anterior Cingulate in the Macaque. *Cereb Cortex*. pii: bhz106.
- Shyu BC, Sikes RW, Vogt LJ, Vogt BA. 2010. Nociceptive processing by anterior cingulate pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 103:3287-301.

- Shyu BC, Vogt BA. 2009. Short-term synaptic plasticity in the nociceptive thalamic-anterior cingulate pathway. *Mol Pain*. 5:51.
- Sibille E, Morris HM, Kota RS, Lewis DA. 2011. GABA-related transcripts in the dorsolateral prefrontal cortex in mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol* 14: 721-734.
- Sigworth FJ. 1995. Electronic design of the patch clamp. In *Single channel recording*, 2nd edn, ed. Sakmann B & Neher E, pp 95-128, Plenum Press, NewYork and London.
- Silberberg G, Markram H. 2007. Disynaptic inhibition between neocortical pyramidal cells mediated by Martinotti cells. *Neuron*. 53:735-46.
- Sloviter RS. 1987. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science*. 235:73-6.
- Stevens FL, Hurley RA, Taber KH. 2011. Anterior cingulate cortex: unique role in cognition and emotion. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 23:121-5.
- Stroh T, Jackson AC, Dal Farra C, Schonbrunn A, Vincent JP, Beaudet A. 2000. Receptor-mediated internalization of somatostatin in rat cortical and hippocampal neurons. *Synapse*. 38:177-86.
- Strowbridge BW, Bean AJ, Spencer DD, Roth RH, Shepherd GM, Robbins RJ. 1992. Low levels of somatostatin-like immunoreactivity in neocortex resected from presumed seizure foci in epileptic patients. *Brain Res*. 587:164-8.
- Sutor B, Grimm C, Polder HR. 2003. Voltage-clamp-controlled current-clamp recordings from neurons: an electrophysiological technique enabling the detection of fast potential changes at preset holding potentials. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 446, 133-141.
- Tallent MK, Siggins GR. 1999. Somatostatin acts in CA1 and CA3 to reduce hippocampal epileptiform activity. *J Neurophysiol*. 81:1626-35.
- Tan Z, Hu H, Huang ZJ, Agmon A. 2008. Robust but delayed thalamocortical activation of dendritic-targeting inhibitory interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:2187-92.
- Taniguchi H, He M, Wu P, Kim S, Paik R, Sugino K, Kvitsiani D, Fu Y, Lu J, Lin Y, Miyoshi G, Shima Y, Fishell G, Nelson SB, Huang ZJ. 2011. A resource of Cre driver lines for genetic targeting of GABAergic neurons in cerebral cortex. *Neuron*. 71:995-1013. Erratum in: *Neuron*. 2011 72:1091. Kvitsiani, Duda [corrected to Kvitsiani, Duda].
- Tannenbaum GS, Turner J, Guo F, Videau C, Epelbaum J, Beaudet A. 2001. Homologous upregulation of sst2 somatostatin receptor expression in the rat arcuate nucleus in vivo. *Neuroendocrinology*. 74:33-42.
- Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, Levi B, Gray LT, Sorensen SA, Dolbeare T, Bertagnolli D, Goldy J, Shapovalova N, Parry S, Lee C, Smith K, Bernard A, Madisen L, Sunkin SM, Hawrylycz M, Koch C, Zeng H. 2016. Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat Neurosci*. 19:335-46.
- Tasic B, Yao Z, Graybuck LT, Smith KA, Nguyen TN, Bertagnolli D, Goldy J, Garren E, Economo MN, Viswanathan S, Penn O, Bakken T, Menon V, Miller J, Fong O, Hirokawa KE, Lathia K, Rimorin C, Tieu M, Larsen R, Casper T, Barkan E, Kroll M, Parry S, Shapovalova NV, Hirschstein D, Pendergraft J, Sullivan HA, Kim TK, Szafer A, Dee N, Groblewski P, Wickersham I, Cetin A, Harris JA, Levi BP, Sunkin SM, Madisen L, Daigle TL, Looger L, Bernard A, Phillips J, Lein E, Hawrylycz M, Svoboda K, Jones AR, Koch C, Zeng H. 2018. Shared and distinct transcriptomic cell types across neocortical areas. *Nature*. 563:72-78.

- Todtenkopf MS, Benes FM. 1998. Distribution of glutamate decarboxylase 65 immunoreactive puncta on pyramidal and nonpyramidal neurons in hippocampus of schizophrenic brain. *Synapse*. 29:323-32.
- Tremblay R, Lee S, Rudy B. 2016. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron*. 91:260-92.
- Tripp A, Kota RS, Lewis DA, Sibille E. 2011. Reduced somatostatin in subgenual anterior cingulate cortex in major depression. *Neurobiol Dis* 42: 116-124.
- Tulipano G, Schulz S. 2007. Novel insights in somatostatin receptor physiology. *Eur J Endocrinol*. 156 Suppl 1:S3-11. Erratum in: *Eur J Endocrinol*. 2007 157:543.
- van Aerde KI, Feldmeyer D. 2015. Morphological and physiological characterization of pyramidal neuron subtypes in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. 25:788-805.
- Vogt BA, Miller MW. 1983. Cortical connections between rat cingulate cortex and visual, motor, and postsubicular cortices. *J Comp Neurol* 216: 192-210.
- Vogt BA, Rosene DL, Pandya DN. 1979. Thalamic and cortical afferents differentiate anterior from posterior cingulate cortex in the monkey. *Science*. 204:205-7.
- Vogt BA. 2005. Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nat Rev Neurosci*. 6:533-44.
- Wang L, Hosakere M, Trein JC, Miller A, Ratnanather JT, Barch DM, Thompson PA, Qiu A, Gado MH, Miller MI, Csernansky JG. 2007. Abnormalities of cingulate gyrus neuroanatomy in schizophrenia. *Schizophr Res* 93: 66-78.
- Wang Q, Ng L, Harris JA, Feng D, Li Y, Royall JJ, Oh SW, Bernard A, Sunkin SM, Koch C, Zeng H. 2017. Organization of the connections between claustrum and cortex in the mouse. *J Comp Neurol*. 525:1317-1346.
- Wang X., Zhang C., Szábo G., Sun Q.Q. 2013. Distribution of CaMKII α expression in the brain in vivo, studied by CaMKII α -GFP mice. *Brain Research*, 1518:9-25.
- Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J, Markram H. 2004. Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. *J Physiol* 561: 65-90.
- Watakabe A., Ohsawa S., Ichinohe N., Rockland K.S., Yamamori T. 2014. Characterization of claustral neurons by comparative gene expression profiling and dye-injection analyses. *Front Syst Neurosc*. 8:98.
- White MG, Panicker M, Mu C, Carter AM, Roberts BM, Dharmasri PA, Mathur BN. 2018. Anterior Cingulate Cortex Input to the Claustrum Is Required for Top-Down Action Control. *Cell Rep*. 22:84-95.
- Xu H, Jeong HY, Tremblay R, Rudy B. 2013. Neocortical somatostatin-expressing GABAergic interneurons disinhibit the thalamorecipient layer 4. *Neuron*. 77:155-67.
- Xu X, Guo F, Cai X, Yang J, Zhao J, Min D, Wang Q, Hao L, Cai J. 2016. Aberrant changes of somatostatin and neuropeptide Y in brain of a genetic rat model for epilepsy: tremor rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 76:165-75.
- Xu X, Roby KD, Callaway EM. 2010. Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. *J Comp Neurol* 518: 389-404.

Xu X., Roby KD and Callaway EM. 2006. Mouse cortical inhibitory neuron type that coexpresses somatostatin and calretinin. *J Comp Neurol* 499: 144-160.

Yeterian EH, Van Hoesen GW. 1978. Cortico-striate projections in the rhesus monkey: the organization of certain cortico-caudate connections. *Brain Res.* 139:43-63.

Zhang S, Xu M, Chang WC, Ma C, Hoang Do JP, Jeong D, Lei T, Fan JL, Dan Y. 2016. Organization of long-range inputs and outputs of frontal cortex for top-down control. *Nat Neurosci.* 19:1733-1742.

Zhao S, Ting JT, Atallah HE, Qiu L, Tan J, Gloss B, Augustine GJ, Deisseroth K, Luo M, Graybiel AM, Feng G. 2011. Cell type-specific channelrhodopsin-2 transgenic mice for optogenetic dissection of neural circuitry function. *Nat Methods* 8: 745-752.

Zhou X, Rickmann M, Hafner G, Staiger JF. 2017. Subcellular Targeting of VIP Boutons in Mouse Barrel Cortex is Layer-Dependent and not Restricted to Interneurons. *Cereb Cortex.* 27:5353-5368.

Zingg B, Dong HW, Tao HW, Zhang LI. 2018. Input-output organization of the mouse claustrum. *J Comp Neurol.* 526:2428-2443.

VI. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	GABAerge Interneurone lassen sich in drei nicht-überlappende neurochemische Klassen einteilen.	6
Abb. 2:	Schematische Abbildung der postsynaptischen Innervationsdichte von PV- (blau, PV+ IN), SOM- (rot, SOM+ IN) und 5-HT _{3A} R-Interneuronen (grün, 5-HT3A+ IN) an Pyramidenzellen (schwarz).	7
Abb. 3:	Intracorticale synaptische Verbindungen zwischen SOM-Interneuronen (rot) und Pyramidenzellen (schwarz) und zwischen SOM-Interneuronen und anderen GABAergen Interneuronen (blau, gelb) in Schicht II/III des agranulären anterioren cingulären Cortex.	9
Abb. 4:	Bestimmung der <i>cutoff</i> -Frequenzen.	18
Abb. 5:	Subcorticale GFP ⁺ Neurone sind im <i>Nucleus endopiriformis</i> lokalisiert.	23
Abb. 6:	Konnektivität zwischen dem cingulären Cortex und dem endopiriformen-claustralen Complex.	25
Abb. 7:	Somatodendritische Variabilität in SOM-Interneuronen.	32
Abb. 8:	SOM-Interneurone sind an einer disynaptischen Hemmung/ <i>Feedback</i> Hemmung beteiligt.	39
Abb. 9:	Elektrische Stimulation in Schicht I löst erregende und hemmende postsynaptische Potenziale in Pyramidenzellen aus.	40
Abb. 10:	Zellrekonstruktionen von Pyramidenzellen (rosa und blau), SOM-Interneuronen (gelb und grün) und einem <i>fast-spiking</i> Interneuron (lila) im cingulären Cortex.	42

VII. Verzeichnis eigener Publikationen

A) Originalarbeiten als Erstautor

Nr.	Autoren/Titel/Zeitschrift/Jahr/Band/Seitenzahlen	Impact Factor
1	Riedemann T , Sutor B. Long-lasting actions of somatostatin on pyramidal cell excitability in the mouse cingulate cortex. <i>Neurosci Lett.</i> 2019, 698:217-223.	2.2
2	Riedemann T , Straub T, Sutor B. Two types of somatostatin-expressing GABAergic interneurons in the superficial layers of the mouse cingulate cortex. <i>PLoSOne</i> , 2018, 13: e0200567.	2.8
3	Riedemann T , Polder HR, Sutor B. Determination and compensation of series resistances during whole-cell patch-clamp recordings using a bridge circuit and the phase-sensitive technique. <i>Eur J Physiol</i> 2016, 468:1725-1740.	2.8
4	Riedemann T , Schmitz C, Sutor B. Immunocytochemical heterogeneity of somatostatin-expressing GABAergic interneurons in layers II and III of the mouse cingulate cortex: A combined immunofluorescence/design-based stereologic study. <i>J Comp Neurol.</i> 2016, 524:2281-2299.	3.3

B) Originalarbeiten als Letztautor

Nr.	Autoren/Titel/Zeitschrift/Jahr/Band/Seitenzahlen	Impact Factor
1	Riedemann S, Sutor B, Bergami M, Riedemann T . Gad1-promotor-driven GFP expression in non-GABAergic neurons of the nucleus endopiriformis in a transgenic mouse <i>J Comp Neurol.</i> 2019, 527:2215-2232.	3.3

C) Coautorenschaften

Nr.	Autoren/Titel/Zeitschrift/Jahr/Band/Seitenzahlen	Impact Factor
1	Karow M, Gray Camp J, FalkS, GerberT, PataskarA, Gac-Santel M, Kageyama J, Brazovskaja A, Garding A, Fan W, Riedemann T , Casamassa A, Smiyakin A, Schichor C, Götz M, Tiwari VK, Treutlein B, Berninger B. Direct pericyte-to-neuron reprogramming via unfolding of a neural stem cell-like program. <i>Nat Neurosci.</i> , 2018, 21:932-940.	19.2
2	Follwaczny P, Schieweck R, Riedemann T , Demleitner A, Straub T, Klemm AH, Bilban M, Sutor B, Popper B, Kiebler MA. Deficiency of the RNA-binding protein Pumilio2 determines predisposition for epilepsy in mice, <i>Dis. Model Mech.</i> , 2017, 10:1333-1342.	4.0
3	Robel S, Buckingham SC, Boni JL, Campbell SL, Danbolt NC, Riedemann T , Sutor B, Sontheimer H. Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures. <i>J Neurosci.</i> 2015; 35:3330-45.	6.1
4	Denter DG, Heck N, Riedemann T , White R, Kilb W, Luhmann HJ. GABAC receptors	3.2

are functionally expressed in the intermediate zone and regulate radial migration in the embryonic mouse neocortex. *Neuroscience*. 2010; 167:124-34.

- 5 Heck N, Golbs A, **Riedemann T**, Sun JJ, Lessmann V, Luhmann HJ. Activity-dependent regulation of neuronal apoptosis in neonatal mouse cerebral cortex. *Cereb Cortex*. 2008; 18:1335-49. 6.3
- 6 Sotiropoulos I, Catania C, **Riedemann T**, Fry JP, Breen KC, Michaelidis TM, Almeida OF. Glucocorticoids trigger Alzheimer disease-like pathobiochemistry in rat neuronal cells expressing human tau. *J Neurochem*. 2008; 107:385-97. 4.9

D) Übersichtsartikel

Nr.	Autoren/Titel/Zeitschrift/Jahr/Band/Seitenzahlen	Impact Factor
1	Riedemann T . Diversity and Function of Somatostatin-expressing interneurons in the cerebral cortex . <i>Int J Mol Sci</i> . 2019, 20. pii: E2952.	4.2
2	Riedemann T , Patchev AV, Cho K, Almeida OF. Corticosteroids: way upstream. <i>Mol Brain</i> . 2010; 3:2.	4.1

VIII. Curriculum Vitae

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

ANHANG

Verzeichnis der Anhänge

- A.1** Determination and compensation of series resistances during whole-cell patch-clamp recordings using a bridge circuit and the phase-sensitive technique
- A.2** Gad1-promotor-driven GFP expression in non-GABAergic neurons of the nucleus endopiriformis in a transgenic mouse
- A.3** Immunocytochemical heterogeneity of somatostatin-expressing GABAergic interneurons in layers II and III of the mouse cingulate cortex: A combined immunofluorescence/design-based stereologic study
- A.4** Two types of somatostatin-expressing GABAergic interneurons in the superficial layers of the mouse cingulate cortex
- A.5** Diversity and Function of Somatostatin-expressing interneurons in the cerebral cortex
- A.6** Long-lasting actions of somatostatin on pyramidal cell excitability in the mouse cingulate cortex