

Aus dem Institut für Klinische Neurowissenschaften und
Medizinische Psychologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Alfons Schnitzler

Optogenetische Untersuchung von medialen präfrontalen
Afferenzen der subthalamischen Region bei der
Entscheidungsfindung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Carla Heikenfeld

2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Alfons Schnitzler

Zweitgutachterin: Prof. Charlotte von Gall

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Heikenfeld C., Mederos S., Chen C., Korotkova T., Schnitzler A., Ponomarenko A., (2020), *Prefrontal – subthalamic pathway supports action selection in a spatial working memory task. Scientific Reports*, (2020 Jun 26;10(1):10497)

Zusammenfassung

Es liegen anatomische Erkenntnisse vor, dass die subthalamische Region (ST), die den *Nucleus subthalamicus* (STN) und die *Zona incerta* (ZI) umfasst, Projektionen des medialen präfrontalen Kortex (mPFC) erhält und eine wichtige Rolle bei adaptivem Verhalten spielt. Klinische Studien weisen darauf hin, dass der STN an der Entscheidungsfindung beteiligt ist, da an Parkinson erkrankte Patienten während einer therapeutischen Tiefen Hirnstimulation des STN eine veränderte Dynamik des Entscheidungsfindens in Bezug auf Konfliktfragen aufweisen. Sowohl mPFC als auch die ZI sind bei exekutiven Prozessen involviert. Die neuronalen Schaltkreise des konfliktgeladenen Entscheidungsfindens sind jedoch unerforscht. Im Vordergrund dieser Arbeit steht die Verhaltensfunktion des mPFC-ST-Schaltkreises und dessen Bezug zu struktureller und funktioneller Konnektivität zwischen den beiden Regionen. Diese wurden mittels optogenetischer, mikroskopischer und elektrophysiologischer Methoden bei Mäusen analysiert.

Bestandteil der Versuche waren Mäuse (eNPAC2.0 n= 8, YFP-Kontrolle n= 10). Zur Untersuchung der Entscheidungsfindung der Mäuse, wurden ein *T-maze* und ein erhöhtes *plus maze* verwendet. In diesen Modellen wurden die Mäuse dem Konflikt zwischen Neugier und Angst ausgesetzt und mussten eine adaptiv-relevante Entscheidung treffen. Durch Optogenetik können genetisch modifizierte Zellen, die lichtempfindliche Kanäle oder Pumpen exprimieren, hypo- oder depolarisiert werden. Dieser Vorteil wird eingesetzt, um bestimmte Neurone in ihren Verschaltungen zu steuern. Ein adenoassoziiertes Virus ermöglicht die Expressierung des dualen Channelrhodopsin-YFP-Halorhodopsin Konstrukts (eNPAC2.0) oder des fluoreszierenden Proteins YFP in Neuronen. Unter der Kontrolle des Synapsin-Promotors wurde das virale Konstrukt in einer ersten Operation exprimiert. In einer zweiten Operation wurden die optischen Fasern und zusätzlich in fünf Tieren (n= 5), multikanale Mikroelektroden in mPFC und/oder ST, implantiert, um lokale Feldpotentiale ableiten zu können.

Die konfokale Bildgebung wies daraufhin, dass bei Mäusen ein wesentlicher Teil der mPFC-Fasern separat vom medialen Vorderhirnbündel innerhalb der *Pedunculi cerebri* (CP) läuft. Viele Fasern der CP verlaufen zum STN und ZI, sodass die Axone visualisiert werden konnten. Die Ableitungen lokaler Feldpotentiale zeigten ein *cross-frequency coupling* (CFC). Dies bedeutet, dass in bestimmten Phasen der langsamen Oszillationen (hier Theta, 5-10 Hz), schnellere Oszillationen (Gamma, 60-90 Hz) eingenistet sind. Eine optogenetische Intervention mit diesem Koordinationsmuster hat eine korrekte Entscheidungsfindung im *T-maze* stark beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu zeigten die Mäuse im *elevated plus maze* lediglich eine Tendenz zu längeren Entscheidungszeiten, wobei die optogenetisch gehemmte Gruppe weder ängstlicher, neugieriger noch aktiver war, als die Kontrollgruppe. Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Projektionen von mPFC zu ST und insbesondere die CFC Aktivität an dem Prozess der Arbeitsgedächtnis gestützten Entscheidungsfindung beteiligt sind.

Abstract

According to the latest anatomical findings the subthalamic region (ST), consisting of *Nucleus subthalamicus* (STN) and *Zona incerta* (ZI), receives inputs from the medial prefrontal Cortex (mPFC) and has a leading role in adaptive behaviour. Clinical studies have shown that STN plays a role in decision-making. Parkinson's diseased patients show a change in the dynamic of decision-making in high-conflict situations during therapeutic deep brain stimulation of STN. ZI as well as mPFC are both involved in executive processes. However the neuronal circuit during decision-making are yet unknown and remain unexplored. The main goal of this work is to clarify the functions of the mPFC-ST-circuit considering behaviour and its functional and structural connectivity between these regions.

During the study mice were used (eNPAC n= 8, YFP control n= 10). T-maze and elevated plus maze have been used to examine decision-making. During the tasks the animals have been exposed to different conflicts. In the elevated plus maze the animals were put in a conflict between novelty seeking related behaviour and anxiety, during the other task spatial working memory and decision-making was checked. Using optogenetics, it is possible that genetically modified cells express channels or pumps, which lead to a hyper- or depolarization of the cell by light-activation. This tool is used to manipulate activity of neurons and of their projections. An adeno-associative virus enables the expression of the dual construct Channelrhodopsin-YFP-Halorhodopsin (eNPAC2.0) or the fluorescent protein YFP for the control group. Neurons were targeted using the Synapsin promotor. During first surgery the viral construct has been injected. In the second surgery optic fibres and, in additional five mice (n= 5), multichannel electrodes for local field potential (LFP) recordings have been implanted in mPFC and/or ST.

The confocal images have shown that a substantial part of the mPFC projections run separately from the medial forebrain bundle in the cerebral peduncles (CP). Many mPFC fibres within CP terminated in STN and ZI. The LFP recordings showed cross-frequency coupling. This indicates that faster oscillations (gamma, 60-90 Hz) were entrained at a frequency of slow oscillations (here theta, 4-10 Hz). An optogenetic intervention with this coordination pattern had a strong influence on decision-making in the T-maze, leading to a worse performance of the mice expressing eNPAC2.0. On the contrary the mice did not show any effect of anxiety-related behaviours in the elevated plus maze. In comparison the optogenetic inhibited group did not show changes in anxiety or motor activity.

Altogether our results implicate mPFC projections to ST, and cross-frequency coupling between the regions, in spatial working memory-based decision-making.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
Hz	Hertz
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
kΩ	Kiloohm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μs	Mikrosekunden
MΩ	Megaohm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ms	Millisekunde
mW	Milliwatt
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
Ω	Ohm
s	Sekunden
Ca ²⁺	Calcium
ChR2	Channelrhodopsin-2
CP	<i>Pedunculi cerebri</i>
CPd	<i>Pedunculi cerebri</i> dorsal
DV	distal-ventral
EEG	Elektroenzephalographie
eNPAC2.0	AAV-hSyn-NpHR-TS-p2A-hChR2(H134R)-EYFP, AAV-hSyn-NpHR-TS-p2A-hChR2(H134R)-EYFP
EPM	<i>elevated plus maze</i>
EPSP	exzitatorische postsynaptische Potential
f	<i>Fornix cerebri</i>
GABA	γ-Aminobuttersäure

GFP	grün fluoreszierendes Protein
G_{max}/G_{min}	maximale/minimale Gammaoszillationspeaks
GPe	<i>Globus pallidus externus</i>
GPI	<i>Globus pallidus internus</i>
hChR2	humanes Channelrhodopsin-2
ii	inkorrekt inkorrekt
IPSP	inhibitorische postsynaptische Potential
LED	Leuchtdiode
LFP	lokales Feldpotential
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
ML	medial-lateral
mPFC	mediale präfrontale Kortex
mt	<i>mamillothalamic tract</i>
n	Menge der Tiere
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NpHR	Halorhodopsin
p	p-Wert, Signifikanzwert
PAC	<i>phase-amplitude coupling</i>
PPC	<i>phase-phase coupling</i>
pSTN	<i>Nucleus parasubthalamicus</i>
Q	Modulationskoeffizient
r	Koeffizient für die angepasste Sinusfunktion
SEM	<i>standard error of mean</i>
SN	<i>Substantia nigra</i>
SNC	<i>Substantia nigra Pars compacta</i>
SNr	<i>Substantia nigra Pars reticulata</i>
ST	Subthalamische Region
STN	<i>Nucleus subthalamicus</i>
THS	Tiefe Hirnstimulation
YFP	gelb fluoreszierendes Protein
ZI	<i>Zona incerta</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Verschaltungsschleife der Basalganglien...	7
Abbildung 2: Mittel und Funktion Optogenetik: ChR2 und Halorhodopsin	17
Abbildung 3: Aufbau des injizierten viralen Vektors eNPAC2.0	18
Abbildung 4: Elektrode.....	22
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Operation für LFP-Aufnahmen.....	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Lage der Wolframdrähte	24
Abbildung 7: Versuchsablauf	25
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Lokalisationsortes der Injektion in den mPFC	26
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Operation für die optogenetische Manipulation	30
Abbildung 10: Schematische Darstellung für die Operation der Implantation der optischen Fasern und Elektrode	31
Abbildung 11: Ablauf Durchgang <i>T-maze</i>	33
Abbildung 12: Grafisches Modell des EPM	34
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Versuches.....	35
Abbildung 14: Präfrontal-subthalamische Projektionen 1	40
Abbildung 15: Präfrontal-subthalamische Projektionen 2.....	40
Abbildung 16: Lokalisation der implantierten optischen Fasern.....	41
Abbildung 17: Lokalisation der implantierten Elektroden in der ST	41
Abbildung 18: Optogenetische Manipulation des mPFC-ST Schaltkreises beeinflusst die Leistung im <i>T-maze</i>	43
Abbildung 19: Beispielhafte Trajektorien einer Maus während Aktivierung und Inhibition im <i>T-maze</i>	44
Abbildung 20: Optogenetische Manipulation des mPFC-ST Schaltkreises mindert nicht die Leistung im EPM	45
Abbildung 21: Repräsentative Trajektorien einer Maus während Erregung und Inhibition im EPM	46
Abbildung 22: Rhythmische Koordination von mPFC und ST	47

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Subthalamische Region.....	2
1.1.1	<i>Nucleus subthalamicus</i>	2
1.1.2	<i>Zona incerta</i>	4
1.2	Aufbau und Funktion der Basalganglien.....	5
1.3	Medialer präfrontal Kortex	8
1.4	Elektrophysiologie	10
1.4.1	Lokale Feldpotential	10
1.4.2	Oszillationen	11
1.5	Frequenz-Kopplung.....	13
1.6	Optogenetik.....	15
1.7	Zielsetzung	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Allgemein.....	20
2.1.1	Aufbau einer multikanalen Elektrode.....	21
2.1.2	Aufbau einer optischen Faser	22
2.2	Versuch 1 - Lokales Feldpotential	23
2.3	Versuch 2 - Optogenetik	24
2.3.1	Virusinjektion	25
2.3.2	Protokoll zur Vorbereitung der Pumpe und Ablauf der Injektion	26
2.3.3	Implantation der optischen Faser.....	29
2.4	Versuch 3 - Optogenetische Manipulation und Ableitung des LFP	30
2.5	Datengewinnung	31
2.5.1	Handhabung.....	31
2.5.2	Set-Ups für experimentelle Aufgaben	31
2.5.3	Optogenetische Manipulation.....	34
2.5.4	Datenerfassung.....	36
2.6	Histologie und Mikroskopie.....	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Histologie	39
3.2	Ergebnisse <i>T-maze</i>	41
3.3	Ergebnisse <i>elevated plus maze</i>	44
3.4	Ergebnisse Elektrophysiologie.....	46

4	Diskussion und Schlussfolgerung.....	49
4.1	Methodische Anmerkungen	50
4.2	Der mPFC-ST Schaltkreis bei der Entscheidungsfindung und LFP	52
4.3	mPFC-ST Schaltkreis bei Angstverhalten	55
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	56
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	58

1 Einleitung

Das Gehirn ist ein großes Netzwerk, welches ca. 100 Milliarden Neuronen enthält und mit diesen Projektionen verbunden ist. Die Projektionen können kürzer oder auch länger sein und sich zu Gruppen formieren, welche unter anderem funktionell im Zusammenhang stehen können (Schnitzler und Gross 2005). Dafür ist eine Kommunikation der Neuronenpopulationen untereinander notwendig. Als Form der Kommunikation nutzen Neurone Oszillationen (wiederkehrende Schwingungen gleicher Frequenzen), die lokal und/oder synchronisiert mit anderen Bereichen stattfinden können (Schnitzler und Gross 2005). So können Areale, die örtlich nicht direkt in Verbindung stehen, miteinander kommunizieren. Kommunikation ist unerlässlich für Entscheidungsfindung. Adaptive Entscheidungen basieren auf einer strengen Koordination von kognitiven, affektiven und motorischen Prozessen, die aufeinander abgestimmt sind.

Es liegen anatomische Erkenntnisse dahingegen vor, dass zwei Regionen des Gehirnes, der medial präfrontale Kortex (mPFC) und die subthalamische Region (ST) über Projektionen miteinander verbunden sind (Kita *et al.*, 2014). Die genaue Funktion dieser Projektionen ist bislang ungeklärt.

Klinische Studien, insbesondere in Bezug auf die Tiefen Hirnstimulation bei an Parkinson erkrankten Patienten zeigen, dass der *Nucleus subthalamicus* (Bestandteil der subthalamischen Region) eine Aufgabe in der Entscheidungsfindung innehat, da eine veränderte Dynamik im Treffen der Entscheidung während der Stimulation auftritt (Frank *et al.*, 2007).

Der neuronale Schaltkreis von dem mPFC zur subthalamischen Region mit seinen elektrophysiologischen Abläufen ist Fokus dieser Arbeit und soll anhand von Tierversuchen mit Mäusen erläutert werden. Somit stehen die anatomischen Strukturen mit ihren Projektionen und die Kommunikation, die Oszillation, bei der Entscheidungsfindung im Vordergrund.

In dieser Arbeit wurden elektrophysiologische Ableitungen und optogenetische Manipulationen der Projektionen von dem mPFC zur subthalamischen Region kombiniert, während sich die Mäuse in zwei verschiedenen Experimenten befanden.

1.1 Subthalamische Region

Der *Nucleus subthalamicus* (STN) und die *Zona incerta* (ZI) sind zwei Hauptbestandteile des Subthalamus, der auch ventraler Thalamus genannt wird (Kita *et al.*, 2014). Sowohl der STN als auch die ZI erhalten viele Projektionen des *Cortex cerebri* (Kita *et al.*, 2014). Großflächige Projektionen vom medialen präfrontalen Kortex zur ventromedialen subthalamischen Region wurden in Erwägung gezogen, Teil des Schaltkreises der Basalganglien zu sein (Alexander *et al.*, 1986).

Die Projektionen vom frontalen *Cortex cerebri* weisen eine großflächige Organisation im Subthalamus auf (Kita *et al.*, 2014). Der *Nucleus subthalamicus* und die ZI weisen unterschiedliche Funktionen auf und werden im Folgenden näher erläutert.

1.1.1 *Nucleus subthalamicus*

Der paarig angelegte, bikonvexe Kern wurde erstmals von Jules Bernard Luys beschrieben (1865) und wird heute noch *Corpus luyysi* genannt (Kocabicak *et al.*, 2012). Anatomisch liegt dieser Kern im ventralen Bereich des *Diencephalons* und dorsomedial zum Hirnstiel (*Tegmentum mesencephali*) (Kita *et al.*, 2014). Der *Nucleus subthalamicus* (STN) enthält von verschiedenen Bereichen des *Cortex cerebri* Afferenzen. Anhand der verarbeiteten Informationen ist der Kern (STN) in drei unterschiedliche Gebiete einteilbar. Im ventralen Bereich werden vorwiegend die limbischen, im medialen die assoziativen und im dorsalen Bereich die motorischen Informationen verarbeitet (Krack *et al.*, 2010). Die Anzahl der Neurone im STN variieren von Spezies zu Spezies zwischen ca. 25.000 in Ratten und ca. 560.000 im Menschen (Hardman *et al.*, 2002).

Der *Nucleus subthalamicus* ist ein funktioneller Bestandteil der Basalganglien. Der Kern ist in Schaltkreise zur Modulation von kortikalen Afferenzen eingelagert. Dem STN wird eine Schlüsselaufgabe für die exzitatorische, glutamaterge Funktion in einem allgemein inhibierenden System zugeschrieben (Maurice *et al.*, 1999; Gradinaru *et al.*, 2009).

In den letzten Jahren hat sich herausgestellt, dass der STN nicht nur eine motorische Funktion im Verschaltungskreislauf der Basalganglien ausübt, sondern auch eine nicht motorische Funktion. Studien im Bereich der Tiefen Hirnstimulation haben zu dieser Erkenntnis beigetragen (Herz *et al.*, 2018). Es lagen sowohl Veränderungen der motorischen Fähigkeiten als auch Veränderungen im kognitiven Bereich von stimulierten

Patienten vor (Zavala *et al.*, 2015). Den effektivsten Implantationsort für Elektroden der Tiefen Hirnstimulation (THS) bietet STN für an Parkinson erkrankte Patienten (Lanciego *et al.*, 2012).

***Nucleus subthalamicus* und Entscheidungsfindung**

Zu beobachtende Nebeneffekte der Tiefen Hirnstimulation (Romito *et al.*, 2002) haben zu Hypothesen geführt, dass der STN, über die motorische Funktion hinaus, an weiteren Aufgaben beteiligt ist und Teilnahme an der Inhibierung von Aktionen und Auswahlmöglichkeiten haben kann (Zavala *et al.*, 2015). In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass an Parkinson erkrankte Patienten mit der THS unterschiedlich schnelle Reaktionszeiten zeigen, je nachdem, ob die Aufgabe einen hohen oder niedrigen Konfliktwert aufgewiesen hat. Patienten mit aktiver THS zeigten eine kürzere Reaktionszeit für die Entscheidungsfindung bei hohen Konfliktfragen im Gegensatz zu der Kontrollgruppe. Diese erreichten ebenfalls mehr Fehler. Das lässt vermuten, dass die THS eine impulsive Reaktion der Patienten induziert (Frank *et al.*, 2007).

Zur Aufrechterhaltung der Balance von Geschwindigkeit und Genauigkeit der weitergeleiteten Informationen während des Entscheidungstreffens, ist eine spezifische Anpassung der Antwortschwelle für jede Aufgabe bzw. jede „gestellte“ Frage notwendig (Herz *et al.*, 2018). Eine Pause im kortiko-basalen System wird eingeleitet, um eine kontrollierte und genaue Antwort weiterleiten zu können. Diese Funktion wird dem STN zugeschrieben und es scheint, dass die THS mit dieser Funktion interferiert (Herz *et al.*, 2018).

Ebenfalls wurde in einer Studie mit Nagern gezeigt, dass weitere Bestandteile der Basalganglien, dem *Striatum* und dem *Globus pallidus*, eine wichtige Rolle in der Selektion von Aktionen zugeschrieben werden können (Stephenson-Jones *et al.*, 2016; Nonomura *et al.*, 2018).

Afferenzen und Efferenzen des *Nucleus subthalamicus*

Der *Nucleus subthalamicus* erhält glutamaterge Afferenzen vom *Cortex cerebri*, präfrontalem Kortex und von den *Colliculi superiores* (Steiner und Tseng 2016). Die motorischen kortikalen Afferenzen ziehen zu der dorsalen und lateralen Region des STN.

Im Gegensatz dazu gelangen Inputs aus limbischen und assoziativen Regionen des *Cortex cerebri* zur medialen Region des STN (Monakow *et al.*, 1978). Ebenfalls enthält der STN viele GABAerge Afferenzen über den indirekten Weg der Basalganglien vom *Globus pallidus externus* (Parent und Hazrati 1995; Abdi *et al.*, 2015), Thalamus (Féger *et al.*, 1994), dopaminerge Projektionen der *Substantia nigra* (François *et al.*, 2000) und andere kleinere Afferenzen des Hirnstammes weisen ebenfalls Projektionen zu STN auf (Canteras *et al.*, 1990). Die Afferenzen, die über den hyperdirekten Weg vom *Cortex cerebri* zu dem STN gelangen, haben in ihrer Verschaltung eine kurze Latenzzeit und werden am schnellsten verschaltet. Deshalb trägt dieser Weg den Namen „hyperdirekt“ (Wilson und Bevan 2011).

Der STN hat viele Efferenzen im kortiko-basal ganglio-thalamisch-kortikalen System (Kita und Kitai 1987). Wechselseitig sind ebenfalls die meisten Efferenzen von dem STN mit dem GPe verbunden (Parent und Hazrati 1995). Der verbleibende Anteil wird von dem *Globus pallidus internus* (GPi), der *Substantia nigra Pars reticulata* (SNr), dem *Cortex cerebri* und dem *Striatum* ausgemacht (Smith *et al.*, 1990, Parent und Hazrati 1995). Neurine des *Nucleus subthalamicus* formen asymmetrische Verbindungen zu den Dendriten der Zielneurone (Shink *et al.*, 1996).

1.1.2 *Zona incerta*

Die schalenförmig aufgebaute *Zona incerta* (ZI) des *Diencephalons* wurde erstmals im Jahre 1877 von Auguste Forel beschrieben (Mitrofanis 2005). Sie liegt dorsal des *Nucleus subthalamicus*, kaudal des Thalamus und erstreckt sich im gesamten Subthalamus (Kita *et al.*, 2014). Eine ventrale ist von einer dorsalen Zone unterscheidbar (Mitrofanis 2005). Die *Zona incerta* wird „*Zone of uncertainty*“, demnach „ungewisse Zone“ genannt, da die Region viele unbeantwortete Fragen aufweist (Mitrofanis 2005).

Aufgrund der vielen Projektionen werden der ZI verschiedene physiologische Funktionen zugeschrieben. So spielt die ZI beispielsweise eine Rolle bei sexueller Erregung (Shaw und Mitrofanis 2002), Aufmerksamkeit (Nicolelis *et al.*, 1992), Abwehrverhalten (Chou *et al.*, 2018) und Fortbewegung (Périer *et al.*, 2002).

Studienergebnisse zeigen, dass die ZI (kaudaler Bereich) ebenfalls einen effektiven Stimulationsort für an Parkinson erkrankte Patienten darstellt, insbesondere für Patienten

die an Tremor leiden (Blomstedt *et al.*, 2012). Zusätzlich wurde in Parkinson-induzierten Ratten eine gesteigerte Aktivität der ZI festgestellt (Blomstedt *et al.*, 2012).

Afferenzen und Efferenzen der *Zona incerta*

Zu den meisten neuronalen Arealen des Gehirns weist die ZI großflächige Konnektivität auf (*Cortex cerebri*, *Medulla spinalis*, *Tegmentum mesencephali* und *Diencephalon*), sodass vielfältige Funktionen zustande kommen (Mitrofanis 2005). Besonders die Projektionen mit der gesamten neurologischen Achse vom *Cortex cerebri* bis zur *Medulla spinalis* stechen hervor (Nicolelis *et al.*, 1992). Viele Afferenzen erhält die ZI von den gleichen kortikalen Arealen wie der STN. Die Areale sind jedoch weitflächiger als die von dem STN (Kita *et al.*, 2014). Von verschiedenen Kerngebieten des Hirnstammes erhält die ZI ebenfalls Afferenzen (Mitrofanis 2005). Der mediale präfrontale Kortex innerviert ebenfalls die *Zona incerta*, besonders den rostralen Bereich (Chou *et al.*, 2018).

Efferenzen ziehen von der ZI zum *Isocortex* (Lin *et al.*, 1990), zum Thalamus und beispielweise zu den Basalganglien (Mitrofanis 2005). Bei den Basalganglien erhalten vor allem die *Substantia nigra* und der *Globus pallidus* die Efferenzen (Heise und Mitrofanis 2004). Die meisten der letzten genannten Projektionen verwenden Glutamat als Transmitter (Heise und Mitrofanis 2004).

1.2 Aufbau und Funktion der Basalganglien

Die Basalganglien sind eine funktionelle Gruppe von Kerngebieten, die sich in verschiedenen Gehirnabschnitten befinden. Sie liegen unterhalb des *Cortex cerebri* und sind mit diesem in der sogenannten Basalganglienschleife verknüpft. Sie stehen demnach anatomisch und funktionell in Verbindung und sind maßgeblich an der Kontrolle motorischer Ereignisse beteiligt. Sie erhalten Impulse des *Cortex cerebri* (Afferenzen/Inputs), verarbeiten bzw. integrieren diese und senden die modulierten Signale an entsprechende Regionen zurück. Diese werden Efferenzen bzw. Outputs genannt. Die meisten Afferenzen und Efferenzen stehen im engen Zusammenhang mit den spezifischen Gehirnregionen. Für das Zustandekommen von zielgerichtetem Verhalten bzw. Ausführung willkürlicher Motorik oder auch Affektverhalten, sind die Basalganglien zuständig (Erik Schulte *et al.*, 2018). Zusätzlich werden auch Areale des

Gehirns, die für die Planung von Augenbewegung, autonomen Funktionen und Bewegungen, die mit der Orientierung zu tun haben, angesteuert (Steiner und Tseng 2016). Den Basalganglien wird allgemein eine hemmende Funktion zugeschrieben (Purves *et al.*, 2001). Ihre Funktion besteht in der Selektion der Afferenzen des *Cortex cerebri*, um diejenigen, die in dem Moment wichtig für beispielweise Abläufe sind, zuzulassen und die übrigen zu inhibieren.

Verschaltungswege der Basalganglien

Die oben genannten Kerngebiete sind in einem Verschaltungssystem eingelagert und dienen der Modellierung eines Impulses. In diesem Zusammenhang muss eine weitere Gehirnregion erläutert werden, der Thalamus. Dieser ist ein Kerngebiet im *Diencephalon*, bei dem die modulierten Impulse „zwischenverschaltet“ werden, bevor diese zurück zum *Cortex cerebri* gelangen. Im Thalamus findet die Integration der Impulse von den Basalganglien, Sinnesorganen und dem *Cerebellum* statt. Der thalamische Impuls führt im *Cortex cerebri* zu einem „fertigen“ und detailliertem Bewegungsprogramm (Schulte *et al.*, 2018).

Den größten Eingang zu diesem System bildet das *Striatum*. Es enthält die größten Afferenzen des *Cortex cerebri* (Steiner und Tseng 2016).

Es gibt drei parallel verlaufende Verschaltungswege der Basalganglien (Abb. 1), den direkten, indirekten und hyperdirekten Weg (Bosch *et al.*, 2012). Der direkte und indirekte Weg haben eine gemeinsame Anfangsstrecke über das *Striatum* (Purves *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu hat der hyperdirekte Weg als Eingang den STN (Bosch *et al.*, 2012). Der direkte Weg kann auch monosynaptischer Weg genannt werden (DeLong und Wichmann 2007), da dieser vom *Striatum* mit GABAergen Neuronen mit Substanz P zu dem GPi und der SNr verläuft (Nambu *et al.*, 2000). Im Vergleich dazu ist der indirekte Weg auf andere Neurone im *Striatum* zurückzuführen (Neurone mit Enkephalin) und hat als Zwischenstation den GPe und den STN, bevor dann die letzten Verschaltungen in den GPi und der SNr stattfinden. Deshalb wird auch bei Letzterem von dem polysynaptischen Weg gesprochen.

Diese Wege haben gegensätzliche Effekte auf die angesteuerten Kerngebiete im Thalamus, sind jedoch beide simultan an der Kontrolle von generierter Bewegung beteiligt. Die ambivalente Wirkung kommt dadurch zustande, dass der direkte Weg im

Allgemein die Aktivität des GPi und der SNr hemmt und der indirekte Weg die Aktivität des GPi und der SNr fördert (Nambu *et al.*, 2000). Folglich führt die direkte Verschaltung zu einer Erregung der Aktivität des Thalamus und der indirekte Weg führt zu einer Hemmung des Thalamus.

Der hyperdirekte Weg, auch kortiko-subthalamischer-(pallidaler) Weg genannt, ist der aktuellst beschriebene Weg (Nambu *et al.*, 2000). Dieser umgeht das *Striatum* und es liegt eine direkte Verbindung vom *Cortex cerebri* zu dem STN vor. Mittels diesen Weges werden stark exzitatorische Effekte von motorisch-relevanten Arealen des *Cortex cerebri* schneller vermittelt als über den klassischen Weg über das *Striatum* (Nambu *et al.*, 2002).

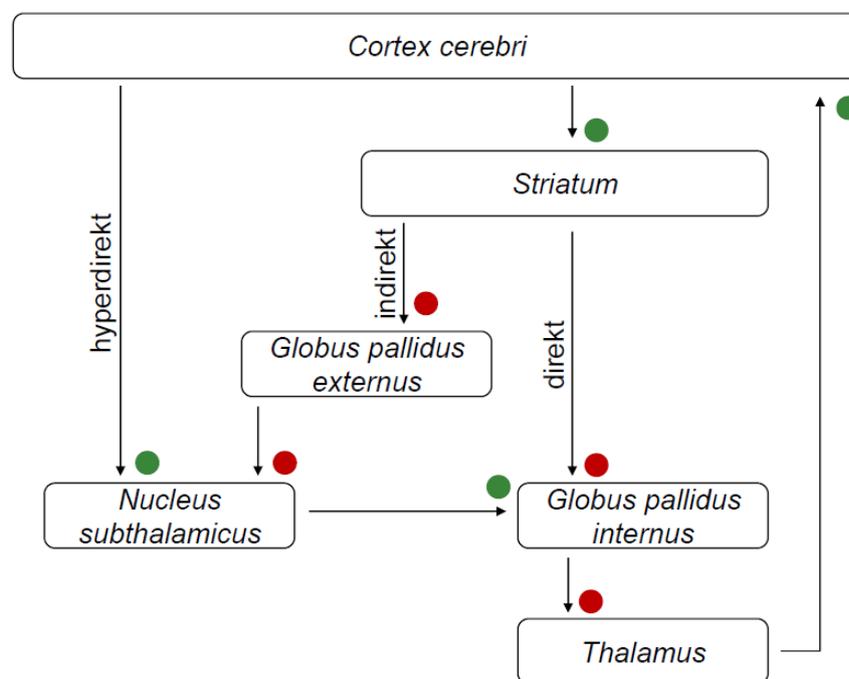


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der Verschaltungsschleife der Basalganglien

Dargestellt sind vereinfacht der direkte, indirekte und hyperdirekte Weg mit seinen inhibitorischen (rot) und exzitatorischen (grün) Einflüssen (in Anlehnung an Zavala *et al.* 2015).

Fehlfunktion der Basalganglien

Bei einer Fehlfunktion der Basalganglien im Gehirn kommt es zu Störungen im Bewegungsablauf. Repräsentativ steht hierfür *Morbus Parkinson*. *Morbus Parkinson*, beschrieben durch James Parkinson 1817 (DeMaagd und Philip 2015), ist eine neurodegenerative Erkrankung und wird durch die klinischen Symptome der Parkinson-Trias Rigor, Tremor und Akinesie charakterisiert. Diese Trias ist in den letzten Jahren

zusätzlich durch nicht motorische Symptome wie Schlafprobleme oder Depressionen (DeMaagd und Philip 2015) erweitert worden.

Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch degenerative Dopamin produzierende Zellen in der *Substantia nigra*. Als Folge kommt es zum Mangel des Botenstoffes Dopamin. Ein verstärkter, inhibierender Output der Basalganglien liegt vor, sodass Bewegungsstörungen die Folge sind (Triarhou 2013).

Eine Behandlungsindikation für die fortgeschrittene Parkinson-Erkrankung kann die chronische Tiefe Hirnstimulation darstellen (Schnitzler und Gross 2005). Hierbei werden Tiefe Hirnstimulationselektroden in den *Nucleus subthalamicus* implantiert und über einen ebenfalls implantierten Neurostimulator gesteuert. Der Erfolg der THS ist stark frequenzabhängig (McConnell *et al.*, 2012). Die Stimulation des STN mit hoher Frequenz > 90 Hz hat sich als effektive Behandlung der Parkinson Erkrankung erwiesen (Gradinaru *et al.*, 2009).

1.3 Medialer präfrontal Kortex

Der mediale präfrontale Kortex umfasst fast ein Drittel des gesamten *Isocortex* (Fuster 2002). Dieser nahm evolutionsbedingt an Größe zu und entwickelte bzw. vergrößerte sich zeitgleich mit der Zunahme von sensorischen Arealen. Dies führte zu der Erkenntnis, dass im präfrontalen Kortex sensorische Ereignisse bzw. Informationen verarbeitet werden müssen (Kolb *et al.*, 2012).

Der präfrontale Kortex kann in drei Areale eingeteilt werden: den medialen präfrontalen Kortex, den orbitalen präfrontalen Kortex und den lateralen präfrontalen Kortex (Ongür und Price 2000). Alle Anteile enthalten den typischen sechsschichtigen Aufbau des *Isocortex*. Die granuläre vierte Schicht, Körnerzellschicht, ist im Menschen sehr ausgeprägt und spricht für eine gute Entwicklung des *Cortex cerebri*. Nagern fehlt die vierte Schicht im Aufbau des *Cortex cerebri* (Leonard 1969).

Der mediale präfrontale Kortex wird mit diversen Aufgaben assoziiert. Im Vordergrund steht die Prozessbeteiligung am Arbeitsgedächtnis (Hong *et al.*, 2018), der Aufmerksamkeit und der Bewegung, die Modulation der viszeromotorischen Aktivitäten (Heidbreder und Groenewegen 2003) sowie die Entscheidungsfindung (Hoover und

Vertes 2007). In der Entstehung des Kurzzeit- und Langzeitgedächtnisses spielt der mPFC ebenfalls eine wichtige Rolle (Takashima *et al.*, 2006, Corcoran und Quirk 2007). Differenziert auf die verschiedenen Regionen des medialen präfrontalen Kortex wird hervorgehoben, dass der ventromediale Bereich an der Ausführung und Kontrolle von Emotionen und instinktivem Handeln sowie viszeromotorischen Aktivitäten beteiligt ist. Der laterale präfrontale Kortex ist jedoch an exekutiven Aufgaben, wie zielorientiertem Handeln in Bezug auf Verhalten, Denken und Sprache maßgeblich involviert (Fuster 2002). Dem prälimbischen und infralimbischen Bereich wird Zeit-Reaktions-Verhalten zugeschrieben (Heidbreder und Groenewegen 2003).

Afferenzen und Efferenzen des mPFC

Die höchste Interkonnektivität weist der mPFC vor allem mit anderen kortikalen und subkortikalen Regionen auf (Wang *et al.*, 2006). Die ventral gelegenen Bereiche des mPFC weisen starke Verbindungen zu höher assoziierten und limbischen kortikalen Bereichen auf. Im Gegensatz dazu zeigen die dorsalen Bereiche des mPFC eine stärkere Verbindung zu sensorischen und motorischen kortikalen Regionen (Heidbreder und Groenewegen 2003). Ebenfalls sind Bereiche wie die Amygdala (Krettek und Price 1977) reziprok (Heidbreder und Groenewegen 2003) mit dem mPFC verbunden. Eine hohe Anzahl an Afferenzen enthält der mPFC von den vorderen zwei Dritteln des *Hippocampus* (Burton *et al.*, 2009). Die Verbindung des mPFC mit dem *Hippocampus* ist jedoch weniger reziprok verschaltet (Heidbreder und Groenewegen 2003). Ebenfalls weisen *Striatum* (Berendse *et al.*, 1992), Thalamus (Vertes 2002), Hypothalamus (Hoover und Vertes 2007) und verschiedene Kerngebiete des Hirnstamms (Sesack *et al.*, 1989) enge Verbindungen auf.

mPFC und Entscheidungsfindung

Der mediale präfrontale Kortex ist mit vielen Gehirnregionen verbunden, die an der Lang- und Kurzzeit-Gedächtnisbildung (Takashima *et al.*, 2006, Corcoran und Quirk 2007), oder dem Erlernen von Antworten auf emotionale Fragen, beteiligt sind (Euston *et al.*, 2012). Diese Regionen führen dazu, dass die Funktionen im Bereich der Entscheidungsfindung sehr weit ausgeprägt sind.

Eine Studie hat gezeigt, dass eine erhöhte Aktivität im medialen präfrontalen Kortex und im *Striatum* sichtbar wurde, wenn den Probanden (Menschen) verschiedene Geldsummen nach einem spezifischen zeitlichen Intervall angeboten wurden (Euston *et al.*, 2012). Dieses Phänomen impliziert, dass der mPFC an der Entscheidungsfindung beteiligt ist. Zusätzlich konnte die Aktivität in einem abgeleiteten Neuron gesteigert werden, indem eine Ratte in einen Raum platziert wurde und nach zwei Sekunden Wartezeit an einer anderen Stelle eine Belohnung platziert wurde. In dieser Wartezeit liegt eine erhöhte Aktivität von einem Neuron im mPFC vor (Euston *et al.*, 2012). Elektrophysiologische Ableitungen haben gezeigt, dass sich das Muster des lokalen Feldpotentials der Neuronen nicht nur aufgrund der Bewegung ändert, sondern vor allem, wenn Nager (in diesem Fall Ratten) vor einer Aufgabe stehen und eine Entscheidung treffen müssen (Warden *et al.*, 2012).

Gerade die Entscheidungen, welche mit einem Ziel in Zusammenhang stehen, werden im medialen präfrontalen Kortex verarbeitet. Im Gegensatz dazu sollen Entscheidungen, die mit Selbstkontrolle zu tun haben, im lateralen präfrontalen Kortex verarbeitet werden (Hare *et al.*, 2009).

1.4 Elektrophysiologie

1.4.1 Lokale Feldpotential

Das lokale Feldpotential repräsentiert die Summe elektrischer Felder, die von individuellen Neuronen generiert werden. Es ist das Produkt von synchronisierten Ionenströmen lokaler benachbarter Neuronen (Kühn *et al.*, 2005). Neurone werden durch ankommende postsynaptische Signale an ihren Dendriten aktiviert oder inhibiert, abhängig von exzitatorischen oder inhibitorischen Signalen. Folglich kommt es entlang der Membran zu einem Ionenstrom (Rainer 2014). Die Membran dient im Normalfall als elektrischer Isolator (Eccles 1951). Im Falle eines Aktionspotentials kommt es zum Einstrom von Natriumionen über einen spannungsabhängigen Kanal, der zur schnellen Depolarisation der Zelle führt. Ob die Depolarisation zur Generierung eines Aktionspotentials reicht, ist abhängig von einem Schwellenwert. Das Aktionspotential der Präsynapse führt zur Freisetzung eines Neurotransmitters in den synaptischen Spalt, sodass die Postsynapse und somit ein weiteres Neuron aktiviert wird (Millhorn *et al.*, 1989).

Die Repolarisation wird durch einen positiven Kaliumausstrom aus der Zelle erreicht. Das Membranpotential von -70 mV bricht durch die Depolarisation zusammen, wird aber nach der Repolarisation und dem verbundenen Ausstrom aus der Zelle der Ionen wiederhergestellt (Ebner 2011). Synchrone Aktionspotentiale („Spikes“) sind der Hauptgrund für die hochfrequenten Bestandteile der aufgezeichneten lokalen Feldpotentialen (LFP) (Buzsáki *et al.*, 2012).

Um Potentiale und Spannungsänderungen der Neurone ableiten zu können, werden Elektroden benötigt. Diese können nicht-invasiv oder invasiv auf der Kopfhaut oder im Hirngewebe platziert werden. Wenn die Elektroden auf der Kopfhaut platziert werden, kann das räumlich summierte Feldpotential über eine Elektroenzephalographie (EEG) abgeleitet werden (Herrmann *et al.*, 2016). In dem Fall der später beschriebenen durchgeführten Versuche (siehe Material und Methoden), wurden die Elektroden direkt im Gewebe platziert. Genau dieses Vorgehen wurde von Telkes durchgeführt und so konnten unterschiedliche neurophysiologische Informationen bezüglich der Subtypen der Parkinson Erkrankung differenziert werden (Telkes *et al.*, 2018).

1.4.2 Oszillationen

Das lokale Feldpotential kann Oszillationen aufweisen. Oszillationen sind einteilbar anhand ihrer Frequenz und spiegeln wiederkehrende Schwingungen gleicher Frequenzen wider. Im *Cortex cerebri* gibt es das Delta- (0.8-4 Hz), Theta- (4-8 Hz), Alpha- (8-12 Hz), Beta- (12-20 Hz) und Gamma- (60-90 Hz) Frequenzband. Langsame Oszillationen werden primär von größeren Neuronenpopulationen und schnellere Oszillationen von kleineren Populationen generiert (Schnitzler und Gross 2005). Zusätzlich wird oft angenommen, dass hochfrequente Oszillationen im lokalen Bezug stehen und niedrigfrequente Oszillationen Informationen über große kortikale Netzwerke beinhalten (Salimpour und Anderson 2019). Im Gegensatz zu dieser Annahme konnte in Carus-Cadavieco *et al.* 2017 gezeigt werden, dass eine koordinierte Gamma-Oszillation, zwischen den entfernteren Arealen, dem lateralen Septum und dem lateralen Hypothalamus, vorliegt.

Einteilbar ist die Gamma-Oszillation in ein langsames 30-60 Hz, mittelfrequentes 60-90 Hz und schnelles 90-150 Hz Gamma-Band (Belluscio *et al.*, 2012). Die am häufigsten vorkommende Oszillation im intakten Gehirn ist die Gamma-Oszillation mit 30-90 Hz

(Buzsáki und Wang 2012). Die Oszillation kommt dadurch zustande, dass Neurone, die anatomisch verteilt vorkommen und sich weiträumig erstrecken können, synchronische Aktivität zeigen (Buzsáki und Chrobak 1995). Funktionell betrachtet, kommunizieren die Neurone einheitlich und synchron von einer zur anderen Gehirnregion (McNally und McCarley 2016). Die periodische Schwankung der Oszillation resultiert aus den einfallenden Signalen der umliegenden Neurone mit ihren inhibitorischen postsynaptischen Potentialen (IPSP) und exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (EPSP). Diese führen zu Veränderungen der Membranpotentiale (Schnitzler und Gross 2005). Besonders hervorzuheben sind die calciumbindenden Interneurone, die das Protein Parvalbumin binden, da es für die Generierung der rhythmischen Aktivität essenziell ist (McNally und McCarley 2016).

Die oszillatorische Aktivität der Neurone spielt eine wichtige Rolle in der Interaktion verschiedener Gehirnareale (Fries 2009). Damit das Gehirn auf viele verschiedene extrinsische Einflüsse reagieren und Informationen verarbeiten bzw. integrieren kann, benötigt es einen schnellen Signalweg. Hierfür verwendet es die zuvor genannten Oszillationen. Studien implizieren periodische Änderungen der neuronalen Erregbarkeit während Oszillationen, die das neuronale Netzwerk betreffen und über verschiedene Gehirnareale hinweg vorkommen (Colgin 2011; Buzsáki *et al.*, 2013).

Intraoperativ konnte gezeigt werden, dass während gestellter Aufgaben mit einer hohen Konfliktfrage, im STN vorrangig niedrigfrequente Aktivitäten ableitbar sind (Cavanagh *et al.*, 2011).

Oszillationen in ST

Die meisten Erkenntnisse über Oszillationen in der subthalamischen Region kommen aus Studien im Bereich der Tiefen Hirnstimulation und beziehen sich vorrangig auf den *Nucleus subthalamicus*, da dieser der häufigste Implantationsort der Elektroden der THS ist. An Parkinson erkrankte Patienten, die unter Bradykinese (Bewegungsverlangsamung) leiden, weisen vorrangig pathologisch Beta-Oszillationen (13-30 Hz) im *Nucleus subthalamicus* auf. Nach der THS liegt kurzzeitig eine verringerte Beta Aktivität im STN vor (Kuhn *et al.*, 2008). Folglich liegt auch eine verringerte Kopplung in diesem Frequenzband zwischen dem *Cortex cerebri* und dem STN vor (Kuhn *et al.*, 2008).

Gamma-Oszillationen (40-100 Hz) sind im STN während Aufmerksamkeit und Bewegung vorzufinden. Die Studie um Trottenberg *et al.* 2006, hat ebenfalls dargelegt, dass abgeleitete Gamma-Oszillationen der Neurone im STN und in der angrenzenden ZI an Parkinson erkrankten Patienten (Trottenberg *et al.*, 2006) und während der Verarbeitung von somatosensorischen Prozessen in den Basalganglien (Elben *et al.*, 2018) zu finden sind.

Oszillationen in mPFC

Im medialen präfrontalen Kortex sind ebenfalls Gamma-Oszillationen vertreten. Diese sind an zielgerichteten Aufmerksamkeitsprozessen beteiligt (Kim *et al.*, 2016). Es wird angenommen, dass es bei einer Dysfunktion dieser Oszillation zu sozialen Defiziten (Autismus) kommen kann (Cao *et al.*, 2018). Theta-Oszillationen wurden, bei der Erfüllung von Lernaufgaben, im mPFC von Meerschweinchen nachgewiesen. Zeitgleich konnte ebenfalls Theta-Aktivität im *Cerebellum* abgeleitet werden, sodass eine Synchronisation vorliegt (Chen *et al.*, 2016). Bei Aufgaben, die sich mit Gedächtnisbildung und Aufmerksamkeit beschäftigten, konnten schnellere Oszillationen (Beta- (20-30 Hz) und Gamma- (30-80 Hz) Frequenzen) im medialen präfrontalen Kortex der Ratte abgeleitet werden (Glykos *et al.*, 2015).

Eine erhöhte Aktivität des Theta-Bandes impliziert, dass eine Menge an Beweisen zur aktuellen Entscheidungsfindung herangetragen werden muss, damit eine Aktion ausgeführt werden kann (Cavanagh *et al.*, 2011). Es wird angenommen, dass verschiedene Frequenzbereiche der Oszillationen, mit verschiedenen Arealen des mPFC und folglich mit unterschiedlichen Aufgaben in Verbindung gebracht werden kann (Glykos *et al.*, 2015).

1.5 Frequenz-Kopplung

Unter Frequenz-Kopplung, *cross-frequency coupling* (CFC), wird die Interaktion verschiedener Oszillationen mit unterschiedlichen Frequenzbändern verstanden. Die CFC spielt eine Rolle in der neuronalen Kommunikation, beim neuronalen Lernen und bei allgemein neuronalen Prozessen (Canolty und Knight 2010). Unterteilbar ist die CFC in drei Untergruppen: *Phase-phase coupling* (PPC), *amplitude-amplitude coupling*

(AAC) und *phase-amplitude coupling* (PAC). Die ersten Erkenntnisse über Mechanismen des CFC im *Hippocampus*, sind auf das Jahr 2009 zurückzuführen. In der Studie wurden Mäusen, mit genetischer Ablation der hemmenden Transmission am Interneuron, lokale Feldpotentiale abgeleitet, in denen ein geringes CFC im Vergleich zu den Kontrolltieren vorlag (Wulff *et al.*, 2009).

Die häufigsten Erkenntnisse liegen im Bereich des PAC von Theta- und Gamma-Oszillationen vor. Hierbei wird beispielweise die hochfrequente Gamma-Amplitude von der niedrigfrequenten Theta- und/oder Subtheta-Phase moduliert (Goodman *et al.*, 2018). In die langsame Phase „nistet“ sich die schnellere Gamma-Oszillation ein. Diese Kopplung ist besonders im Gedächtnissystem von Menschen und Tieren ausgeprägt (Canolty und Knight 2010), beispielweise im zielgerichtetem Verhalten in Amygdala und im *Hippocampus* (Stujenske *et al.*, 2014). Hervorzuheben ist, dass die Stärke der CFC während Aufgaben, die mit Lernprozessen in Verbindung stehen, größer wird (Tort *et al.*, 2009). Beispielhaft kann hier das *T-maze* aufgeführt werden. Dies ist ein Versuchsmodell, in dem das Entscheidungsverhalten von Nagern beobachtet werden kann. Es wurde deutlich, dass sich die CFC in verschiedenen Phasen des Versuches unterschiedlich darstellt, dynamisch verändert und das mit dem Lernen die Stärke der Kopplung vergrößert wird (Tort *et al.*, 2008).

Ein *phase-amplitude coupling* (PAC) konnte vor allem im Ruhestadium des Gehirns über den gesamten *Cortex cerebri* nachgewiesen und nicht invasiv abgeleitet werden. Besonders die Kombination aus niedrigfrequenter Phase (2-12 Hz) mit hochfrequenter Aktivität (80 Hz und höher) konnte nachgewiesen werden (Florin und Baillet 2015). Niedrigfrequente Theta-Oszillationen (4-8 Hz) modulieren die Stärke der Gamma-Oszillation (80-150 Hz) (Canolty *et al.*, 2006).

Es wird ebenfalls angenommen, dass insbesondere die PAC eine bedeutende Rolle in der Kommunikation verschiedener Areale des Gehirns innehält. Bei Veränderungen dieser Kopplung kann es beispielsweise zu Alzheimer (Goutagny *et al.*, 2013) oder auch *Morbus Parkinson* (Devergnas *et al.*, 2019) kommen. In einer Studie wurde gezeigt, dass bei Ratten, die das tau-Protein im *entorhinalen Cortex* exprimierten, welches eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Alzheimer hat, eine veränderte, bzw. unterbrochene CFC vorliegt. Die unterbrochene Kopplung liegt zum medialen präfrontalen Kortex, den Efferenzen des *entorhinalen Cortex*, vor. Diese Projektionen

sind an Lernprozessen beteiligt (Tanninen *et al.*, 2017). Die funktionelle Rolle der PAC in dem ST ist bislang nicht untersucht worden.

Pathologisch auftretende PAC von Beta- und schnellen Oszillationen in den Basalganglien führen zu motorischen Beeinträchtigungen (Guridi und Alegre 2017).

1.6 Optogenetik

Optogenetik bezeichnet die Kombination aus genetischen und optischen Methoden bzw. Verfahren, die zu einer definierten Depolarisation oder Hyperpolarisation in einer bestimmten Zellgruppe des Gewebes führen (Deisseroth, 2011). Weiterführend kann gesagt werden, dass es nicht nur zu einer Inhibierung oder Erregung, sondern vielmehr zum Verlust oder Gewinn von Funktionen kommt (Yizhar *et al.*, 2011). Für dieses Verfahren werden lichtsensitive mikrobielle Proteine benötigt (Nagel *et al.*, 2005), die Opsine genannt werden und in natürlichen Organismen, wie z.B. Algen oder Bakterien, vorkommen (Deisseroth und Hegemann 2017; Oesterhelt und Stoeckenius 1971).

Damit das Opsin in die Zielzelle eingeschleust werden kann, werden Viren z.B. Lentiviren (Boyden *et al.*, 2005) oder Adeno-assoziierte Viren (AAV) (Packer *et al.*, 2013) verwendet. Zusätzlich muss ein spezieller Promotor verwendet werden, der für die Zielzelle bekannt ist, damit nur in diesen Zellen das Protein exprimiert wird. Ein Gen für ein fluoreszierendes Protein, z.B. gelb fluoreszierendes Protein (YFP) oder grün fluoreszierendes Protein (GFP), ist ebenfalls von Bedeutung, damit die Zellen nach Lichtaktivierung aufleuchten. Dieses Phänomen ist dann in den Gehirnschnitten unter einem Fluoreszenzmikroskop erkennbar (Boyden *et al.*, 2005).

Channelrhodopsin-2 (ChR2) ist ein Kationen-selektiver Kanal (Nagel *et al.*, 2005), der in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* vorliegt und durch Licht geöffnet werden kann (Arenkiel *et al.*, 2007), sodass Ionen fließen können (Abb. 2). Dieses Rhodopsin wurde 2002 in der Grünalge entdeckt (Nagel *et al.*, 2002). ChR2 kann sowohl in neuronalen Zellkulturen als auch in lebenden Tieren durch Licht kontrolliert werden (Feldbauer *et al.*, 2009). ChR2 absorbiert blaues Licht bis 480 nm (Bamann *et al.*, 2008). In der Regel liegt die größte Absorption bei 460 nm (Lin *et al.*, 2009) vor. Die Kanäle können sehr schnell (50 μ s) durch einen Lichtimpuls geöffnet werden und schließen ebenfalls zügig nach Beendigung des Impulses (Boyden *et al.*, 2005). Der blaue Lichtimpuls (Lecea und Carter 2011) bzw. die Aufnahme eines Photons, sorgt für eine Konformationsänderung

des Proteins (Nagel *et al.*, 2003). Es folgt eine erhöhte Permeabilität für einwertige und zweiwertige Kationen bspw. Na^+ und Ca^{2+} (Nagel *et al.*, 2003) entlang ihres elektrochemischen Gradienten und folglich kommt es durch den Einstrom in die Zelle zur Depolarisation. Es werden vor allem Natrium, Kalium, Calcium und Wasserstoff entlang ihres elektrochemischen Gradienten transportiert (Zhang *et al.*, 2011). Im Durchschnitt können ChR2-positive Zellen bis zu einer Frequenz von 30 Hz Aktionspotentiale generieren. Ab einer Frequenz von 35 Hz nimmt die Generierung um 50% ab (Wang *et al.*, 2007). Um höhere Expressionen erreichen zu können, wurden in letzter Zeit Algenkodons mit Säugetierkodons des Channelrhodopsins ausgetauscht, sodass es zu einem humanen Channelrhodopsin (hChR2) wird (Zhang *et al.*, 2007).

Bei dem Protein Halorhodopsin kommt es zur Hyperpolarisation durch gelbes Licht, welches eine Chloridpumpe und keinen Kanal darstellt. Halorhodopsin (NpHR) liegt in dem Archaeon *Natronomonas pharaonis* vor (Zhang *et al.*, 2007). Bei einem Millisekunden langen gelben Lichtimpuls fließen negativ geladene Teilchen in die Zelle, sodass diese reversibel inaktiviert bzw. hyperpolarisiert werden (Han und Boyden 2007). Die stärkste Aktivität zeigt Halorhodopsin bei einer Wellenlänge von 590 nm (Yizhar *et al.*, 2011).

Die zuvor genannten Opsine (ChR2 und NpHR) bestehen beide aus je sieben helikalen Domänen, die in die Membran eingelagert sind (Zhang *et al.*, 2007). Im Inneren dieser Konfiguration liegt ein Vitamin A-Abkömmling (Retinal) vor. Durch Einströmung des Lichtes kommt es zu einer Änderung des Retinals, von all-trans-Retinal zum 13-cis-Retinal und schließlich zu einer Konformationsänderung des Proteins (Zhou *et al.*, 2012).

Der Hauptunterschied zwischen Halorhodopsin und Channelrhodopsin liegt darin, dass Halorhodopsin eine Pumpe ist, die Ionen durch die Zellmembran pumpt und es folglich zur Hyperpolarisation kommt. Channelrhodopsin stellt einen Kanal dar, der bei Öffnung den Fluss von Kationen ermöglicht und es somit zur Depolarisation, bzw. Generierung von Aktionspotentialen kommt. Die Maxima der Aktivierungswellenlängen sind ca. 100 nm auseinander, was bedeutet, dass beide Opsine getrennt voneinander aktivierbar sind (Han und Boyden 2007).

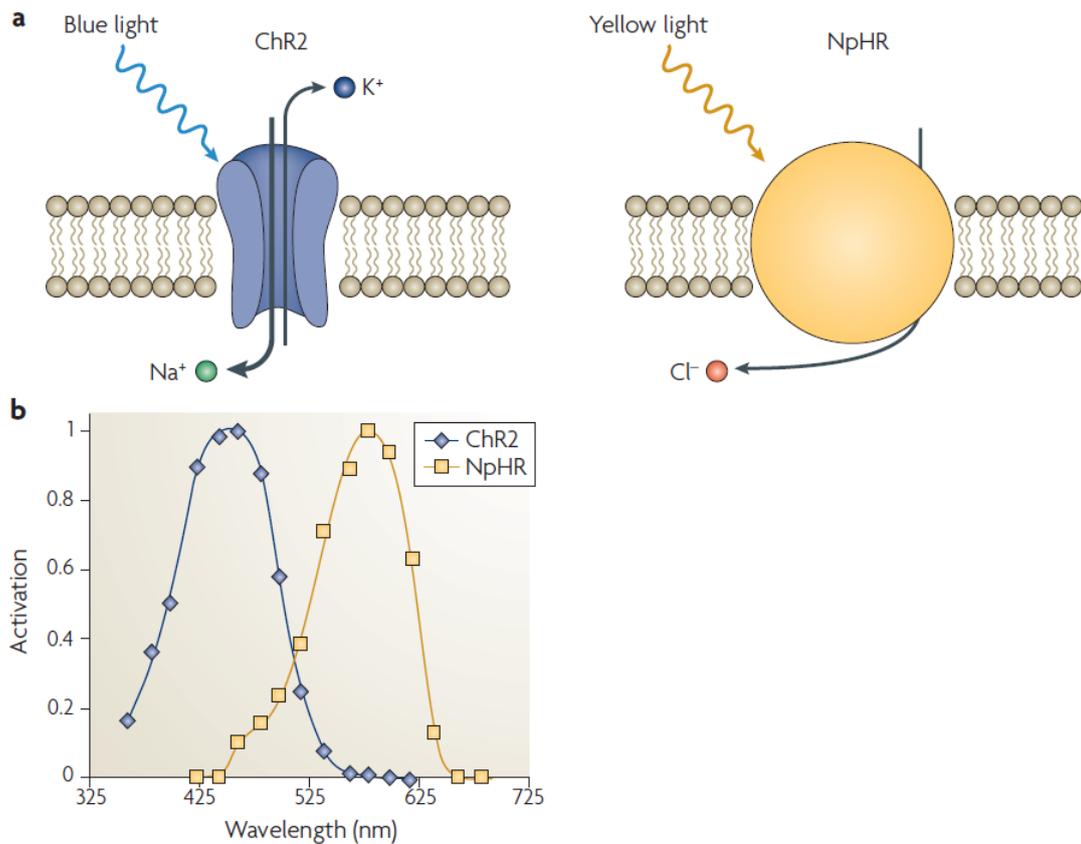


Abbildung 2: Mittel und Funktion Optogenetik: ChR2 und Halorhodopsin

A Schematische Darstellung der beiden Opsine (Channelrhodopsin und Halorhodopsin) und deren Aktivierung. **B** Aktionspektren für Channel- und Halorhodopsin. Die Maxima liegen 100 nm auseinander, sodass eine getrennte Aktivierung möglich ist (Erlaubnis zur Publikation und Verwendung von Zhang *et al.* 2007a).

eNPAC2.0

eNPAC2.0 (Abb. 3) ist ein viraler Vektor, der für Channelrhodopsin und Halorhodopsin kodiert ist, sodass die Aktivierung beider Opsine in einer Zielzelle möglich ist. Die beiden Opsine können jeweils einzeln über verschiedene Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen oder gleichzeitig mit einer überschneidbaren Wellenlänge aktiviert werden (Han und Boyden 2007). In der vorliegenden Studie wurde eNPAC2.0 verwendet. Hierbei liegt NpHR getrennt von dem fluoreszierenden Protein EYFP und ChR2 vor. Es hat zum Vorteil, dass der Transport von NpHR in den Axonen effizienter ist ohne YFP.

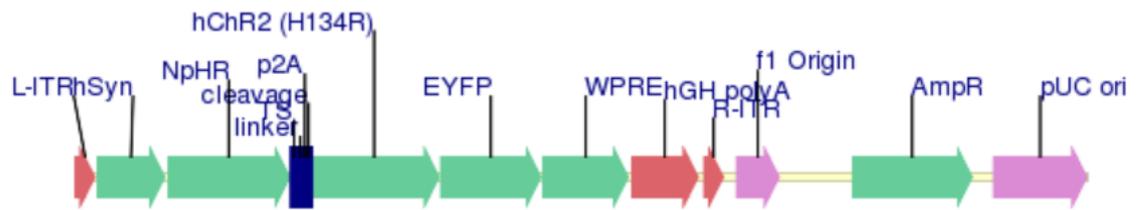


Abbildung 3: Aufbau des injizierten viralen Vektors eNPAC2.0

Syn steht für den Promotor Synapsin, NpHR für Halorhodopsin, hChR2 für Channelrhodopsin-r, EYFP für YFP (http://www.everyvector.com/sequences/show_public/57717).

1.7 Zielsetzung

Der neuronale Schaltkreis von dem mPFC zur subthalamischen Region steht im Mittelpunkt dieser Arbeit. Dieser ist in seiner anatomischen und funktionellen Konnektivität bislang noch nicht weiter erforscht worden. Um bestehende Lücken der wissenschaftlichen Daten zu füllen, steht die Erforschung dieses Kreises mittels Optogenetik im Vordergrund.

Die Optogenetik ermöglicht es erstens ein physiologisch relevantes optogenetisches Protokoll zur Manipulation des mPFC-ST Schaltkreises zu entwickeln. Dieses Protokoll soll als Basis für die Versuche verwendet werden. Zweitens soll das Verhalten der Tiere (im Bezug auf die Entscheidungsfindung) im *T-maze* untersucht werden.

Damit elektrophysiologische Aufschlüsse geschaffen werden können, wird das lokale Feldpotential der untersuchten Regionen abgeleitet und ausgewertet. Die dritte Zielsetzung dieser Arbeit ist es somit die LFP zu untersuchen und eine mögliche Koordination der beiden Areale darzulegen. Wenn eine Koordination vorliegt, soll diese den verschiedenen CFC Möglichkeiten zugeschrieben werden.

2 Material und Methoden

2.1 Allgemein

Die Versuche zur Generierung der Daten wurden von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV, Aktenzeichen 81-02.04.2018.A073) und der Regierung von Unterfranken genehmigt. Es liegt eine Kooperation zwischen dem Institut für Klinische Neurowissenschaften und Medizinische Psychologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg vor. Die Teilnahme am „Kurs zu Grundlagen der Versuchstierkunde nach FELASA-Richtlinien (Kategorie B) erfolgte vom 13.06.2018-15.06.2018 an der Humboldt-Universität zu Berlin.

Für die Versuche wurden männliche Mäuse (Black Six C57BL/6N und C57BL/6J) zwischen 12-25 Wochen ausgewählt, die im Durchschnitt 30 g gewogen haben. Die Mäuse sind unter Standardkonditionen im Tierhaus bei einem 12-Stunden Tag- und Nachtrhythmus gehalten worden. Die Helligkeitsphase lag im Zeitraum von 06:00 bis 18:00 Uhr. Vor den Implantationen wurden die Tiere gemeinsam in Käfigen gehalten. Nach Durchführung der Implantationen, wurden sie zum Schutz in Einzelhaltung untergebracht.

Die Anästhesie erfolgte mit in Sauerstoff gelöstem Isofluran (1,5-3%). Eingeleitet wurde diese in einer Kammer und später mittels Inhalationsanästhesie durchgeführt. Die Atmung und die Reflexe der Tiere lagen unter ständiger Beobachtung. Die Überwachung der Körpertemperatur erfolgte über eine rektal applizierte Messsonde und eine Heizmatte diente zur Steuerung (DC Temperature Controller). Zum Schutz vor Austrocknung der Augen, wurden diese mit einem Gel (Artelac®) befeuchtet. Die Haare sind an der Operationsstelle entfernt und die Haut mit Isopropanol desinfiziert worden. Es wurde drei Tage (am Tag der Operation und an zwei Folgetagen) ein Antiphlogistikum subkutan (Carprofen 5 mg/kg Körpergewicht) injiziert.

Die Tiere bekamen nach den Operationen eine Petrischale mit Wasser, spezielles kalorienreiches Futter (TestDiet, dio rodent purified diet w/60% energy from fat-blue), und Kondensmilch zur Nahrungsaufnahme bereitgestellt.

2.1.1 Aufbau einer multikanalen Elektrode

1. Es wurden sechs dünne Kupferdrähte, fünf ca. 1 cm lang und ein 2,5 cm langer Kupferdraht, verwendet. Nach einseitigem Abtragen der Emaille-Isolierung wurden die Kupferdrähte und die Drähte des Nano Konnektors mit Flussmittel bestrichen. Es wurde eine Verbindung beider Drähte durch Löten hergestellt. Die anderen freien Enden der Kupferdrähte abisoliert und zu einem Haken geformt (Abb. 4).
2. Es wurden fünf Führungsschläuche aus Glas mit einem Durchmesser von 97,4 μm nebeneinander auf einem beliebigen Klebeband fixiert. Es wurde ein 0,5 cm langes Stück abgeschnitten.
3. Durch die nebeneinander liegenden Glasröhrchen wurden 4 cm lange Wolfram-Drähte (45 μm) geführt. An einem Ende der Wolframdrähte wurden die Isolierungen abgetragen. Diese wurden ebenfalls zu Haken gebogen und traten in Verbindung mit den Haken der Kupferdrähte, die an dem Nanokonnektor befestigt waren.
4. Die entstandene Verbindung wurde mit Silberlack gefestigt. Dann erfolgte eine Wartezeit von 30 min, bis der Lack komplett ausgehärtet war.
5. Über den Kupferdrähten und den Wolfram-Drähten wurde dentaler Zement (Paladur, Kulzer GmbH) für eine feste Verbindung aufgetragen. Der obere Teil des Nano Konnektors, welcher mit dem Adapter gekoppelt wurde und die Wolfram-Drähte unterhalb der Führungsröhrchen wurden nicht von Zement bedeckt. Zum einen, damit die Verbindung zum Adapter frei blieb und zum anderen, damit die Drähte, die ins Gehirn implantiert wurden, frei von Zement waren.
6. Zum Schluss wurden die Wolfram-Drähte auf die vorher bestimmte Länge gekürzt und auf Impedanz und Crosstalk (Impedance Conditioning Module, FHC, USA) getestet. Paarweise wurden die Kanäle auf Crosstalks im Widerstandsmodus des Gerätes geprüft. Elektroden mit Crosstalks $<10 \text{ M}\Omega$ wurden nicht verwendet. Für die Impedanzmessung wurden die Spitzen der Elektroden in NaCl-Lösung eingetaucht. In der Regel lagen die Impedanzmessungen unter 100 k Ω .

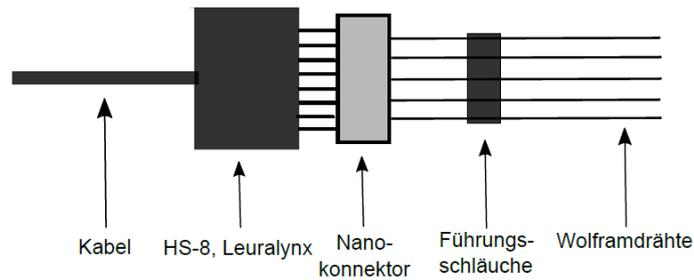


Abbildung 4: Elektrode

Schematische Darstellung der gebauten Elektrode. Die Wolframdrähte werden im Gehirn implantiert und dienen der elektrophysiologischen Ableitung. Die hergestellte Elektrode ist kleiner als eine 1 Cent Münze (eigene Abbildung).

2.1.2 Aufbau einer optischen Faser

1. Für die Herstellung der optischen Faser wurden Multimode Lichtwellenleiter (Thorlabs, Dachau, Deutschland) Fasern mit einem Durchmesser von 100 μm verwendet. Um die Hülle der optischen Faser zu entfernen, wurde eine Abisolierzange verwendet. Ein 3 cm langes Stück wurde von der Hülle entfernt und mit einem Skalpell von der Spule abgeschnitten.

2. Die „enthüllte“ optische Faser wurde in eine Zirkonkeramikhülse (Precision Fiber Products, Milpitas, CA, USA) gesteckt. An der einen konvexen Seite der Keramikhülse soll die Faser 0,05 cm herausstehen. Beide Seiten der Hülse wurden mit Sekundenkleber befestigt.

3. Nach einer Trocknungszeit von 30 min wurde die kürzere Seite mit Diamantpapier (Thorlabs, Diamond Lapping, 3 μm) geglättet. Es war darauf zu achten, dass die Seiten der Hülse frei von Sekundenkleber blieben, damit es später keine Störkontakte mit dem Adapter des Kabels für die Lichtleitung gab.

4. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Fasern getestet. Dies geschah mit einem optischen Leistungsmesser. Als Referenz wurde zuerst die Leistung des Lichtkabels ohne optische Faser gemessen. Der abgelesene Wert diente als Referenzwert. Dann wurde in einer zweiten Messung die optische Faser über einen Adapter an das Kabel gebunden. Die zweite Messung musste mindestens bei 50% des ersten Wertes liegen, damit die Faser für die Implantation verwendet werden konnte.

5. Um die Faser zu stabilisieren, wurde eine Plastikhülle um die Keramikhülse gelegt und mit Sekundenkleber und Zement (Paladur, Kulzer GmbH) befestigt.

2.2 Versuch 1 - Lokales Feldpotential

Für die Implantation der Fasern wurden drei Tiere mit einem Gewicht von mindestens 30 g Gewicht (C57BL/6N und C57BL/6J) verwendet, damit eine schnelle Erholung und unverändertes Verhalten gewährleistet werden konnte. Die Tiere wurden vor und nach der Operation gewogen, um das Gewicht des Implantates zu überprüfen.

Die Mäuse sind mittels Isoflurane anästhesiert und in einem stereotaktischen Gerät (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) fixiert worden. Darauffolgend wurde das Fell entfernt, die Stelle desinfiziert und eine Inzision entlang der Mittellinie vollzogen, das aufliegende Gewebe auf dem Schädeldach entfernt, sodass Bregma und Lambda sichtbar wurden. Vier Edelstahlschrauben (Bilaney, Deutschland) wurden nach vorheriger Kraniotomie (Rosenbohrer, 1 mm) befestigt. Das Gehirngewebe wurde dauerhaft mit NaCl-Lösung befeuchtet, um es vor Austrocknung zu schützen. Zwei Schrauben befanden sich im frontalen Bereich und zwei Schrauben oberhalb des *Cerebellums* im distalen Bereich des Schädels (Abb. 5). Diese Schrauben dienten der Befestigung, Stabilisierung und physikalischen Erdung der Implantate. Die Schraube, welche für die phsikalische Erdung essenziell ist, hatte einen angelöteten Kupferdraht, um später eine Verbindung zur Elektrode herstellen zu können. Diese Schraube ist ringsherum mit Zement bedeckt und isoliert worden, um Artefakte durch Anspannung der Nackenmuskulatur zu verhindern. Anschließend sind alle Schrauben mit dentalem Zement (Paladur, Kulzer GmbH) miteinander verbunden worden, um eine Befestigung und Stabilisierung der Implantate zu erreichen. Danach wurden Kraniotomien entsprechend der vorher bestimmten Lokalisation (AP: -1.9 mm, ML: 1,6 mm, DV: 4,6 mm; AP: 1,5 mm, ML: 0,3mm, DV: 3,1 mm) (Paxinos und Franklin 2012) durchgeführt (Abb. 6). Die Implantate wurden ebenfalls mit dentalem Zement (Paladur, Kulzer GmbH) an dem bisher aufgetragenem Zement verankert. Um die Schnittstelle über dem Schädeldach zu verringern, wurden Nähte gesetzt.

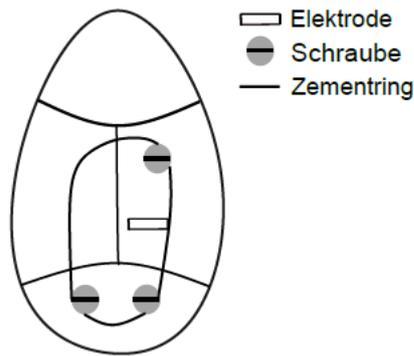


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Operation für LFP-Aufnahmen

Dargestellt ist schematisch die Aufsicht auf den Schädel während der Operation. Die obere Schnittstelle beider Suturen ist Bregma, die untere ist Lambda. Der Zementring, die Schrauben zur Verankerung und die inserierte Elektrode in der Region von STN sind zu erkennen (eigene Abbildung).

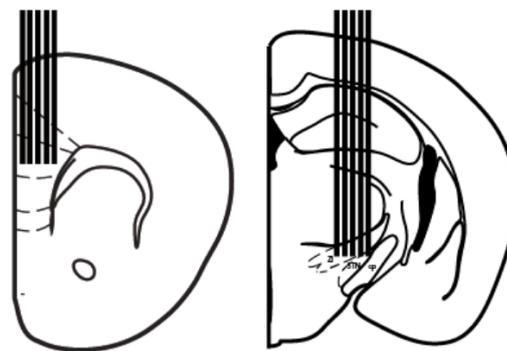


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Lage der Wolframdrähte

Die zwei gebauten Elektroden, die in mPFC (links) und ST (rechts) implantiert wurden, sind schematisch dargestellt. Fünf Wolframdrähte haben das elektrophysiologische Signal abgeleitet (eigene Abbildung).

2.3 Versuch 2 - Optogenetik

Für die Versuche mittels Optogenetik musste ein Zeitablauf erstellt werden (Abb. 7). Die Expression des Proteins, welche mit den viralen Vektoren in die Zielzelle eingeschleust wurde, dauert bis zu sieben Wochen an. Nach einer Wartezeit von vier Wochen konnte die Implantation der optischen Fasern erfolgen. Daraufhin wurde eine einwöchige Pause einkalkuliert, damit sich die Tiere von dem operativen Eingriff erholen konnten. Im Anschluss an diese Pause wurde mit den Versuchen begonnen. Die Versuche haben im Schnitt 10 Tage pro Maus gedauert.



Abbildung 7: Versuchsablauf

Da die Expression der Opsine bis zu sieben Wochen andauern kann, wurden die viralen Injektionen und die Implantation der Fasern in zwei Operationsdurchläufen aufgeteilt (eigene Abbildung).

2.3.1 Virusinjektion

Die Tiere (8 Tiere eNPAC2.0, AAV-hSyn-NpHR-TS-p2A-hChR2(H134R)-EYFP, 10 Tiere YFP, AAV-hSyn-EYFP) wurden mittels Isofluran, volatiles Anästhetikum, anästhesiert und in einem stereotaktischen Gerät (David Kopf Instruments, Tujanga, CA, USA) fixiert. Das Fell wurde entfernt, die Augen befeuchtet (Artelac®) und eine Desinfektion der Kopfhaut (Isopropanol) durchgeführt. Beginnend erfolgte ein Schnitt entlang der Mittellinie, sodass das Periost zu erkennen war. Bregma (Schnittstelle der *Sutura coronalis* und *Sutura sagittalis*) und Lambda (Schnittstelle *Sutura sagittalis* und *Sutura lambdoidea*) wurden dargestellt. Der Schädel wurde mit NaCl-Lösung gereinigt und getrocknet, sodass Bregma bestimmt werden konnte. Auf Basis der festgelegten Applikationsorte der viralen Vektoren, wurden zwei Kraniotomien, mit einem dentalen Rosenbohrer, durchgeführt.

Für die Applikation der viralen Vektoren wurde eine Injektionskanüle hergestellt. Hierfür wurde eine stumpfe Kanüle (27 Gauge, 0,4 x 25 mm) von der Plastikfassung glatt abgetrennt und durch ein 97,4 µm breites Glasröhrchen durchgeführt. Das Glasröhrchen stand an der einen Seite ca. 2,5 cm und an der anderen Seite 0,05 cm heraus. Der Übergang zwischen den beiden Röhrchen (an der längeren Seite) wurde mit Sekundenkleber fixiert. Diese Kanüle wurde mit einem Polyethylenschlauch (INTRAMEDIC Clay Adams Brand, Innendurchmesser 0,38 mm, Außendurchmesser 1,09 mm) verbunden und ebenfalls mit Sekundenkleber befestigt. Diese Verbindung ist zuletzt an die Halterung des stereotaktischen Gerätes angebracht worden.

Die andere Seite des Polyethylenschlauches wurde mit dem Kolben passend zur 5 µl Nanofil Hamilton Spritze verbunden. Dieser Kolben wurde an eine Pumpe angeschlossen und befestigt (PHD Ultra, Harvards Apparatus, Holliston, MA, USA). Die Pumpe ermöglicht es, die viralen Vektoren mit einer präzisen Geschwindigkeit von 200 nl/min gleichmäßig zu applizieren. Das ausgewählte Zielvolumen pro Injektionsstelle war 50 nl.

Vor der Applikation des Virus wurde die Injektionskanüle 50 μm tiefer eingeführt und verweilte dort für eine Minute. Danach wurde die Kanüle auf die gewünschte Injektionstiefe zurückgestellt (Abb. 8). Durch das kurzzeitige Absinken der Injektionskanüle wurde ein kleiner Hohlraum für die Applikationsmenge geschaffen. Dies ist notwendig, damit die eingebrachte virale Menge keinen zu hohen Druck auf das Gewebe des Gehirns ausübte. Nachdem die vorgesehene Menge am Applikationsort injiziert worden ist, wurde die Nadel für zehn Minuten an der Stelle belassen, bevor sie langsam wieder entfernt worden ist, um ein Zurückfließen der viralen Vektoren in den Einstichkanal zu vermeiden.

AAV-hSyn-NpHR-TS-p2A-hChr2(H134R) EYFP/AAV-hSyn-EYFP

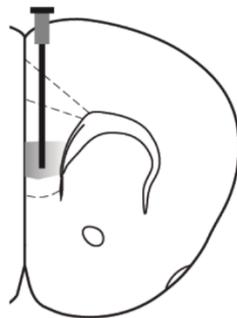


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Lokalisationsortes der Injektion in den mPFC

Die Injektion der viralen Vektoren erfolgte im medialen präfrontalen Kortex. Von den Neuronen in der Region wurden die Opsine entlang ihrer Axone exprimiert (eigene Abbildung).

2.3.2 Protokoll zur Vorbereitung der Pumpe und Ablauf der Injektion

1. Der Polyethylschlauch wurde mit Öl mithilfe einer Spritze (Omnifix Solo, 10 ml) durchgespült, sodass der Schlauch komplett mit Öl, ohne Luftblasen, gefüllt war. Dann wurde die Nadel (mit der Injektionskanüle) in den Schlauch eingefädelt.
2. Der Teil des Schlauches, an welchem die Nadel eingeführt war, wurde abgeschnitten, damit die Luftblase kleiner wurde (es hat sich eine Luftblase gebildet, aufgrund der eingeführten Kanüle). Danach wurde die hergestellte Injektionskanüle in den Schlauch eingeführt und mit Sekundenkleber befestigt. Der Trocknungsprozess konnte beschleunigt werden, indem der aufgetragene Sekundenkleber mit Wasser befeuchtet wurde.

3. Die Kanüle wurde in der vorgesehenen Verankerung des stereotaktischen Gerätes befestigt. Es war darauf zu achten, dass die Klemme des stereotaktischen Gerätes nur an dem metallgestützten Bereich des Polyethylenschlauches bzw. der Injektionskanüle anlag, um das Lumen nicht zu komprimieren. Mit der Spitze der Injektionskanüle wurden anschließend die Punkte der Kraniotomien festgelegt. Die Position der Injektionskanüle wurde nicht mehr verändert.

4. Der Kolben wurde manuell in die andere Seite des Schlauches 2 cm eingeführt. Dann war darauf zu achten, dass Öl durch die Injektionskanüle austrat, um sicher zu stellen, dass diese funktionsfähig war. Der Kolben und der Schlauch wurden in die vorgesehenen Verankerungen der Pumpe angebracht und die Feststellschrauben angezogen. Hierbei war wichtig, dass der Kolben und der Polyethylenschlauch eine Linie bilden. Um den Schlauch bestmöglich verankern zu können, wurden unter und über dem Schlauch Schwämme montiert, welche als Polsterung dienten. Somit komprimierten die Feststellschrauben nicht direkt das Lumen des Polyethylenschlauches und die Kraft der Schrauben wurde gleichmäßig auf den Schlauch verteilt.

5. Der Kolben wurde mit einer Geschwindigkeit von 400 nl/min maschinell in den Schlauch eingeführt. Entscheidend war, dass es zu keiner Biegung des Kolbens kam. Der Kolben sollte bis auf 0,5 cm komplett in den Schlauch eingeführt sein, damit später genug Lumen zur Aufnahme von Luft und den viralen Vektoren zur Verfügung stand.

6. Eine Luftblase im Schlauch trennte das Öl und die viralen Vektoren voneinander. Diese Luftblase musste das Volumen von 200 nl aufweisen, damit die Trennung beider Medien gewährleistet war, aber ein nicht zu großer Druck im System aufgebaut wurde, sodass die Applikation verhindert werden konnte.

➔ Aufnahme der Luft:

- Zielvolumen 200 nl
- Geschwindigkeit 200 nl/min

7. Um die viralen Vektoren in die Kanüle aufzunehmen, wurden diese aus dem Gefrierschrank (-82 °C) entnommen und bei Zimmertemperatur aufgetaut. In einem Mikroreaktionsgefäß, einer Laborzentrifuge (Heraeus Christ, Omnifuge), wurden die Vektoren rotiert, sodass sich alles an der Basis des Gefäßes sammelte. Mit einer Pipette wurden 2 µl aus dem Gefäß entnommen.

8. Die gewünschte virale Menge (2 μ l) wurde mit der Pipette auf ein Paraffinblatt (Parafilm), welches oberhalb von Bregma platziert wurde, gegeben und aufgenommen. Es ist obligatorisch auf vorgeschriebene Entsorgung der Gegenstände, die mit den viralen Vektoren in Berührung gekommen sind, zu achten.

9. Die viralen Vektoren wurden aufgenommen:

➔ Aufnahme der Vektoren:

- Zielvolumen 1,5 μ l
- Geschwindigkeit 200 nl/min

10. Es ist hilfreich, sich Markierungen als Referenzpunkte zu setzen. Der erste Punkt sollte auf Höhe der Blase sein, um zu sehen, ob sich bei der Aufnahme der viralen Menge die Blase bewegte. Der zweite Punkt ist auf Höhe der Anfangsebene der viralen Vektoren, nach vollständiger Aufnahme, zu setzen. Pro Injektion sind Markierungen sinnvoll, damit sichergestellt werden kann, dass der Vorgang mit einer Injektion, mit gleichem Volumen, funktioniert.

11. Über die stereotaktische Führung gelangte die Injektionskanüle zu den Kraniotomien. Bei der Einführung dieser war es wichtig, dass der Vorgang langsam durchgeführt wurde. Eine Obliteration der Kanüle durch das Gewebe war zu vermeiden.

12. Die Kanüle war 50 μ m tiefer als der bestimmte Applikationsort einzuführen und musste dort für eine Minute verweilen, bevor sie an den richtigen Ort der Applikation zurückgestellt wurde. Darauf folgend fand die Injektion der viralen Vektoren statt.

➔ Abgabe der viralen Vektoren:

- Zielvolumen 250 nl
- Geschwindigkeit 200 nl/min

13. Nach einer Verweildauer von zehn Minuten konnte die Kanüle wieder zurückgezogen werden und eine weitere Applikation erfolgen.

14. Nach jedem Tier war die Kanüle zu wechseln und der Schlauch bis auf die Höhe der anfangs „hergestellten“ Luftblase zu kürzen, damit keine viralen Vektoren im Schlauchsystem blieben.

Angaben zu den Injektionen:

Injektion eNPAC-Gruppe: AAV-hSyn-NpHR-TS-p2A-hChR2(H134R)-EYFP (eNPAC2.0, titre $2,9 \times 10^{13}$ vg ml⁻¹) zur Verfügung gestellt von K. Deisseroth

Injektion YFP-Gruppe: AAV-hSyn-EYFP ($3,3 \times 10^{12}$ vg ml⁻¹, UNC Vector Core)

Menge: pro Applikationsort 250 nl, pro Hemisphäre 500 nl

Geschwindigkeit: 200 nl/min

Applikationsort: mPFC A25 (AP: 1,5 mm, ML: +/-0,2 mm, DV: 3,1 mm)

(AP: 1,5 mm, ML: +/-0,2 mm, DV: 3,3 mm)

2.3.3 Implantation der optischen Faser

Nach siebenwöchiger Wartezeit erfolgte die Implantation der optischen Fasern. Für die Stimulation des *Nucleus subthalamicus* und der *Zona incerta* wurden pro Hemisphäre eine Faser implantiert. Eine zusätzliche Faser ist in einer der Hemisphären eingebracht worden, um einen Back-Up zu erhalten (Abb. 9).

Zunächst wurden die gleichen einleitenden Maßnahmen, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. Mittels Stereotaxis sind die vorher bestimmten Koordinaten für die Kraniotomien und folglich die Punkte der Implantation der drei Fasern bestimmt worden. Die Fasern bzw. das Licht des Lasers sollten die Regionen bestmöglich stimulieren (AP: -2 mm, ML: +/-1,6 mm, DV: 4,22 mm; AP: -0,27 mm, ML: 1,6 mm, DV: 4,47 mm, α 20°). Zunächst wurden drei Schrauben zur Verankerung eingebracht und mit dentalem Zement (Paladur, Kulzer GmbH) miteinander verbunden. Anschließend sind nacheinander die Fasern implantiert und die Kraniotomien mit Wachs bedeckt worden. Die Fasern wurden mit Zement verstärkt und mit dem bereits aufgetragenen Zement an den Schrauben und der Schädeldecke verbunden.

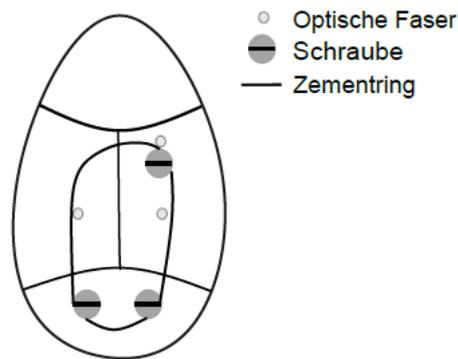


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Operation für die optogenetische Manipulation

Die drei implantierten optischen Fasern (zwei in der gleichen Hemisphäre und eine zusätzliche Faser in der zweiten Hemisphäre) sind zu erkennen. Die Verankerung wurde über Zement hergestellt.

2.4 Versuch 3 - Optogenetische Manipulation und Ableitung des LFP

In Versuch 3 fand eine Ko-Implantation von drei optischen Fasern und einer Elektrode im Subthalamus statt (Abb. 10). Um das lokale Feldpotential während optogenetischer Manipulation abzuleiten, wurde eine Kombination aus den Versuchen 1 und 2 durchgeführt. Die Abläufe erfolgten nach den oben genannten Schritten. Je ein Tier aus der jeweiligen Gruppe erhielt nach der vorangeschrittenen Injektion drei optische Fasern und eine implantierte Elektrode in die subthalamische Region. Es wurden vier Schrauben zur Verankerung verwendet. Eine Schraube stellte zusätzlich die elektrische Erdung für die Elektrode dar.

Eine optische Faser wurde vor der Implantation an die Elektrode geklebt und war 1 mm kürzer als die Spitze der Wolframdrähte. Somit konnte gewährleistet werden, dass direkt oberhalb der ST stimuliert wird und auf eine zusätzliche Kraniotomie verzichtet werden konnte.

Die Koordinaten der optischen Faser war wie folgt: AP: -0,27 mm, ML: 1,6 mm, DV: 4,47 mm, α 20°) und AP: -2,00 mm, ML: -1,6 mm, DV: 4,22 mm).

Die Koordinaten für die Implantation der Elektrode beliefen sich auf: AP: -1,9 mm, ML: 1,6 mm, DV: 4,6 mm.

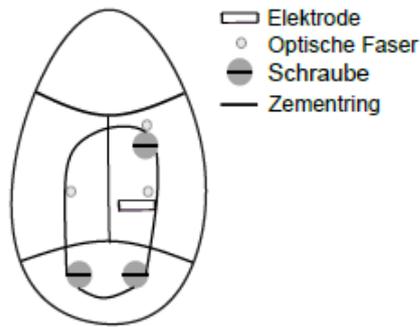


Abbildung 10: Schematische Darstellung für die Operation der Implantation der optischen Fasern und Elektrode

Eine Kombination (Versuch 3) aus elektrophysiologischer Ableitung über die Elektroden und optogenetische Manipulation über die optischen Fasern ist dargestellt (eigene Abbildung).

2.5 Datengewinnung

2.5.1 Handhabung

Vor dem Beginn der Experimente, wurde ein „*handling*“ mit den Mäusen durchgeführt. Das Ziel dieses war es, die Maus an die Umgebung, den Stress durch das Herausnehmen aus dem Käfig und den physischen Kontakt zum Versuchsleiter des Experimentes, zu gewöhnen. Somit ist die Eingewöhnungsphase in demselben Raum, in welchem auch die Experimente stattgefunden haben, durchgeführt worden. Ein Durchgang am Tag betrug pro Maus ca. zehn Minuten und wurde zwei Tage lang vor den Versuchen ausgeführt. Die Tiere wurden aus den Käfigen herausgenommen, auf der Hand bzw. auf dem Ärmel platziert, das Fell gestreichelt und sie konnten sich frei im Set-Up bewegen. Somit war das Kennenlernen der Umgebung für die Mäuse gegeben. Für diesen Zeitpunkt war keine Belohnung (Kodensmilch) im *maze* platziert. Währenddessen konnten der Gesundheitszustand und das Verhalten der Maus begutachtet werden.

2.5.2 Set-Ups für experimentelle Aufgaben

Nach dem operativen Eingriff wurde eine Ruhephase von einer Woche eingelegt. Für die Experimente wurden die implantierten Elektroden und die optischen Fasern mit flexiblen Kabeln verbunden. An eines dieser Kabel wurde zusätzlich eine LED-Lampe angebracht, um die Position der Mäuse im Versuchsaufbau per Videokamera verfolgen zu können. Während der Versuche konnten die Mäuse sich frei in den Versuchsmodellen bewegen und erfuhren keine Restriktion durch die Kabel. Das Verhalten der Mäuse war im Versuch

nicht eingeschränkt, sodass die natürlichen Bewegungen wie Laufen, Putzen, Klettern und Erkunden ausgeführt werden konnten.

T-maze

Um die Entscheidungsfindung und das Lernverhalten der Maus erforschen zu können, wurde im Versuch ein *T-maze* verwendet. Das *T-maze* hat die Form des Buchstabens „T“, ist mit seidenmatter Acrylfarbe anthrazitgrau gestrichen und besteht aus Holz (Abb. 11). Die matte Farbe ermöglicht, dass es zu keiner Reflexion des LED-Lichtes und des Lasers an den Wänden des Modells kam. Mit einer Klappe konnte jeweils ein Arm des Modells verschlossen werden. Die Basis bzw. der Startarm wiesen Dimensionen von 46 x 11 cm und die Arme je 40 x 11 cm auf. Die Höhe betrug 10 cm. Die Maus muss einen Arm des *maze* wählen und erhält als Bestärkung des Verhaltens am Ende des Armes Kondensmilch (0,1 ml). Bei der Auswahl des Gefäßes für die Milch kommt es auf die Platzierung im Arm und die Höhe an. Das Gefäß sollte so flach wie möglich sein, damit es möglichst homogen mit dem Boden des *maze* erscheint. Zusätzlich wurde immer an beiden Enden der Arme ein Behältnis aufgestellt, damit die Maus nicht durch das einseitige Aufstellen gereizt wurde.

Am Morgen der Versuche wurde das Futter aus den Käfigen entfernt. Die Versuche wurden täglich zur gleichen Uhrzeit in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Bevor der erste Versuch startete, war die Maus bereits 30 min im Raum. Eine Maus wurde fünf Tage lang im Experiment gehalten und pro Tag gab es 10 Durchläufe, sodass insgesamt 50 Durchgänge stattgefunden haben. Sobald die Maus die Belohnung erhielt, wurde der Durchgang beendet. Ein Durchgang setzte sich aus einem Probedurchlauf und einem Testdurchlauf zusammen (Abb. 11). Im Probedurchlauf war ein Arm durch die Klappe verschlossen und der andere Arm offen. Am Ende des offenen Armes, war die Belohnung, die Kondensmilch, platziert. Danach pausierte die Maus ca. 20 s an der Basis des Startarmes, bevor dann der Testdurchlauf startete. Zum Verschluss des Startarmes wurde ebenfalls eine Klappe verwendet. Im Testdurchlauf waren beide Arme geöffnet und die Maus sollte nun zum Ende des vorher nicht besuchten Armes laufen, um die Kondensmilch zu finden. Nachdem die Maus den richtigen Arm besuchte, wurde fünf Minuten pausiert. In dieser Pause befand sich die Maus wieder am Ende der Basis des Startarmes. Ein Durchgang wurde beendet, sobald die Maus die Kondensmilch erreicht

hatte. Wenn sie nach drei Minuten nicht den richtigen Arm erreichte, wurde der Lauf abgebrochen und als negativ bewertet.

Pro Lauf wurden unterschiedliche Arme per Zufallsprinzip ausgewählt. Die Maus musste sich merken, in welchem Arm beim Probedurchlauf die Kondensmilch platziert war, damit die Maus beim Testdurchlauf den vorher nicht besuchten Arm wählte.

Die Maus wurde während des Versuches dem Konflikt des naturbedingten Alternierens und des Belohnungslernens ausgesetzt.

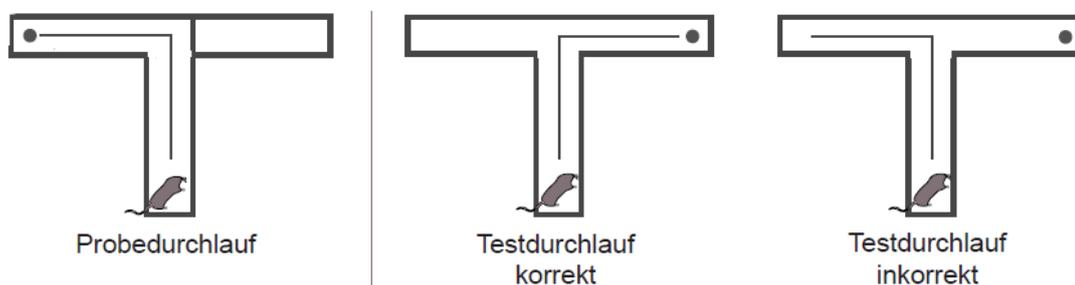


Abbildung 11: Ablauf Durchgang T-maze

Dargestellt ist der Ablauf der Versuche im T-maze. Der Kreis am Ende des Armes steht repräsentativ für die Kondensmilch. Im Probedurchlauf ist nur ein Arm geöffnet, im Testdurchlauf beide (eigene Abbildung).

Elevated plus maze

Das „*elevated plus maze*“ (EPM) ist ein erhöhtes Modell, welches aussieht wie ein „+“-Zeichen (Abb. 12). Hierbei sind zwei Arme des Modells ohne Wände, sodass die Maus den Boden sehen kann und zwei Arme sind mit Wänden umgeben. Die jeweils gegenüberliegenden Arme haben den gleichen Aufbau. Dadurch, dass es sich um ein EPM handelt, ist das *maze* erhöht und weist nur an vier Punkten Kontakt zum Boden auf. Das EPM ist aus Holz, welches seidenmatt anthrazitgrau gestrichen worden ist. Der Boden eines jeden Armes ist 30 cm lang und 5 cm breit. Die Wände der zwei Arme sind jeweils 10 cm hoch und nach oben offen. Das EPM ist einen Meter über dem Boden platziert.

Typischerweise wird das EPM verwendet, um angstlösende Medikamente zu testen. Die Hauptfunktion des EPM besteht darin, das Konfliktverhalten der Mäuse zu erforschen. Die Mäuse werden einem Konflikt zwischen dem naturbedingten Erforschen neuer

Umgebungen und der Furcht vor neuen, offenen Bereichen ausgesetzt. Naturbedingt fühlen sich die Mäuse in dunklen Räumen wohler.

Die Mäuse wurden am Anfang des Versuches in die Schnittstelle der beiden Arme gesetzt, mit den Augen in Richtung eines geöffneten Armes. Ein Durchgang dauerte fünf Minuten und wurde zweimal pro Maus an verschiedenen Tagen (mit 3 Tagen Pause) durchgeführt. An einem Tag wurde die exzitatorische Stimulation, an dem anderen Tag die inhibitorische Stimulation über die optischen Fasern vollzogen.

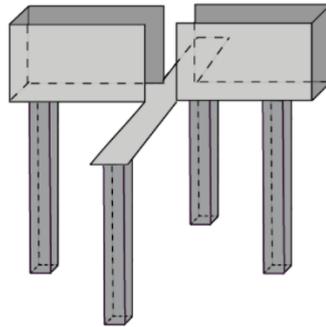


Abbildung 12: Grafisches Modell des EPM

Zu erkennen sind die zwei gegenüberliegenden geöffneten, bzw. geschlossenen Arme. Das *maze* ist auf Stelzen einen Meter oberhalb des Bodens verankert (eigene Abbildung).

2.5.3 Optogenetische Manipulation

Für die optogenetische Manipulation wurde ein drei Meter langes Rangierkabel (Thorlabs) mit der bzw. den implantierten Fasern verbunden (Abb. 13). Die Verbindung kam durch die Keramikhülse der optischen Faser und dem Keramiküberzug (Precision Fiber Products), welcher am Kabel befestigt war, zustande. Die Mäuse konnten sich im Versuchsmodell frei bewegen und waren durch das Kabel in keiner Bewegung eingeschränkt. Das Kabel wurde mit dem jeweiligen Laser, abhängig von Erregung oder Inhibition, verbunden. Kontrolliert wurden die Intensitäten der Laser über einen Stimulus Generator (Multichannel systems, STG 4004) und die dazugehörige MC Stimulus Software (Multichannel Systems, Reutlingen, Germany). Vor den Versuchen wurde die Lichtstärke des Lasers mit einem optischen Leistungsmesser gemessen (PM100D, Thorlabs).

Für die unilaterale, erregende Stimulation wurde ein Laser (DPSS, Laserglow Technologies) mit 473 nm Wellenlänge verwendet. Die Stimulation fand mithilfe eines Kabels (Fiber Cable, Thorlabs) als Verbindung zwischen Laser und den implantierten Fasern statt. Die optogenetische Manipulation der mPFC-ST Projektionen bestand aus sieben 5 ms blauen Lichtimpulsen bei 67 Hz, wiederholt bei 3 Hz. Die Lichtintensität wurde vor dem Experiment mit einem Lichtzähler (PM100D, Thorlabs) gemessen und lag bei der erregenden Stimulation zwischen 8-20 mW.

Die Inhibition wurde über ein Kabel, welches sich in zwei Kabel aufspaltet, erreicht, damit die bilaterale Inhibition stattfinden konnte. Der Laser (DPSS, Laserglow Technologies) mit 593 nm Wellenlänge hatte im kontinuierlichen Modus für diesen Versuch eine Intensität von ca. 15 mW pro Kabelende.

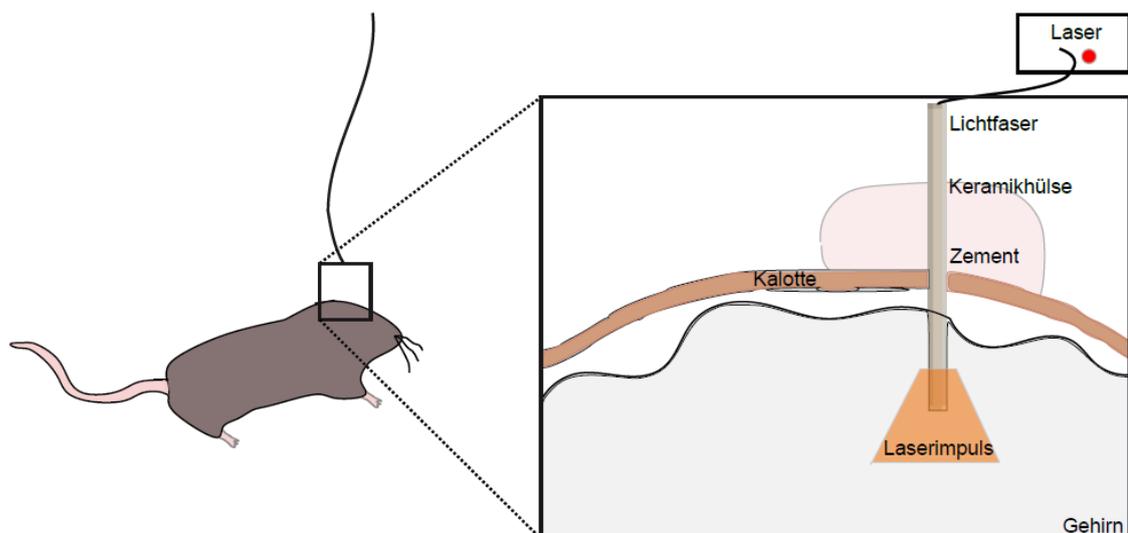


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Versuches

Dargestellt ist die Verbindung zwischen dem Laser und der implantierten Faser. Die Verbindung kommt über eine Kombination aus Keramikhülse und dentalem Zement zustande. Über die implantierte Lichtfaser wird das Licht in die gewünschte Region geleitet (eigene Abbildung).

Optogenetische Aktivierung und Inhibition im *T-maze*

Ein Durchgang pro Maus dauerte am Tag 60 Minuten und wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Dieser Durchgang bestand aus einem Probe- und einem Testdurchlauf. Während des Probedurchlaufes fand keine optogenetische Stimulation statt. Von Beginn des Testdurchlaufes, bis zum Erreichen vom Ende des gewählten Armes,

dauerte die optogenetische Manipulation an. In den ersten vier Tagen wurde optogenetisch aktivierend stimuliert und am Ende der Versuchsreihe für einen Tag bilateral inhibiert.

Optogenetische Aktivierung und Inhibierung im EPM

Im Unterschied zum *T-maze* fand die Aktivierung bzw. Inhibition nur dann statt, wenn sich die Maus in der Kreuzstelle der offenen und geschlossenen Arme befand. Sie wurde gestoppt, sobald sich das Tier mit allen vier Pfoten aus diesem Bereich entfernte. Für die Aktivierung und die Inhibierung wurden die gleichen Protokolle wie im *T-maze* verwendet.

2.5.4 Datenerfassung

Vor den Versuchen wurden die implantierten Elektroden mit einem Vorverstärker verbunden (Hs-8, Neuralynx, Bozeman, Montana USA), welcher die Artefakte (Störsignale) durch Bewegung des Kabels in Verbindung mit der Maus eliminierte. Die elektrophysiologischen Signale sind verstärkt und gefiltert (1-10000 Hz, Digital Lynx, Neuralynx) und kontinuierlich akquiriert worden bei 32 kHz. Zeitgleich zu der Aufnahme der elektrophysiologischen Signale wurden Zeitmarker für die Aktivierung des Lasers gesetzt und aufgezeichnet.

Zusätzlich wurde eine rote LED-Lampe angeschlossen, um die Position der Mäuse verfolgen zu können. Die Farbe Rot wurde verwendet, da diese Farbe die Mäuse am wenigstens in ihrer Verhaltensweise stört.

Datenverarbeitung und Analyse

Für die Datenverarbeitung der elektrophysiologischen Signale und die Verarbeitung der Positionsverfolgung der Maus wurde das Programm Neurophysiological Data Manager (NDManager) verwendet. Die weitere elektrophysiologische und verhaltensbezogene Analyse fand anhand von Neuroscope (<http://neurosuite.sourceforge.net/>) und der eigengeschriebenen individuellen Skripte für MATLAB software (MathWorks) statt.

Das lokale Feldpotential wurde durch Heruntertaktung (*Downsampling*) des Breitbandsignals auf 1250 Hz unter Verwendung des NDManagers erreicht (Hazan *et al.*, 2006). Die CFC, hier die PAC, wurde ähnlich wie in Bender *et al.* 2015 analysiert. Epochen der Theta- und Subtheta-Oszillationen wurden basierend auf einer Leistungsstärke von 3 zwischen 5-10 Hz und 2-5 Hz Frequenzbändern erfasst. Die Leistungsspektren wurden unter Verwendung der Multitapper-Methode berechnet. Die Phase wurde für die Signale mit Hilfe der Hilbert Transformation in Bänder mit 5-10 Hz und 2-5 Hz Bandpass (Bandbreitenfilter) gefiltert. Das Signal wurde folglich im Gamma-Band (30-70 Hz) selektiert, Oszillationspeaks detektiert, deren Amplitude erhalten und Theta- und Subtheta-Phasen zugeordnet. Die Oszillationszyklen wurden in 15 Phasenbereiche unterteilt, wobei die Amplitude der Gammawechselungen für jeden Bereich gemittelt wurde. Um die überregionalen PAC (in mPFC und dem ST) zu untersuchen, wurden Amplituden von Gamma-Oszillationen und Phasen langsamer Oszillationen (Theta und Subtheta) für die mPFC und die ST-Signale berechnet.

Der PAC-Modulationskoeffizient wurde aus Amplitudenphasenhistogrammen angelehnt an Bender *et al.* 2015 berechnet: $Q = r (G_{max} - G_{min}) \div (G_{max} + G_{min})$. Hierbei sind G_{max} und G_{min} die maximalen und minimalen Gammaoszillationspeaks innerhalb des langsamen Oszillationszyklus; r, Koeffizient für die angepasste Sinusfunktion.

Die Analysen wurden gemeinsam mit Prof. Alexey Ponomarenko durchgeführt.

Statistische Analyse

Die statistische Auswertung aller Ergebnisse wurde mittels der Graphpad Prism 8 (Software GraphPad Prism 8.0.1) durchgeführt. Signifikante Ausreißer wurden kontrolliert. Die Mäuse, die während der fünf Versuchstage des *T-maze* einen Tag aussetzen mussten, wurden aus dieser Auswertung entnommen, sodass sich für die eNPAC-Gruppe eine Mausanzahl von n= 8 und für die Kontrollgruppe YFP n= 9 ergab.

Die statistische Auswertung erfolgte in Orientierung an den Aufbau der Versuche. Für die Gruppenvergleiche wurden der *two tailed* t-test oder der Mann-Whitney Test, in Abhängigkeit von der Normalverteilung (Anova), verwendet.

Das Signifikanzniveau lag bei 5% ($p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)). Die Daten werden als *mean* ± Standardfehler des Mittels (SEM) dargestellt.

2.6 Histologie und Mikroskopie

Um den korrekten Applikationsort der viralen Vektoren und den Ort der Implantation der Elektroden und optischen Fasern bestimmen zu können, mussten die Gehirne der Mäuse nach den Versuchen histologisch untersucht werden.

Die Mäuse wurden nach Beendigung der Experimente tief mittels Isofluran anästhesiert. Der Thorax ist durch Spaltung des Sternums geöffnet und der linke Anteil des Rippenbogens nach außen weggeklappt worden. Der rechte Vorhof wurde nun inzidiert und die *Aorta* und die *Vena cava* abgeklemmt. Danach erfolgte durch Punktion des linken Ventrikels eine Spülung mit 10 ml NaCl-Lösung. Das gleiche Prozedere wurde mit 10 ml 4% Paraformaldehyd vollzogen.

Nach vorheriger Dekapitation wurden die Gehirne aus den Schädeln entnommen und für 24-48 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert. Wenn die Mäuse Elektroden implantiert hatten, wurden die Gehirne samt Implantat für 72-96 Stunden in Paraformaldehyd fixiert, um eine bessere Läsion der Pfade der Wolframdrähte zu erreichen. Nach Absinken der Gehirne wurden sie für mindestens 24 Stunden in 1% Phosphat gepufferte Salzlösung gelegt. Daraufhin wurde das Gehirn in 40-50 µm Scheiben mittels eines oszillierendem Vibrotoms (EMS 4500, Electron Microscopy Science) geschnitten.

Die Schnitte wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Imager 2, Zeiss) und einem Konfokalmikroskop (TCS SP8, Leica) betrachtet.

Die Lokalisation der Applikation der viralen Vektoren und der Implantationsorte der Elektroden sowie der optischen Fasern, konnte mit dieser Methode bestätigt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Histologie

18 Mäuse (C57BL) wurden mit einem Virus, der die Transduktion mit Opsin eNPAC2.0 ermöglicht hat oder einem viralen Kontrollvirus injiziert, um Projektionen des medialen präfrontalen Kortex zur subthalamischen Region darzustellen und zu manipulieren. Die Expression in den Neuronen des medialen präfrontalen Kortex und ihre Projektionen sowie die Pfade und Läsionen der optischen Fasern und Elektroden, konnten identifiziert werden. Dieser Vorgang hat vor den statistischen Analysen stattgefunden. Die Ergebnisse wurden ebenfalls in Heikenfeld *et al.*, 2020 aufgeführt.

YFP-Expression

Die erfolgreiche Expression des Opsins konnte durch die stark fluoreszierenden Neurone im medialen präfrontalen Kortex und durch die Projektionen in der subthalamischen Region (Abb. 14) nachgewiesen werden. Im histologischen Schnitt der subthalamischen Region sind die Axone der Neurone des medialen präfrontalen Kortex stark fluoreszierend. Das Opsin wurde entlang der Axone transportiert.

Die konfokale Bildgebung wies daraufhin, dass ein wesentlicher Teil der mPFC-Fasern den Hirnstiel (CP), in Nähe zum ventromedialen *Nucleus subthalamicus* und *Nucleus parasubthalamicus*, verlassen. Diese Fasern verzweigen sich folglich in diese Regionen und dorsal in die *Zona incerta* (Abb. 15).

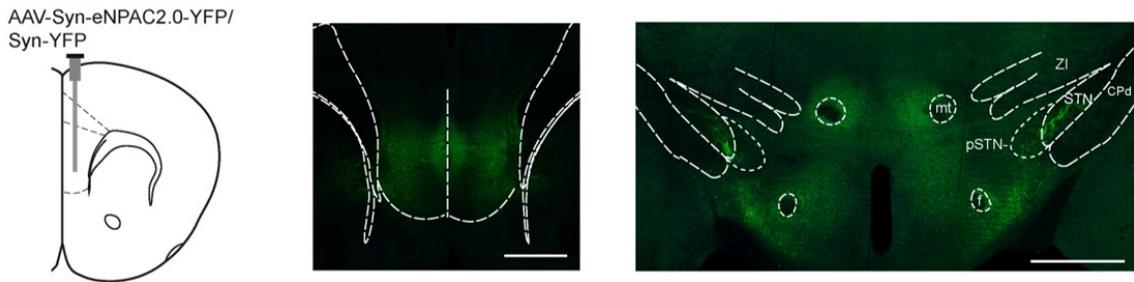


Abbildung 14: Präfrontal-subthalamische Projektionen 1

Schematische Darstellung der Injektion in den medialen präfrontalen Kortex (links); Expression von YFP in dem mPFC, Vergrößerung 750 µm (mittig); Überblick über den Verlauf in die subthalamische Region, ZI= *Zona incerta*, STN= *Nucleus subthalamicus*, pSTN= *Nucleus parasubthalamicus*, f= *fornix*, mt= *mammillothalamic tract*, Vergrößerung 1000 µm (rechts) (in Anlehnung an Heikenfeld *et al.* 2020).

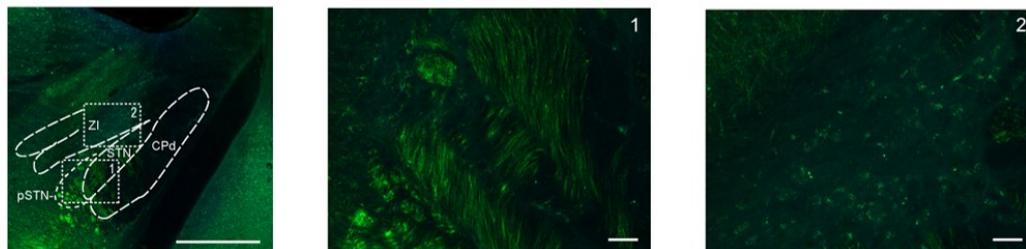


Abbildung 15: Präfrontal-subthalamische Projektionen 2

Projektionen der subthalamischen Region, ZI= *Zona incerta*, STN= *Nucleus subthalamicus*, pSTN= *Nucleus parasubthalamicus*, CPd= *cerebral Peduncle*, Vergrößerung 500 µm (links); Starke Projektionen an der Grenze zwischen STN und pSTN, Vergrößerung 50 µm (mittig, 1); Starke Projektionen in ZI, Vergrößerung 50 µm (rechts, 2) (in Anlehnung an Heikenfeld *et al.* 2020).

Lage der implantierten optischen Fasern und Elektroden

Die Lage der implantierten optischen Fasern und der Elektroden konnten verifiziert werden. Dieser Vorgang hat mithilfe eines Mikroskops stattgefunden. Die Position der optischen Fasern in der subthalamischen Region kann von den meisten implantierten Fasern anhand ihrer zurückgebliebenen Implantationspfade bestimmt werden (Abb. 16). Im Mikroskop sind vertikale Pfade zu sehen gewesen, die auf die herausgezogenen Implantate zurück zu führen sind. Diese Pfade ermöglichen die Bestimmung der Position (Abb. 17).

Die Köpfe der Mäuse, die Elektroden implantiert hatten, wurden nach der Perfusion vollständig, das heißt ohne Entfernung der Elektroden, für eine Nacht in Paraformaldehyd gelagert, wodurch eine Fixierung stattgefunden hat.

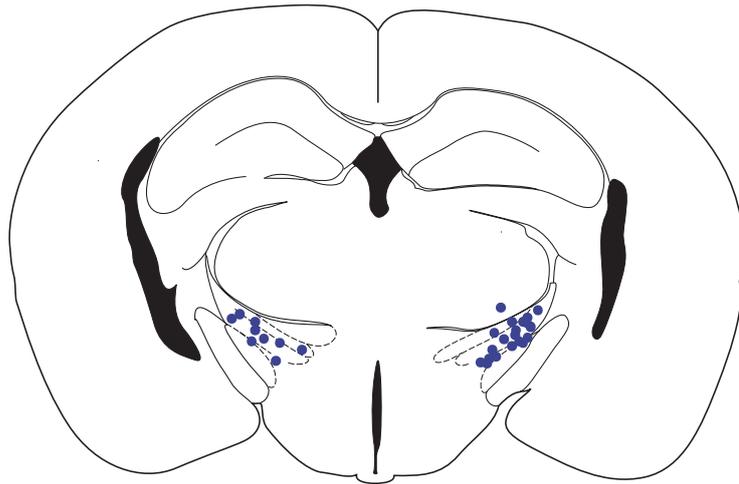


Abbildung 16: Lokalisation der implantierten optischen Fasern

Anhand von histologischen Schnitten der Gehirne und den Koordinaten der Implantation der optischen Fasern erfolgte die Lokalisation der Fasern; AP: -2,06 mm (eigene Abbildung).

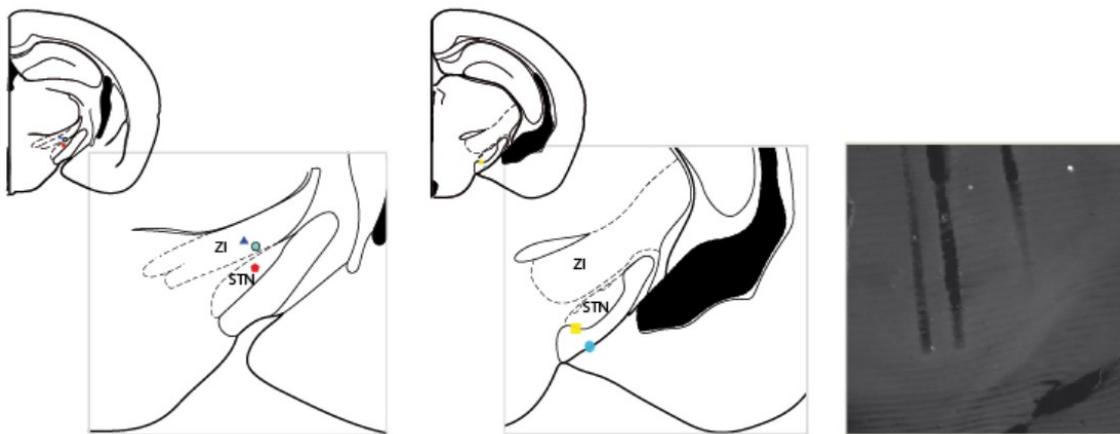


Abbildung 17: Lokalisation der implantierten Elektroden in der ST

Links (AP: -2,96 mm) ist die Lage der Elektroden, der nicht stimulierten Mäuse, dargestellt. Das hellblaue Dreieck wurde anhand der Implantationskoordinaten bestimmt. Mittig (AP: -2,54 mm) ist die Lokalisation der Elektroden ohne Stimulation dargestellt. Die zurückgebliebenen Pfade der Wolframdrähte sind rechts abgebildet. Sie münden in der subthalamischen Region (eigene Abbildung).

3.2 Ergebnisse *T-maze*

Um die Funktion der mPFC-ST Projektionen und deren PAC untersuchen zu können, wurden diese Projektionen optogenetisch manipuliert. Die Manipulation führte zu einem Verstärken der PAC im mPFC-ST Kreislauf. Deshalb wurde eine effizientere Theta-/Gamma-Koordination durch Subtheta-/Gamma-Stimulation nachgeahmt, welche zu einem weniger effizientem Verhalten geführt hat.

Die Aktivierung bzw. Inhibierung hat während des Testdurchlaufs stattgefunden und nicht während des Probedurchlaufs.

Damit das Treffen der Entscheidung der Mäuse erforscht werden konnte, wurde eine kognitive Aufgabe gewählt.

Während der optogenetischen Aktivierung der subthalamischen Region haben die Kontrolltiere eine bessere Leistung gezeigt als die eNPAC-Mäuse. Die Mäuse, welche das Opsin (Channelrhodopsin-2) exprimiert hatten, trafen während der ChR2-Aktivierung weniger korrekte Entscheidungen als die Mäuse, welche nicht das Opsin exprimiert hatten (Abb. 18 B links: *Trials* 1-20: YFP: n= 9 Mäuse, eNPAC: n= 8 Mäuse, p= 0,0017, t-test; *Trials* 21-40: YFP: n= 9 Mäuse, eNPAC: n= 8 Mäuse, p= 0,0177, t-test). Der Anteil der wiederholend korrekten Entscheidungen liegt bei den Kontrollmäusen höher als bei den eNPAC-Mäusen (Abb. 18 B rechts, cc; p= 0,0017, t-test). Die wiederholend inkorrekte Entscheidung wird häufiger von den eNPAC-Mäusen getroffen als von den Kontrollmäusen ((Abb. 18 B rechts) ii; p= 0,0037, t-test).

Die kontinuierliche Inhibition der gut trainierten Mäuse während des Testdurchlaufs des letzten Tages zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied des Lernverhaltens beider Gruppen gab (Abb. 18 D links: *Trials* 41-50: YFP: n= 9 Mäuse, eNPAC: n= 8 Mäuse, p= 0,4154, t-test). Der Anteil der wiederholend korrekten Entscheidungen liegt bei den Kontrollmäusen höher, zeigt jedoch keine Signifikanz (Abb. 18 D rechts, cc; p= 0,5129, t-test). Im Gegensatz dazu weisen die eNPAC-Mäuse mehr aufeinanderfolgende inkorrekte Entscheidungen auf (Abb. 18 D rechts, ii; p= 0,0421, t-test).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die mit Opsin injizierten Mäuse, während der optogenetischen Manipulation des mPFC-ST Kreislaufes, veränderte Verhaltensweisen, abhängig von Erregung oder Inhibition, aufweisen. Sie zeigten keine verbesserte, sondern eine geringere korrekte Anzahl, im Vergleich zu den Kontrollmäusen, während der Erregung auf. Zusätzlich hat die optogenetische Subtheta-Gamma Aktivierung die mPFC-ST Projektionen beeinträchtigt und zeitweise zu einer Instabilität der Leistung geführt (geringer Anteil wiederholender korrekten *Trials* (cc) und vergrößerter Anteil der inkorrekten Wiederholungen (ii)). Letzteres wurde ebenfalls bei der optogenetischen Inhibierung über das injizierte Halorhodopsin erzeugt, während der letzten zehn Versuchsdurchläufe.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der mPFC-ST Schaltkreis äußerst wichtig ist, sowohl für die Entscheidungsfindung als auch für die Entscheidung einer bisher gelernten Aufgabe. Hierbei kommt es eher auf das Entscheiden, basierend auf dem räumlichen Arbeitsgedächtnis, als auf das Regellernen an.

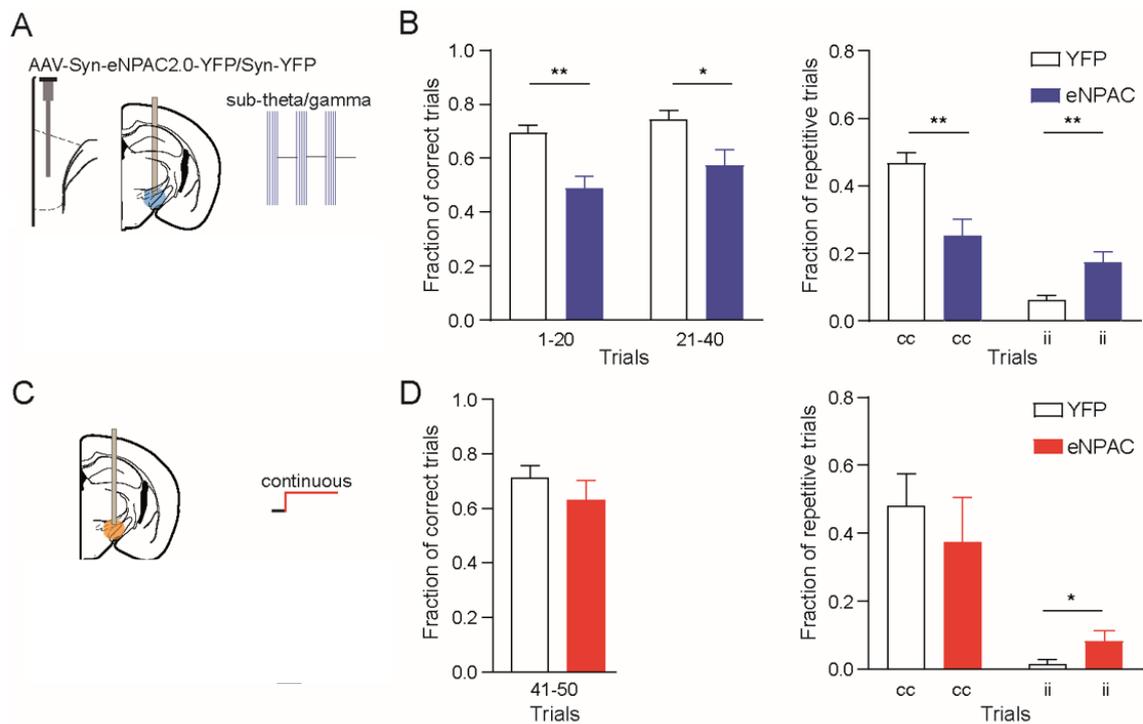


Abbildung 18: Optogenetische Manipulation des mPFC-ST Schaltkreises beeinflusst die Leistung im T-maze

A Aufbau des Experimentes und optogenetische Aktivierung mit einem diskontinuierlichen Stimulus; **B** links: Anzahl der korrekt gewählten Entscheidungen ist während der Aktivierung gesunken (*Trials* 1-20: YFP: n= 9 Mäuse, eNPAC: n= 8 Mäuse; $p < 0,01$, t-test), *Trials* 21-40: YFP: n= 9 Mäuse, eNPAC: n= 8 Mäuse, $p < 0,05$); **B** rechts: Anzahl der wiederholt korrekten Entscheidungen ist gesunken (cc, YFP: n= 9 Mäuse, eNPAC: n= 8 Mäuse, $p < 0,01$), Anzahl der wiederholt inkorrekten Entscheidungen gestiegen (ii, YFP: n= 9 Mäuse, eNPAC: n= 8 Mäuse, $p < 0,01$); **C** Aufbau des Experimentes und optogenetische Inhibition mit kontinuierlichem Stimulus; **D** links: Anzahl der korrekt gewählten Entscheidungen (*Trials* 41-50: YFP: n= 9 Mäuse, eNPAC: n= 8 Mäuse; $p = 0,4$), rechts: Anzahl der wiederholt inkorrekten und korrekten Entscheidungen (cc, $p = 0,5$; ii, $p < 0,05$). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (in Anlehnung an Heikenfeld *et al.* 2020).

Die Mäuse sind während der Versuche im T-maze mit einer LED-Leuchte verbunden. Diese ermöglicht es, die Mäuse im Versuchsmodell zu verfolgen und ihre Position über eine Videokamera aufzuzeichnen, da die Versuche in einem abgedunkelten Raum stattfanden. In Abbildung 19 sind repräsentativ Trajektorien (Bewegungslinien) von zwei

Versuchsdurchgängen (jeweils Aktivierung und Inhibition) abgebildet. In beiden Durchgängen hat die Maus die Aufgabe bzw. die Wahl korrekt ausgeführt.

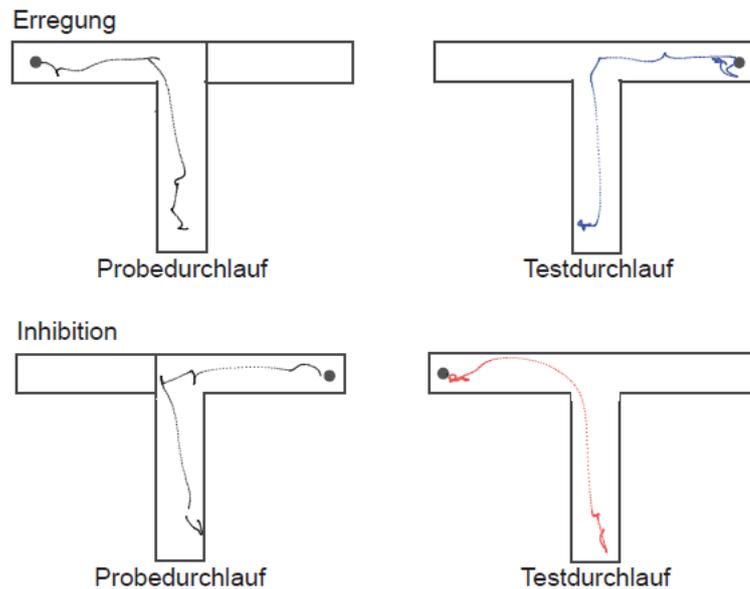


Abbildung 19: Beispielhafte Trajektorien einer Maus während Aktivierung und Inhibition im *T-maze*

Dargestellt sind repräsentativ zwei Durchgänge, bestehend aus Probe- und Testdurchlauf einer Maus. Während des Probedurchlaufs (schwarz) hat keine Stimulation stattgefunden. Die optogenetische Manipulation findet nur im Testdurchlauf statt und ist in blau (Aktivierung) und rot (Inhibition) abgebildet. Die Trajektorien einer Maus pro Durchlauf sind dargestellt (eigene Abbildung).

3.3 Ergebnisse *elevated plus maze*

Die Entscheidungen im *T-maze* werden aufgrund des (räumlichen) Arbeitsgedächtnisses getroffen, können jedoch durch verschiedene Aktivitäten der Mäuse oder auch durch emotionale Prozesse, aufgrund der optogenetischen Stimulation, beeinflusst werden. Um diese Möglichkeiten untersuchen bzw. ausschließen zu können, wurde das EPM als weiteres Versuchsmodell hinzugezogen. Hierbei werden die Effekte der optogenetischen Manipulation auf emotional-getriebene Prozesse beobachtet. Die Mäuse sind in einem Konflikt zwischen der naturbedingten Furcht vor offenen Räumen und dem Interesse an neuen Eindrücken. Die Mäuse befanden sich pro Versuchsdurchlauf (einmal Aktivierung, einmal Inhibition) für je fünf Minuten in dem Modell und es wurden drei zu beobachtende Parameter bestimmt. Die Gesamtzeit, in welcher sich die Mäuse in der Kreuzung der Arme und somit dem Ort der Entscheidungsfindung, wurde gemessen (Abb. 20 B und D links). Zusätzlich ist beobachtet worden, wie aktiv die Mäuse während der Versuche

waren (Abb. 20 B und D Mitte). Als dritter Parameter wurde das Angstverhalten beobachtet (Abb. 20 B und D rechts). Für die statistische Auswertung ist ein *unpaired t-test*, zweiseitig, verwendet worden.

Es zeigen sich keinerlei Effekte beider Gruppen, unabhängig ob im Versuch erregt oder inhibiert worden ist. In keinem vorbestimmten Parameter stellt sich eine Signifikanz dar. Es ist lediglich eine Tendenz zu erkennen, dass die Zeit, welche die Mäuse in der Schnittstelle verweilen, um eine Entscheidung für einen offenen oder geschlossenen Arm zu treffen, bei der optogenetischen Stimulation, unabhängig ob Aktivierung oder Inhibition, des mPFC-ST Weges verlängert ist.

Die Ergebnisse indizieren, dass die optogenetische Aktivierung weder die Motoraktivität noch das Angstverhalten beeinflusst hat (Abb. 20 B). Ebenso weisen die Ergebnisse der Hemmung des mPFC-ST Schaltkreises daraufhin, dass die Hemmung keinen Einfluss auf die Entscheidungsfindung im EPM oder auf das Angstverhalten der Mäuse hat.

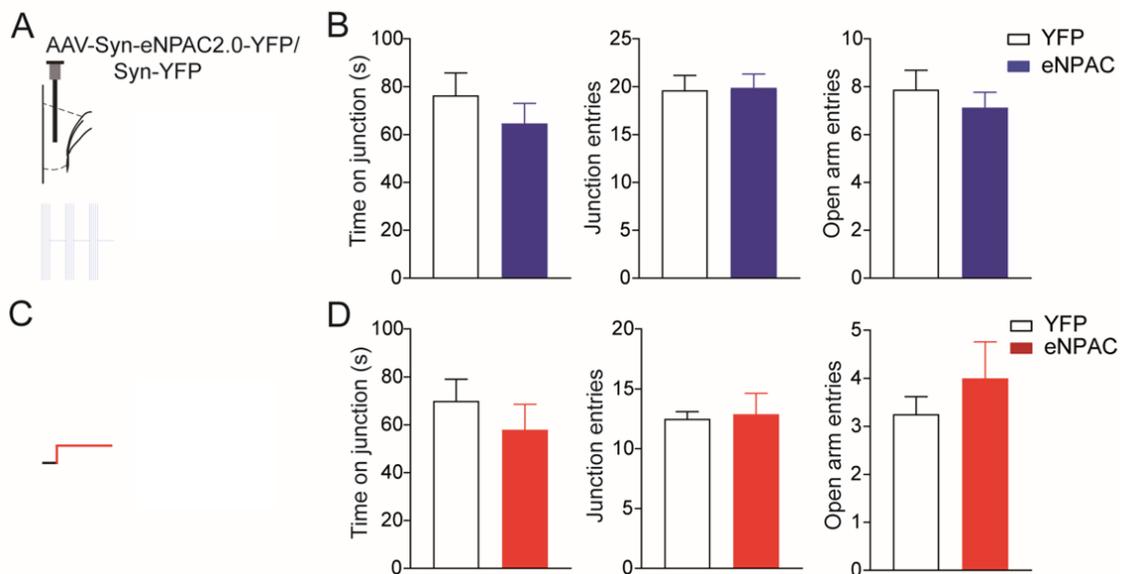


Abbildung 20: Optogenetische Manipulation des mPFC-ST Schaltkreises mindert nicht die Leistung im EPM

A Aufbau des Experimentes und optogenetische Aktivierung mit einem diskontinuierlichen Stimulus. **B** Zeit in der Entscheidungszone (links, *Time on junction*, $p=0,4$, Mann-Whitney test), Stärke der Aktivität (mittig, *Junction entries*, YFP: $n=8$ Mäuse, eNPAC: $n=8$ Mäuse, $p=0,9$, t-test) und Angst (rechts, *Entries to open arms*, $p=0,4$). **C** Inhibition mit einem kontinuierlichen Stimulus. **D** Zeit in der Entscheidungszone (links, *Time on junction* ($p=0,2$, Mann-Whitney test), Stärke der Aktivität (mittig, *Junction entries*, YFP: $n=8$ Mäuse, eNPAC: $n=8$ Mäuse, $p=0,8$, t-test) und Angst (rechts, *Entries to open arms*, $p=0,4$). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (in Anlehnung an Heikenfeld *et al.* 2020).

Die dargestellten Trajektorien bzw. Bewegungsbahnen (Abb. 21) einer Maus während Aktivierung oder Inhibition zeigen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Verhaltensweisen gab. Die Maus hat sich sowohl in den geschlossenen als auch in den offenen Armen bewegt.

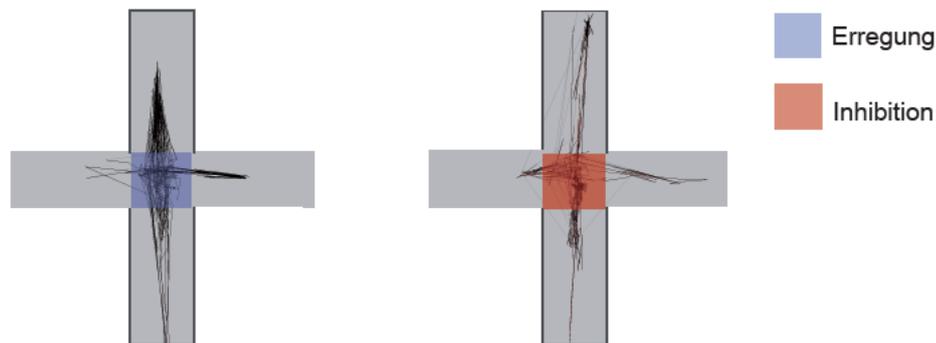


Abbildung 21: Repräsentative Trajektorien einer Maus während Erregung und Inhibition im EPM

Darstellungen der Bewegungsbahnen während Aktivierung und Inhibition (100 s). Die Maus hat sowohl die offenen als auch geschlossenen Arme während der optogenetischen Manipulation besucht (eigene Abbildung).

3.4 Ergebnisse Elektrophysiologie

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Koordination von Oszillationen im medialen präfrontalen Kortex und der subthalamischen Region zeigen, dass eine Kopplung, im Sinne eines PAC, zwischen den beiden Regionen vorliegt. Dies ist anhand der abgeleiteten lokalen Feldpotentiale zu erkennen. Das bedeutet, dass in bestimmten Phasen der langsamen Oszillationen (hier Theta und Subtheta), schnellere Oszillationen (Gamma, 60-90 Hz) „eingelagert“ sind.

Um die Koordination der Oszillationen erforschen zu können, wurde das lokale Feldpotential abgeleitet, während implantierte Mäuse im Versuchsmodell des *T-maze* gelernt haben. Das lokale Feldpotential wurde über die implantierten Elektroden im medialen präfrontalen Kortex und in der subthalamischen Region abgeleitet.

Diese Signale beider Regionen zeigten vorwiegend rhythmische Aktivität im Theta- (5-10 Hz) und Subtheta- (2-5 Hz) Band (Abb. 22 A und B). Die Amplitude der Gamma-Oszillation (30-70 Hz) im medialen präfrontalen Kortex unterlag einer periodischen Veränderung, abhängig von der Änderung der langsamen Phase (Abb. 22 C).

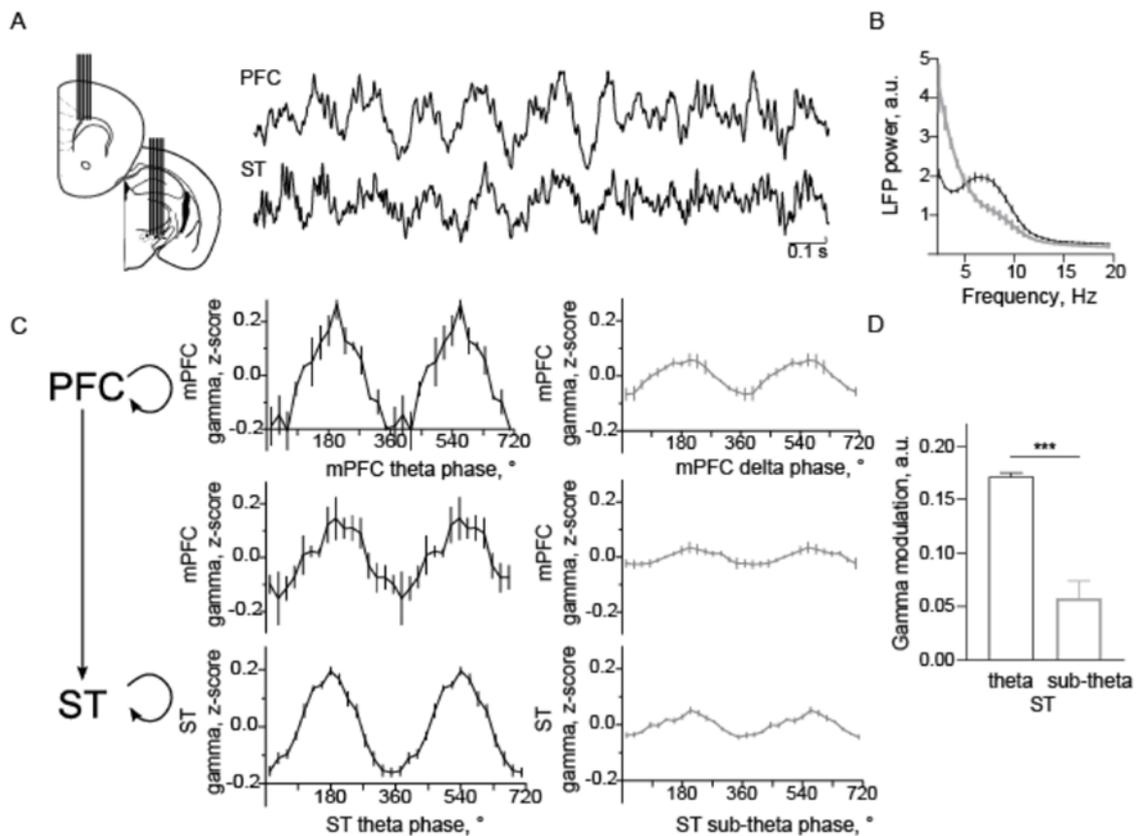


Abbildung 22: Rhythmische Koordination von mPFC und ST

A LFP zeigt während Theta- und Subtheta-Epochen Gamma-Oszillation. **B** Spektrale Leistungsdichte des LFP im ST während Theta- und Subtheta-Epochen ($n=5$ Mäuse). **C** Phase-amplitude coupling (PAC) von Theta- und Gamma-Oszillationen vs. Subtheta- und Gamma-Oszillationen im mPFC (oberer Graph), zwischen dem mPFC und dem ST (mittlerer Graph, $n=3$ Mäuse) und im ST (unterster Graph, $n=5$ Mäuse). **D** PAC-Größe während Theta- und Subtheta-Oszillation im ST ($p < 0,0001$, t-test). Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt (Anlehnung an Heikenfeld *et al.* 2020).

Das aufgezeichnete lokale Feldpotential in der subthalamischen Region hat ebenfalls gezeigt, dass Gamma-Oszillationen von örtlich vorkommenden Theta- und Subtheta-Rhythmen moduliert worden sind (Abb. 22 C). Es konnte nicht nur eine PAC in dem mPFC und der ST festgestellt werden, sondern auch eine PAC über beide Regionen. Diese wurde durch Änderungen der Amplitude der mPFC Gamma-Oszillation, passend zur Phase der ST Subtheta- und Theta-Oszillationen, angezeigt (Abb. 22 C), während die Änderungen der Gamma-Amplitude der langsamen Phase, in den zwei verschiedenen Regionen koordiniert vorlagen und sich miteinander änderten. Im Gegensatz dazu war die Größe des PAC abhängig von der vorliegenden Epoche. Bei der vorliegenden Theta-

Epoche war sie größer als bei der Subtheta-Epoche (Abb. 22 D). Somit ist die Stärke der PAC während der Theta-Oszillation deutlicher im Vergleich zur Subtheta-Epoche.

4 Diskussion und Schlussfolgerung

In dieser experimentellen Arbeit wurden *in vivo* elektrophysiologische Signale abgeleitet, während der mPFC-ST Schaltkreis der Mäuse über implantierte Fasern optogenetisch aktiviert bzw. inhibiert worden ist. Die Verwendung neuer Opsine (eNPAC2.0) ermöglichte es, die Leitungsbahn zwischen dem medialen präfrontalen Kortex und der subthalamischen Region und deren Funktion besser verstehen zu können. Zur Analyse des Entscheidungsverhaltens wurde das Versuchsmodell des *T-maze* verwendet. Angstverhalten *versus* Neugier wurde anhand des EPM getestet.

Die Ergebnisse liefern einen Beweis für die bisherigen Annahmen aus klinischen und elektrophysiologischen Studien, dass es eine Verbindung zwischen dem präfrontalen Kortex und der subthalamischen Region gibt, die für die kognitive Kontrolle und die Aktionsselektion eine hervorzuhebende Rolle spielt (Wiecki und Frank 2013; Zavala *et al.*, 2015; Kelley *et al.*, 2018; Bonnevie und Zaghoul 2019). Unsere Studie weist auf ein Zusammenspiel von einem vorgeschalteten Schaltkreis, dynamischen Netzwerkoszillationen, verschiedenen Verhaltensweisen und unterdrückten Antworten hin. Es konnte bislang durch optogenetische Manipulation der Efferenzen des STN gezeigt werden, dass die Verschaltungen notwendig und ausreichend sind zur Verminderung bzw. Veränderung von Verhaltensantworten (Fife *et al.*, 2017).

Eine CFC im Sinne einer PAC kann aufgezeigt werden. Koordiniert sind diese beiden Regionen über eine schnelle (Gamma-) Oszillation, welche hauptsächlich über eine Theta-Frequenz moduliert wird.

Das Besondere dabei ist die Koordination. Diese findet zwischen zwei unterschiedlichen Gehirnarealen statt. Die langsame Oszillation im medialen präfrontalen Kortex moduliert die schnellere Oszillation in der subthalamischen Region. Somit liegt eine Koordination zwischen den beiden Bereichen vor und diese ist maßgeblich an der Funktionsausübung der Regionen beteiligt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass während der optogenetischen Manipulation das Muster der Ableitungen verändert vorliegt und die Mäuse folglich weniger korrekte Entscheidungen treffen.

Die Aktivierung des mPFC-ST Schaltkreises, mittels Subtheta-/Gamma-Stimulierung anstelle der regulären Koordination, führte zu einer veränderten Performance im Versuchsmodell der Entscheidungsfindung. Somit liegt eine Änderung in der Entscheidungsdynamik vor. Die Aktivierung oder Inhibierung hat im EPM, zur

Untersuchung des Angstverhaltens und des Neugierverhaltens, keinen Einfluss auf die Verhaltensweisen gezeigt.

Auf spezifische Anregungen und Limitationen wird in den unten aufgeführten Abschnitten näher eingegangen.

4.1 Methodische Anmerkungen

Histologie

Aufgrund der konfokalen Bildgebung konnte dargestellt werden, dass bei Mäusen Fasern (Efferenzen) vom medialen präfrontalen Kortex zur subthalamischen Region ziehen. Diese verlaufen innerhalb des Hirnstiels (CP) und verlassen diesen auf Höhe des medial ventralen *Nucleus subthalamicus*. Die Projektionen verzweigen sich in die subthalamische Region, in den *Nucleus subthalamicus* und die *Zona incerta*. Wie beschrieben, wurden ebenso präfrontale Afferenzen zur subthalamischen Region in Primaten und Ratten aufgezeigt (Canteras *et al.*, 1990; Haynes und Haber 2013; Kita *et al.*, 2014).

Mittels unterschiedlicher Tracer konnten diese Verbindungen in anderen Studien erkennbar gemacht werden. Mit einem retrogradem viralen Tracer konnten 2018 die Projektionen von dem mPFC zur ZI dargestellt werden (Chou *et al.*, 2018). Ein chemischer Tracer wurde für die Darstellung der Fasern von mPFC zu STN in Primaten und Ratten verwendet (Parent und Hazrati 1995). Diese unterstützen ebenfalls die bildgebenden Verfahren von Aron *et al.* 2007. Bei Primaten überschneiden sich Afferenzen vom assoziativen und limbischen präfrontalen Kortex zum *Nucleus subthalamicus* gegenseitig und zusätzlich mit motorischen Afferenzen. Im Gegensatz dazu verlaufen die Projektionen vom *Cortex cerebri* zum *Striatum* getrennt von diesen. Auf der Ebene des *Nucleus subthalamicus* kann es zu einer Interaktion und Integration dieser Informationsströme kommen (Aron *et al.*, 2007).

Starke Projektionen wurden von dem infralimbischen und prälimbischen Kortex zur *Zona incerta* gezeigt (Chou *et al.*, 2018), jedoch nicht weiter auf die Rolle bei der Aktionsselektion bzw. Entscheidungsfindung eingegangen.

Die *Zona incerta* und der *Nucleus subthalamicus* bei Ratten zeigten einen ähnlichen topografischen Aufbau der kortikalen Afferenzen, was auf eine mögliche funktionelle

Koordination dieser beiden Regionen hinweist (Kita *et al.*, 2014). Besonders der Einfluss auf die Funktion des thalamo-kortikalen Signalweges lag im Vordergrund (Barthó *et al.*, 2002; Barthó *et al.*, 2007; Halassa und Acsády 2016).

Die Bilder der konfokalen Bildgebung weisen Ähnlichkeiten der Topographie der mPFC-ST Projektionen in Mäusen im Vergleich zu Ratten und Primaten auf.

Viele Efferenzen des medialen präfrontalen Kortex ziehen mit prälimbischen und infralimbischen kortikalen Efferenzen zur Zielregion (Heidbreder und Groenewegen 2003; Gabbott *et al.*, 2005), der *Zona incerta* und dem ventral lateralen *Nucleus subthalamicus*. Beide Regionen sind in autonomen Regulationen und affektiven Prozessen involviert.

Bei der Implantation der optischen Fasern und Elektroden wurden keine Farbmarker verwendet. Um die Bestimmung der Lokalisation dieser zu verbessern bzw. zu vereinfachen, könnte über die Applikation eines Farbstoffes auf den Faser- und Elektrodenspitzen vor der Implantation nachgedacht werden. Hierbei müsste ein Farbstoff verwendet werden, der keinerlei Reaktion im Gewebe der Maus herbeiführt und trotz mehrstündiger Lagerung in Paraformaldehyd beständig bleibt.

Aufbau der Experimente

Es wurden insgesamt fünf Tieren Elektroden implantiert. Zwei von diesen haben zusätzlich die Opsine in einer vorherigen Operation erhalten. Die Anzahl der Mäuse, denen Elektroden in den mPFC und dem ST implantiert worden sind, könnte in Folgeversuchen erhöht werden. Dementsprechend könnten mehr Signale ausgewertet und ein stärkerer Einblick in das CFC erlangt werden, während zugleich den Statistiken eine höhere Bedeutung zugeschrieben werden könnte.

Für das EPM wurden die Maße 30 x 5 x 10 cm verwendet. In der Literatur sind widersprüchliche Bauweisen zu finden. Es wird von manchen Autoren angenommen, dass die Breite eines Armes von 5 cm zu gering ist, da sich die Maus eingeschränkt fühlen könnte. Teilweise wird befürwortet, die doppelte Breite des Körpers einer Maus als Referenz für die Breite des Armes zu verwenden, damit sich das Tier im EPM erstens nicht verloren und zweitens nicht eingeeengt fühlt (Deacon und Rawlins 2006). Widersprüchlich ist jedoch, dass alle Tiere im verwendeten Versuchsmodell eine hohe

Aktivität in allen Armen, egal ob offen oder geschlossen, gezeigt haben und keinerlei Einschränkung stattgefunden hat. Der Versuchsablauf hat wie in Klavir *et al.* 2017 beschrieben stattgefunden.

4.2 Der mPFC-ST Schaltkreis bei der Entscheidungsfindung und LFP

In dem ersten beschriebenen Versuchsmodell (*T-maze*) ist davon auszugehen, dass die Kontrollmäuse nach dem Lernprozess im Durchschnitt zu 70-80%, korrekte Entscheidungen treffen (Shoji *et al.*, 2012). Dies bedeutet, dass sie zu 80% nach dem Probedurchlauf den anderen, vorher nicht besuchten Arm, auswählen. Dieses „Ziel“ wird Literaturangaben zufolge in der Regel nach 40 Durchgängen nach Versuchsbeginn erreicht (Korotkova *et al.*, 2010).

Es liegen Hinweise vor, dass der mediale präfrontale Kortex an der Kontrolle der Aktionen bzw. Handlungen beteiligt ist (Miller und Cohen 2001). Die Leistung der Tiere in einem Test, wie dem *T-maze*, ist abhängig von einem vollkommen funktionell intaktem mPFC (Horst und Laubach 2009; Rossi *et al.*, 2012; Sapiurka *et al.*, 2016), welcher vorausgehende Entscheidungen signalisiert (Ito *et al.*, 2015; Spellman *et al.*, 2015). Der erste Teil der Aufgabe im *T-maze*, der Probedurchlauf, basiert auf Afferenzen des ventralen *Hippocampus* (Spellman *et al.*, 2015). Die optogenetische Manipulation des präfrontalen-thalamischen-hippocampalen-Schaltkreises (Ito *et al.*, 2015; Maisson *et al.*, 2018) führte zu einer Beeinträchtigung, im Sinne einer Verschlechterung, der Leistung im *T-maze*. Ebenfalls sind aufsteigende Fasern bspw. der Nucleus supramammillarius, Bestandteil des limbischen Systems, von Bedeutung für den *Cortex cerebri* (Ito *et al.*, 2015).

Die oben aufgeführten Ergebnisse implizieren, dass die mit Opsin injizierten Mäuse, im Vergleich zu den Kontrollmäusen, nicht gelernt haben. Besonders hervorzuheben ist der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe zu den mit Opsin injizierten Mäusen am vierten Tag der Aktivierung. Die YFP-Gruppe traf im Durchschnitt an diesem Tag zu 74,4%, die eNPAC-Gruppe zu 57,5% die richtige Entscheidung und lag somit weit unter den angestrebten 80%. Die oben genannten Ergebnisse indizieren, dass es zu einer Störung des mPFC-ST Schaltkreises durch die optogenetische Erregung der subthalamischen Region kommt. Diese Störung verhindert, dass die Mäuse die korrekte Entscheidung treffen können. Die Erregung hat ebenfalls verhindert, dass die Mäuse häufiger als die

Kontrollmäuse korrekte aufeinanderfolgende Entscheidungen treffen konnten. Sie haben folglich im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant häufiger falsche, aufeinanderfolgende Entscheidungen getroffen. Die Kontrollmäuse haben somit eine höhere Beständigkeit in ihren Entscheidungen aufgezeigt, da sie häufiger korrekte und seltener inkorrekte aufeinanderfolgende Entscheidungen getroffen haben, im Vergleich zu den eNPAC-Mäusen während Erregung.

Diese Störung kann womöglich durch eine Überstimulation der Neurone in diesem Bereich Zustande kommen. Die Ergebnisse implizieren, dass der mPFC-ST Schaltkreis an der Entscheidungsfindung beteiligt ist und dieser Bestandteil der Regulation bei einer zielgerichteten kognitiven Aufgabe ist (*T-maze*) (Heikenfeld *et al.*, 2020).

Eine optogenetische Intervention mit diesem Koordinationsmuster hat eine korrekte Entscheidungsfindung im *T-maze* stark beeinträchtigt und eine Veränderung in der Entscheidungsdynamik aufgezeigt. Durch die Aktivierung bzw. Depolarisation der Neurone während der Erregung, ist der Ablauf der geregelten Kommunikation beider Neuronenpopulationen und somit die PAC gestört worden. Es kam zu einem Entkoppeln dieser beiden koordinierten Gehirnareale. Ähnliche Manipulationen in anderen Gehirnregionen haben ebenfalls neuronale Aktivität nach sich gezogen (Bender *et al.*, 2015; Carus-Cadavieco *et al.*, 2017).

Bei den durchgeführten Versuchen ging es um gedächtnisgesteuerte Entscheidungen, insbesondere der Entscheidungsfindung aufgrund von vorher erlernten Ereignissen im Probedurchlauf. Das Hervorrufen und Einbeziehen von vergangenen Erinnerungen und die kurze Beibehaltung von jüngsten Erfahrungen ermöglichen es dem medialen präfrontalen Kortex, individuelle, adaptive Entscheidungen zu treffen. Diese Entscheidungen können dann über die Projektionen an kortikale und subkortikale Areale weitergeleitet werden, damit dies ein adaptiertes Verhaltensmuster zur Folge hat. Neben den Projektionen zum *Hippocampus* ist der mPFC ebenfalls mit den Raphekernen verbunden. Diese Verbindung tritt ebenfalls bei der Entscheidungsfindung in den Vordergrund, jedoch in Situationen der Verzweiflung (Warden *et al.*, 2012).

Über die implantierten Elektroden in insgesamt fünf Mäusen ließen sich Rückschlüsse auf die elektrophysiologischen Vorgänge innerhalb des Gehirns bzw. zwischen dem mPFC und der ST, schließen. Die Mäuse befanden sich während der Ableitung im *T-*

maze. Die Ableitungen der lokalen Feldpotentiale in dem medialen präfrontalen Kortex und in der subthalamischen Region weisen auf eine CFC hin.

Basierend auf der Korrelation der Entladungsphasen und der LFP-Kohärenz deuten diese und frühere Studien daraufhin, dass gedächtnisgesteuerte Entscheidungen durch Theta-Koordination zwischen dem mPFC und dem dorsalen *Hippocampus* (Jones und Wilson 2005; Benchenane *et al.*, 2010; Hyman *et al.*, 2010) und durch Gamma-Oszillation zwischen dem mPFC und dem ventralen *Hippocampus* (Spellman *et al.*, 2015) moduliert und gesteuert werden. Es konnte ebenfalls in einer anderen Studie nachgewiesen werden, dass es eine Synchronisation zwischen dem mPFC und dem lateralen Septum, bei gleichem Versuchsaufbau wie dem hier gewählten, nur mit unterschiedlichen Belohnungen, gibt (Carus-Cadavieco *et al.*, 2017). Weitere Verbindungen des mPFC zu dem Nucleus accumbens, ebenfalls Bestandteil der Basalganglien, signalisiert in Abhängigkeit von der Menge der Afferenzen, Abneigung (Lee *et al.*, 2014) und Belohnung (Ma *et al.*, 2014).

Es liegt ebenfalls eine funktionelle Interaktion zwischen dem medialen präfrontalen Kortex und dem motorischen *Cortex cerebri* vor, indem der präfrontale Kortex kurzzeitig Informationen zwischenspeichern kann, damit es im Top-Down Prozess zur bestmöglichen Modulation der verschiedenen Signale kommt (Narayanan und Laubach 2006). Dementsprechend wird ebenfalls angenommen, dass präfrontale und motorische Komponenten des hyperdirekten Weges zum *Nucleus subthalamicus* der Basalganglienschleife, unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Verhaltenskonflikten haben (Aron *et al.*, 2016). Dem *Nucleus subthalamicus* wird die Funktion des „Pausierens“ zugeschrieben. Dies bedeutet, dass es zeitweise zum Stopp des Informationsflusses kommt, bis eine modulierte Entscheidung als Efferenz weitergeleitet werden kann (Aron *et al.*, 2016). Eine Veränderung des oben beschriebenen hyperdirekten Weges ist Hauptansatzpunkt der Tiefen Hirnstimulation.

Zum ersten Mal wurde 2014 eine Kopplung dieser beiden untersuchten Regionen nachgewiesen (Zavala *et al.*, 2014). Elektrophysiologisch konnten wir eine CFC im Sinne einer PAC vorweisen. Es liegt eine langsame rhythmische Theta-Aktivität mit einer modulierten Gamma-Amplitude vor. Das Besondere liegt in der Koordination, da diese zwischen zwei örtlich getrennten Gehirnarealen stattfindet. Die langsame Oszillation im medialen präfrontalen Kortex moduliert die schnellere Oszillation in der subthalamischen

Region. Somit liegt eine Koordination zwischen den beiden Bereichen vor und diese ist maßgeblich an der Funktionsausübung dieser Regionen beteiligt, da während der optogenetischen Aktivierung das Muster verändert vorliegt und die Mäuse folglich weniger korrekte Entscheidungen treffen. Zu einem verstärkten Theta-Band kommt es im präfrontalen Kortex und im *Nucleus subthalamicus* bei Entscheidungen, die mit einem primären Konflikt einhergehen (Cavanagh *et al.*, 2011; Fumagalli *et al.*, 2011; Brittain *et al.*, 2012; Zavala *et al.*, 2013; Zavala *et al.*, 2014). Die Oszillationen im medial präfrontalen Kortex, dort wird ebenfalls der erste Konflikt wahrgenommen (Taylor *et al.*, 2007), treiben bzw. stimulieren die Oszillationen im STN während Konflikten (Zavala *et al.*, 2015). Diese Signale beider Regionen zeigten vorwiegend rhythmische Aktivität im Theta- (5-10 Hz) und Subtheta- (2-5 Hz) Band (Abb. 22 A und B). Die Amplitude der Gamma-Oszillation (30-70 Hz) im medialen präfrontalen Kortex unterlag einer periodischen Veränderung, abhängig von der Änderung der langsamen Phase (Abb. 22 C). Diese Erkenntnisse stützen bereits veröffentlichte Berichte über PAC im medial präfrontalen Kortex (Tamura *et al.*, 2017).

Im Gegensatz zu den aufgeführten Argumenten zeigen einige Studien, dass es zur Beta-Band Aktivität während des „Pausierens“ von Aktionen im STN kommt (Kühn *et al.*, 2004; Aron und Poldrack 2006; Eagle *et al.*, 2008; Isoda und Hikosaka 2008; Schmidt *et al.*, 2013; Benis *et al.*, 2014).

Hier konnte durch die Manipulation der mPFC-ST Projektionen die dynamische Synchronität der Areale gezeigt werden. Bei der Entscheidungsfindung mittels Konfliktfrage liegt eine Aktivität im Theta-Bereich vor. Diese kann unterbrochen werden und sich zur Beta-Oszillation verändern durch kortiko-striatalen Input. Es kommt zum Pausieren von Aktionen (Bogacz und Gurney 2007).

Dies ist ein Einblick in die elektrophysiologischen Vorgänge des mPFC-ST Schaltkreises. Die Ergebnisse sollten anhand von Versuchen weiter erforscht werden, damit wissenschaftliche Forschung in diesem Bereich weiter vorangetragen wird. Insbesondere auf den Hinblick zur THS können womöglich relevante Rückschlüsse getroffen werden.

4.3 mPFC-ST Schaltkreis bei Angstverhalten

Die beiden untersuchten Gruppen haben keine signifikanten Unterschiede in den vorab bestimmten Parametern aufgezeigt. Sowohl die Gesamtzeit, in welcher sich die Maus in

der Schnittstelle befand, als auch die Häufigkeit der besuchten offenen Arme und die generelle Aktivität, gemessen an den gesamten Besuchen der Schnittstelle, weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Es ist lediglich eine Tendenz in der optogenetisch gehemmten Gruppe zu erkennen, da sich diese länger in der Schnittstelle beider Arme befanden, bevor sie eine Entscheidung treffen.

Typischerweise wird dieses Versuchsmodell zur Analyse des Angstverhaltens von Mäusen verwendet. In der pharmakologischen Branche werden anxiolytische Medikamente anhand des EPM getestet (Griebel und Holmes 2013). Das Angstverhalten der eNPAC-Mäuse zeigt keine signifikanten Unterschiede zu den YFP-Mäusen auf. Ein Indikator dafür wäre eine wesentlich geringere oder höhere Anzahl der besuchten offenen Arme gewesen. Die optogenetisch gehemmten Mäuse zeigten lediglich eine Tendenz zur längeren Entscheidungsfindung, da sie mehr Zeit in der Schnittstelle verbracht haben.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich die mit Opsin injizierten Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen weder aktiver, noch neugieriger oder ängstlicher verhalten haben.

Mit diesem Versuch wurde ebenfalls geprüft, ob die Injektion des Opsins einen negativen Effekt auf das Verhalten ausübt. Durch das vorliegende Ergebnis kann die Annahme, dass es zu einer Verhaltensveränderung aufgrund des Opsins kommt, nicht bestätigt werden, da sich beide Gruppen gleich verhalten haben.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde zur Untersuchung des medialen präfrontalen-subthalamischen Schaltkreises die optogenetische Manipulation, im Sinne einer Aktivierung und Inhibition, verwendet. Elektrophysiologische Ableitungen aus der subthalamischen Region und dem medialen präfrontalen Kortex führten zu der Erkenntnis, dass eine Theta-Gamma PAC vorliegt.

Die optogenetische Manipulation zeigt die Bedeutung der mPFC-ST Theta-Gamma PAC für Entscheidungsfindung im *T-maze*. Im Gegensatz dazu wurde kein Effekt der oszillatorischen Koordination bei der Konfliktentscheidung zwischen Angst und Neugier deutlich, welcher anhand des EPM ermittelt.

Insgesamt implizieren die Ergebnisse, dass der mediale präfrontale Kortex und die subthalamische Region an der Entscheidungsfindung beteiligt sind. Die vorherrschende

Kommunikation zwischen den beiden Regionen ist ein CFC im Sinne einer PAC. Die Frequenzbänder im Subtheta- bzw. Theta-Bereich, modellieren die Gamma-Amplitude. Dieses Vorkommen konnte durch die optogenetische Manipulation gestört werden.

Projektionen des medialen präfrontalen Kortex sind in beiden subthalamischen Regionen, der *Zona incerta* und dem *Nucleus subthalamicus*, vorzufinden und wurden mittels eines konfokalen Mikroskops dargestellt.

Histologisch betrachtet könnten weitere Aspekte interessant sein. Mit einem retrograden oder anterograden Tracer, je nach Injektionsort, sollten in weiteren Versuchen die Projektionen bzw. die Verzweigungen weiter untersucht werden. Demnach würde eine Injektion in die *Zona incerta/Nucleus subthalamicus* und in den medialen präfrontalen Kortex mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen eine Möglichkeit ergeben, die anatomischen Afferenzen und Efferenzen und deren Aufzweigungen weiter zu untersuchen. Folglich könnten den unterschiedlichen Arealen in STN oder mPFC weitere Funktionen, in Abhängigkeit ihrer Lokalisation und Funktion zugeschrieben werden.

Die drei Ziele dieser Arbeit, ein Protokoll zur Manipulation des mPFC-ST Schaltkreises zu entwickeln, die Entscheidungsfindung im *T-maze* zu untersuchen und das LFP auszuwerten bzw. einer CFC zuzuschreiben, konnten erreicht werden.

Unter Berücksichtigung der hier dargestellten bisherigen Ergebnisse wird deutlich, wie essenziell und verlässlich die optogenetische Manipulation von Neuronen zur Erforschung von Schaltkreisen im Gehirn ist. Die Kombination aus optogenetischer Stimulation und elektrophysiologischer Ableitung ermöglicht es, genauere Fragestellungen zu beantworten. In der Einleitung wurde erwähnt, dass an Parkinson erkrankte Patienten eine Veränderung der Oszillationen im STN und eine veränderte Entscheidungsfindung aufweisen. Als weitere Forschung könnten jetzt klinische Daten der an Parkinson erkrankten Patienten mit gewonnenen Daten dieses Versuches bzw. weiterer Versuche gekoppelt werden, um mögliche Zusammenhänge zu detektieren. Womöglich können so weitere Ansatzpunkte in der Therapie der Tiefen Hirnstimulation für Patienten geschaffen werden.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abdi, Azzedine; Mallet, Nicolas; Mohamed, Foad Y.; et al. (2015): Prototypic and Arkypallidal Neurons in the Dopamine-Intact External Globus Pallidus, in: *The Journal of Neuroscience*, Jg. 35, Nr. 17, S. 6667–6688, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4662-14.2015.
- Alexander, G. E.; DeLong, M. R.; Strick, P. L. (1986): Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex, in: *Annual Review of Neuroscience*, Jg. 9, S. 357–381, doi: 10.1146/annurev.ne.09.030186.002041.
- Arenkiel, Benjamin R.; Peca, Joao; Davison, Ian G.; (2007): In Vivo Light-Induced Activation of Neural Circuitry in Transgenic Mice Expressing Channelrhodopsin-2, in: *Neuron*, Jg. 54, Nr. 2, S. 205–218, doi: 10.1016/j.neuron.2007.03.005.
- Aron, Adam R.; Behrens, Tim E.; Smith, Steve; et al. (2007): Triangulating a Cognitive Control Network Using Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging (MRI) and Functional MRI, in: *Journal of Neuroscience*, Jg. 27, Nr. 14, S. 3743–3752, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0519-07.2007.
- Aron, Adam R.; Herz, Damian M.; Brown, Peter; et al. (2016): Frontosubthalamic Circuits for Control of Action and Cognition, in: *The Journal of Neuroscience*, Jg. 36, Nr. 45, S. 11489–11495, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2348-16.2016.
- Aron, Adam R.; Poldrack, Russell A. (2006): Cortical and subcortical contributions to Stop signal response inhibition: role of the subthalamic nucleus, in: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Jg. 26, Nr. 9, S. 2424–2433, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4682-05.2006.
- Bamann, Christian; Kirsch, Taryn; Nagel, Georg; et al. (2008): Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function, in: *Journal of Molecular Biology*, Jg. 375, Nr. 3, S. 686–694, doi: 10.1016/j.jmb.2007.10.072.
- Barthó, P.; Freund, T. F.; Acsády, L. (2002): Selective GABAergic innervation of thalamic nuclei from zona incerta, in: *European Journal of Neuroscience*, Jg. 16, Nr. 6, S. 999–1014, doi: 10.1046/j.1460-9568.2002.02157.x.
- Barthó, Péter; Slézia, Andrea; Varga, Viktor; et al. (2007): Cortical Control of Zona Incerta, in: *Journal of Neuroscience*, Jg. 27, Nr. 7, S. 1670–1681, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3768-06.2007.
- Belluscio, Mariano A.; Mizuseki, Kenji; Schmidt, Robert; et al. (2012): Cross-Frequency Phase–Phase Coupling between Theta and Gamma Oscillations in the Hippocampus, in: *Journal of Neuroscience*, Jg. 32, Nr. 2, S. 423–435, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4122-11.2012.

- Benchenane, Karim; Peyrache, Adrien; Khamassi, Mehdi; et al. (2010): Coherent theta oscillations and reorganization of spike timing in the hippocampal- prefrontal network upon learning, in: *Neuron*, Jg. 66, Nr. 6, S. 921–936, doi: 10.1016/j.neuron.2010.05.013.
- Bender, Franziska; Gorbati, Maria; Cadavieco, Marta Carus; et al. (2015): Theta oscillations regulate the speed of locomotion via a hippocampus to lateral septum pathway, in: *Nature Communications*, Jg. 6, S. 8521, doi: 10.1038/ncomms9521.
- Benis, Damien; David, Olivier; Lachaux, Jean-Philippe; et al. (2014): Subthalamic nucleus activity dissociates proactive and reactive inhibition in patients with Parkinson's disease, in: *NeuroImage*, Jg. 91, S. 273–281, doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.10.070.
- Berendse, Henk W.; Graaf, Yvonne Galis-De; Groenewegen, Henk J. (1992): Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat, in: *Journal of Comparative Neurology*, Jg. 316, Nr. 3, S. 314–347, doi: 10.1002/cne.903160305.
- Blomstedt, Patric; Fytagoridis, Anders; Åström, Mattias; et al. (2012): Unilateral caudal zona incerta deep brain stimulation for Parkinsonian tremor, in: *Parkinsonism & Related Disorders*, Jg. 18, Nr. 10, S. 1062–1066, doi: 10.1016/j.parkreldis.2012.05.024.
- Bogacz, Rafal; Gurney, Kevin (2007): The basal ganglia and cortex implement optimal decision making between alternative actions, in: *Neural Computation*, Jg. 19, Nr. 2, S. 442–477, doi: 10.1162/neco.2007.19.2.442.
- Bonnevie, Tora; Zaghoul, Kareem A. (2019): The Subthalamic Nucleus: Unravelling New Roles and Mechanisms in the Control of Action, in: *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, Jg. 25, Nr. 1, S. 48–64, doi: 10.1177/1073858418763594.
- Bosch, C.; Maily, P.; Degos, B.; et al. (2012): Preservation of the hyperdirect pathway of basal ganglia in a rodent brain slice, in: *Neuroscience*, Jg. 215, S. 31–41, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.033.
- Boyden, Edward S.; Zhang, Feng; Bamberg, Ernst; et al. (2005): Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity, in: *Nature Neuroscience*, Jg. 8, Nr. 9, S. 1263–1268, doi: 10.1038/nn1525.
- Brittain, John-Stuart; Watkins, Kate E.; Joundi, Raed A.; et al. (2012): A Role for the Subthalamic Nucleus in Response Inhibition during Conflict, in: *Journal of Neuroscience*, Jg. 32, Nr. 39, S. 13396–13401, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2259-12.2012.
- Burton, Brian G.; Hok, Vincent; Save, Etienne; et al. (2009): Lesion of the ventral and intermediate hippocampus abolishes anticipatory activity in the medial prefrontal cortex of the rat, in: *Behavioural Brain Research*, Jg. 199, Nr. 2, S. 222–234, doi: 10.1016/j.bbr.2008.11.045.

- Buzsáki, György; Anastassiou, Costas A.; Koch, Christof (2012): The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes, in: *Nature Reviews Neuroscience*, Jg. 13, Nr. 6, S. 407–420, doi: 10.1038/nrn3241.
- Buzsáki, György; Chrobak, James J (1995): Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks, in: *Current Opinion in Neurobiology*, Jg. 5, Nr. 4, S. 504–510, doi: 10.1016/0959-4388(95)80012-3.
- Buzsáki, György; Logothetis, Nikos; Singer, Wolf (2013): Scaling brain size, keeping timing: evolutionary preservation of brain rhythms, in: *Neuron*, Jg. 80, Nr. 3, S. 751–764, doi: 10.1016/j.neuron.2013.10.002.
- Buzsáki, György; Wang, Xiao-Jing (2012): Mechanisms of gamma oscillations, in: *Annual Review of Neuroscience*, Jg. 35, S. 203–225, doi: 10.1146/annurev-neuro-062111-150444.
- Canolty, R. T.; Edwards, E.; Dalal, S. S.; et al. (2006): High Gamma Power Is Phase-Locked to Theta Oscillations in Human Neocortex, in: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 313, Nr. 5793, S. 1626–1628, doi: 10.1126/science.1128115.
- Canolty, Ryan T.; Knight, Robert T. (2010): The functional role of cross-frequency coupling, in: *Trends in Cognitive Sciences*, Jg. 14, Nr. 11, S. 506–515, doi: 10.1016/j.tics.2010.09.001.
- Canteras, Newton S.; Shammah-Lagnado, Sara J.; Silva, Bomfim A.; et al. (1990): Afferent connections of the subthalamic nucleus: a combined retrograde and anterograde horseradish peroxidase study in the rat, in: *Brain Research*, Jg. 513, Nr. 1, S. 43–59, doi: 10.1016/0006-8993(90)91087-W.
- Cao, Wei; Lin, Shen; Xia, Qiang-qiang; et al. (2018): Gamma Oscillation Dysfunction in mPFC Leads to Social Deficits in Neuroligin 3 R451C Knockin Mice, in: *Neuron*, Jg. 97, Nr. 6, S. 1253–1260.e7, doi: 10.1016/j.neuron.2018.02.001.
- Carus-Cadavieco, Marta; Gorbati, Maria; Ye, Li; et al. (2017): Gamma oscillations organize top-down signalling to hypothalamus and enable food seeking, in: *Nature*, Jg. 542, S. 232.
- Cavanagh, James F; Wiecki, Thomas V; Cohen, Michael X; et al. (2011): Subthalamic nucleus stimulation reverses mediofrontal influence over decision threshold, in: *Nature Neuroscience*, Jg. 14, Nr. 11, S. 1462–1467, doi: 10.1038/nn.2925.
- Chen, Hao; Wang, Yi-jie; Yang, Li; et al. (2016): Theta synchronization between medial prefrontal cortex and cerebellum is associated with adaptive performance of associative learning behavior, in: *Scientific Reports*, Jg. 6, doi: 10.1038/srep20960.
- Chou, Xiao-Lin; Wang, Xiyue; Zhang, Zheng-Gang; et al. (2018): Inhibitory gain modulation of defense behaviors by zona incerta, in: *Nature Communications*, Jg. 9, Nr. 1, S. 1151, doi: 10.1038/s41467-018-03581-6.

- Colgin, Laura Lee (2011): Oscillations and hippocampal-prefrontal synchrony, in: *Current Opinion in Neurobiology*, Jg. 21, Nr. 3, S. 467–474, doi: 10.1016/j.conb.2011.04.006.
- Corcoran, Kevin A.; Quirk, Gregory J. (2007): Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears, in: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Jg. 27, Nr. 4, S. 840–844, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5327-06.2007.
- Deacon, Robert M. J.; Rawlins, J. Nicholas P. (2006): T-maze alternation in the rodent, in: *Nature Protocols*, Jg. 1, Nr. 1, S. 7, doi: 10.1038/nprot.2006.2.
- Deisseroth, Karl (2011): Optogenetics, in: *Nature Methods*, Jg. 8, Nr. 1, S. 26–29, doi: 10.1038/nmeth.f.324.
- Deisseroth, Karl; Hegemann, Peter (2017): The form and function of channelrhodopsin, in: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 357, Nr. 6356, doi: 10.1126/science.aan5544.
- DeLong, Mahlon R.; Wichmann, Thomas (2007): Circuits and Circuit Disorders of the Basal Ganglia,.
- DeMaagd, George; Philip, Ashok (2015): Parkinson's Disease and Its Management, in: *Pharmacy and Therapeutics*, Jg. 40, Nr. 8, S. 504–532.
- Devergnas, Annaelle; Caiola, M.; Pittard, D.; et al. (2019): Cortical Phase–Amplitude Coupling in a Progressive Model of Parkinsonism in Nonhuman Primates, in: *Cerebral Cortex*, Jg. 29, Nr. 1, S. 167–177, doi: 10.1093/cercor/bhx314.
- Eagle, Dawn M.; Baunez, Christelle; Hutcheson, Daniel M.; et al. (2008): Stop-Signal Reaction-Time Task Performance: Role of Prefrontal Cortex and Subthalamic Nucleus, in: *Cerebral Cortex*, Jg. 18, Nr. 1, S. 178–188, doi: 10.1093/cercor/bhm044.
- Ebner, Alois (2011): *EEG*, 2., aktualisierte und erweiterte Auflage. Thieme Verlag, doi: 10.1055/b-0034-36709.
- Eccles, J. C. (1951): Interpretation of action potentials evoked in the cerebral cortex, in: *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, Jg. 3, Nr. 4, S. 449–464, doi: 10.1016/0013-4694(51)90033-8.
- Elben, Saskia; Trenado, Carlos; Vesper, Jan; et al. (2018): Human subthalamic oscillatory dynamics following somatosensory stimulation, in: *Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, Jg. 129, Nr. 1, S. 79–88, doi: 10.1016/j.clinph.2017.10.015.
- Euston, David R.; Gruber, Aaron J.; McNaughton, Bruce L. (2012): The Role of Medial Prefrontal Cortex in Memory and Decision Making, in: *Neuron*, Jg. 76, Nr. 6, S. 1057–1070, doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.002.
- Féger, J.; Bevan, M.; Crossman, A.R. (1994): The projections from the parafascicular thalamic nucleus to the subthalamic nucleus and the striatum arise from separate neuronal populations: A comparison with the corticostriatal and

- corticosubthalamic efferents in a retrograde fluorescent double-labelling study, in: *Neuroscience*, Jg. 60, Nr. 1, S. 125–132, doi: 10.1016/0306-4522(94)90208-9.
- Feldbauer, K.; Zimmermann, D.; Pintschovius, V.; et al. (2009): Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 106, Nr. 30, S. 12317–12322, doi: 10.1073/pnas.0905852106.
- Fife, Kathryn; A Gutierrez-Reed, Navarre; Zell, Vivien; et al. (2017): Causal role for the subthalamic nucleus in interrupting behavior, in: *eLife Sciences*, Jg. 6, doi: 10.7554/eLife.27689.
- Florin, Esther; Baillet, Sylvain (2015): The brain's resting-state activity is shaped by synchronized cross-frequency coupling of neural oscillations, in: *NeuroImage*, Jg. 111, S. 26–35, doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.01.054.
- François, Chantal; Savy, Claudine; Jan, Caroline; et al. (2000): Dopaminergic innervation of the subthalamic nucleus in the normal state, in MPTP-treated monkeys, and in Parkinson's disease patients, in: *Journal of Comparative Neurology*, Jg. 425, Nr. 1, S. 121–129, doi: 10.1002/1096-9861(20000911)425:1<121::AID-CNE10>3.0.CO;2-G.
- Frank, Michael J.; Samanta, Johan; Moustafa, Ahmed A.; et al. (2007): Hold Your Horses: Impulsivity, Deep Brain Stimulation, and Medication in Parkinsonism, in: *Science*, Jg. 318, Nr. 5854, S. 1309–1312, doi: 10.1126/science.1146157.
- Fries, Pascal (2009): Neuronal Gamma-Band Synchronization as a Fundamental Process in Cortical Computation, in: *Annual Review of Neuroscience*, Jg. 32, Nr. 1, S. 209–224, doi: 10.1146/annurev.neuro.051508.135603.
- Fumagalli, Manuela; Giannicola, Gaia; Rosa, Manuela; et al. (2011): Conflict-dependent dynamic of subthalamic nucleus oscillations during moral decisions, in: *Social Neuroscience*, Jg. 6, Nr. 3, S. 243–256, doi: 10.1080/17470919.2010.515148.
- Fuster, Joaquín M. (2002): Frontal lobe and cognitive development, in: *Journal of Neurocytology*, Jg. 31, Nr. 3–5, S. 373–385.
- Gabbott, Paul L. A.; Warner, Tracy A.; Jays, Paul R. L.; et al. (2005): Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers, in: *Journal of Comparative Neurology*, Jg. 492, Nr. 2, S. 145–177, doi: 10.1002/cne.20738.
- Glykos, Vasileios; Whittington, Miles A.; LeBeau, Fiona E. N. (2015): Subregional differences in the generation of fast network oscillations in the rat medial prefrontal cortex (mPFC) in vitro, in: *The Journal of Physiology*, Jg. 593, Nr. 16, S. 3597–3615, doi: 10.1113/JP270811.
- Goodman, Michelle S.; Kumar, Sanjeev; Zomorodi, Reza; et al. (2018): Theta-Gamma Coupling and Working Memory in Alzheimer's Dementia and Mild Cognitive Impairment, in: *Frontiers in Aging Neuroscience*, Jg. 10, doi: 10.3389/fnagi.2018.00101.

- Goutagny, Romain; Gu, Ning; Cavanagh, Chelsea; et al. (2013): Alterations in hippocampal network oscillations and theta–gamma coupling arise before A β overproduction in a mouse model of Alzheimer’s disease, in: *European Journal of Neuroscience*, Jg. 37, Nr. 12, S. 1896–1902, doi: 10.1111/ejn.12233.
- Gradinaru, Viviana; Mogri, Murtaza; Thompson, Kimberly R.; et al. (2009): Optical Deconstruction of Parkinsonian Neural Circuitry, in: *Science*, Jg. 324, Nr. 5925, S. 354–359, doi: 10.1126/science.1167093.
- Griebel, Guy; Holmes, Andrew (2013): 50 years of hurdles and hope in anxiolytic drug discovery, in: *Nature reviews. Drug discovery*, Jg. 12, Nr. 9, S. 667–687, doi: 10.1038/nrd4075.
- Guridi, Jorge; Alegre, Manuel (2017): Oscillatory activity in the basal ganglia and deep brain stimulation, in: *Movement Disorders*, Jg. 32, Nr. 1, S. 64–69, doi: 10.1002/mds.26714.
- Halassa, Michael M.; Acsády, László (2016): Thalamic Inhibition: Diverse Sources, Diverse Scales, in: *Trends in Neurosciences*, Jg. 39, Nr. 10, S. 680–693, doi: 10.1016/j.tins.2016.08.001.
- Han, Xue; Boyden, Edward S. (2007): Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution, in: *PloS One*, Jg. 2, Nr. 3, S. e299, doi: 10.1371/journal.pone.0000299.
- Hardman, Craig Denis; Henderson, Jasmine Monica; Finkelstein, David Isaac; et al. (2002): Comparison of the basal ganglia in rats, marmosets, macaques, baboons, and humans: Volume and neuronal number for the output, internal relay, and striatal modulating nuclei, in: *Journal of Comparative Neurology*, Jg. 445, Nr. 3, S. 238–255, doi: 10.1002/cne.10165.
- Hare, Todd A.; Camerer, Colin F.; Rangel, Antonio (2009): Self-Control in Decision-Making Involves Modulation of the vmPFC Valuation System, in: *Science*, Jg. 324, Nr. 5927, S. 646–648, doi: 10.1126/science.1168450.
- Haynes, William I. A.; Haber, Suzanne N. (2013): The organization of prefrontal-subthalamic inputs in primates provides an anatomical substrate for both functional specificity and integration: implications for Basal Ganglia models and deep brain stimulation, in: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Jg. 33, Nr. 11, S. 4804–4814, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4674-12.2013.
- Hazan, Lynn; Zugaro, Michaël; Buzsáki, György (2006): Klusters, NeuroScope, NDManager: A free software suite for neurophysiological data processing and visualization, in: *Journal of Neuroscience Methods*, Jg. 155, Nr. 2, S. 207–216, doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.01.017.
- Heidbreder, Christian A; Groenewegen, Henk J (2003): The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics, in: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Jg. 27, Nr. 6, S. 555–579, doi: 10.1016/j.neubiorev.2003.09.003.

- Heikenfeld, Carla; Mederos, Sara; Chen, Changwan; et al. (2020): Prefrontal - subthalamic pathway supports action selection in a spatial working memory task, in: *Scientific Reports*, Jg. 10, Nr. 1, S. 10497, doi: 10.1038/s41598-020-67185-1.
- Heise, Claire E.; Mitrofanis, John (2004): Evidence for a glutamatergic projection from the zona incerta to the basal ganglia of rats, in: *Journal of Comparative Neurology*, Jg. 468, Nr. 4, S. 482–495, doi: 10.1002/cne.10971.
- Herrmann, Christoph S.; Strüber, Daniel; Helfrich, Randolph F.; et al (2016): EEG oscillations: From correlation to causality, in: *International Journal of Psychophysiology*, Jg. 103, S. 12–21, doi: 10.1016/j.ijpsycho.2015.02.003.
- Herz, Damian M.; Little, Simon; Pedrosa, David J.; et al. (2018): Mechanisms Underlying Decision-Making as Revealed by Deep-Brain Stimulation in Patients with Parkinson’s Disease, in: *Current Biology*, Jg. 28, Nr. 8, S. 1169-1178.e6, doi: 10.1016/j.cub.2018.02.057.
- Hong, Dan-Dan; Huang, Wen-Qiang; Ji, Ai-Ai; et al. (2018): Neurons in rat orbitofrontal cortex and medial prefrontal cortex exhibit distinct responses in reward and strategy-update in a risk-based decision-making task, in: *Metabolic Brain Disease*, doi: 10.1007/s11011-018-0360-x.
- Hoover, Walter B.; Vertes, Robert P. (2007): Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat, in: *Brain Structure and Function*, Jg. 212, Nr. 2, S. 149–179, doi: 10.1007/s00429-007-0150-4.
- Horst, N. K.; Laubach, M. (2009): The role of rat dorsomedial prefrontal cortex in spatial working memory, in: *Neuroscience*, Jg. 164, Nr. 2, S. 444–456, doi: 10.1016/j.neuroscience.2009.08.004.
- Hyman, James M.; Zilli, Eric A.; Paley, Amanda M.; et al. (2010): Working Memory Performance Correlates with Prefrontal-Hippocampal Theta Interactions but not with Prefrontal Neuron Firing Rates, in: *Frontiers in Integrative Neuroscience*, Jg. 4, S. 2, doi: 10.3389/neuro.07.002.2010.
- Isoda, Masaki; Hikosaka, Okihide (2008): Role for Subthalamic Nucleus Neurons in Switching from Automatic to Controlled Eye Movement, in: *Journal of Neuroscience*, Jg. 28, Nr. 28, S. 7209–7218, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0487-08.2008.
- Ito, Hiroshi T.; Zhang, Sheng-Jia; Witter, Menno P.; et al. (2015): A prefrontal-thalamo-hippocampal circuit for goal-directed spatial navigation, in: *Nature*, Jg. 522, Nr. 7554, S. 50–55, doi: 10.1038/nature14396.
- Jones, Matthew W.; Wilson, Matthew A. (2005): Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task, in: *PLoS biology*, Jg. 3, Nr. 12, S. e402, doi: 10.1371/journal.pbio.0030402.
- Kelley, Ryan; Flouty, Oliver; Emmons, Eric B.; et al. (2018): A human prefrontal-subthalamic circuit for cognitive control, in: *Brain: A Journal of Neurology*, Jg. 141, Nr. 1, S. 205–216, doi: 10.1093/brain/awx300.

- Kim, Hoseok; Ährlund-Richter, Sofie; Wang, Xinming; et al. (2016): Prefrontal Parvalbumin Neurons in Control of Attention, in: *Cell*, Jg. 164, Nr. 1–2, S. 208–218, doi: 10.1016/j.cell.2015.11.038.
- Kita, H.; Kitai, S. T. (1987): Efferent projections of the subthalamic nucleus in the rat: light and electron microscopic analysis with the PHA-L method, in: *The Journal of Comparative Neurology*, Jg. 260, Nr. 3, S. 435–452, doi: 10.1002/cne.902600309.
- Kita, Takako; Osten, Pavel; Kita, Hitoshi (2014): Rat subthalamic nucleus and zona incerta share extensively overlapped representations of cortical functional territories, in: *The Journal of comparative neurology*, Jg. 522, Nr. 18, S. 4043–4056, doi: 10.1002/cne.23655.
- Klavir, Oded; Prigge, Matthias; Sarel, Ayelet; et al. 2017): Manipulating fear associations via optogenetic modulation of amygdala inputs to prefrontal cortex, in: *Nature Neuroscience*, Jg. 20, Nr. 6, S. 836–844, doi: 10.1038/nn.4523.
- Kocabicak, Ersoy; Tan, Sonny K. H.; Temel, Yasin (2012): Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson’s disease: Why so successful?, in: *Surgical Neurology International*, Jg. 3, Nr. Suppl 4, S. S312–S314, doi: 10.4103/2152-7806.103024.
- Kolb, Bryan; Mychasiuk, Richelle; Muhammad, Arif; et al. (2012): Experience and the developing prefrontal cortex, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 109, Nr. Suppl 2, S. 17186–17193, doi: 10.1073/pnas.1121251109.
- Korotkova, Tatiana; Fuchs, Elke C.; Ponomarenko, Alexey; et al. (2010): NMDA Receptor Ablation on Parvalbumin-Positive Interneurons Impairs Hippocampal Synchrony, Spatial Representations, and Working Memory, in: *Neuron*, Elsevier, Jg. 68, Nr. 3, S. 557–569, doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.017.
- Krack, Paul; Hariz, Marwan I.; Baunez, Christelle; et al. (2010): Deep brain stimulation: from neurology to psychiatry?, in: *Trends in Neurosciences*, Jg. 33, Nr. 10, S. 474–484, doi: 10.1016/j.tins.2010.07.002.
- Krettek, J. E.; Price, J. L. (1977): Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat, in: *The Journal of Comparative Neurology*, Jg. 172, Nr. 4, S. 687–722, doi: 10.1002/cne.901720408.
- Kuhn, A. A.; Kempf, F.; Brucke, C.; et al. (2008): High-Frequency Stimulation of the Subthalamic Nucleus Suppresses Oscillatory Activity in Patients with Parkinson’s Disease in Parallel with Improvement in Motor Performance, in: *Journal of Neuroscience*, Jg. 28, Nr. 24, S. 6165–6173, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0282-08.2008.
- Kühn, Andrea A.; Trottenberg, Thomas; Kivi, Anatol; et al. (2005): The relationship between local field potential and neuronal discharge in the subthalamic nucleus of patients with Parkinson’s disease, in: *Experimental Neurology*, Jg. 194, Nr. 1, S. 212–220, doi: 10.1016/j.expneurol.2005.02.010.

- Kühn, Andrea A.; Williams, David; Kupsch, Andreas; et al. (2004): Event-related beta desynchronization in human subthalamic nucleus correlates with motor performance, in: *Brain: A Journal of Neurology*, Jg. 127, Nr. Pt 4, S. 735–746, doi: 10.1093/brain/awh106.
- Lanciego, J. L.; Luquin, N.; Obeso, J. A. (2012): Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia, in: *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, Jg. 2, Nr. 12, S. a009621–a009621, doi: 10.1101/cshperspect.a009621.
- Lecea, Luis de; Carter, Matthew E. (2011): Optical Control of Neuronal Activity, in: *eLS*, American Cancer Society, doi: 10.1002/9780470015902.a0022503.
- Lee, Anthony T.; Vogt, Daniel; Rubenstein, John L.; et al. (2014): A Class of GABAergic Neurons in the Prefrontal Cortex Sends Long-Range Projections to the Nucleus Accumbens and Elicits Acute Avoidance Behavior, in: *Journal of Neuroscience*, Jg. 34, Nr. 35, S. 11519–11525, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1157-14.2014.
- Leonard, Christiana M.;(1969): The prefrontal cortex of the rat. I. Cortical projection of the mediodorsal nucleus. II. Efferent connections, in: *Brain Research*, S. 23.
- Lin, C. S.; Nicolelis, M. A.; Schneider, J. S.; et al. (1990): A major direct GABAergic pathway from zona incerta to neocortex, in: *Science*, Jg. 248, Nr. 4962, S. 1553–1556, doi: 10.1126/science.2360049.
- Lin, John Y.; Lin, Michael Z.; Steinbach, Paul; et al. (2009): Characterization of Engineered Channelrhodopsin Variants with Improved Properties and Kinetics, in: *Biophysical Journal*, Jg. 96, Nr. 5, S. 1803–1814, doi: 10.1016/j.bpj.2008.11.034.
- Ma, Yao-Ying; Lee, Brian R.; Wang, Xiusong; et al. (2014): Bidirectional modulation of incubation of cocaine craving by silent synapse-based remodeling of prefrontal cortex to accumbens projections, in: *Neuron*, Jg. 83, Nr. 6, S. 1453–1467, doi: 10.1016/j.neuron.2014.08.023.
- Maisson, David J.-N.; Gemzik, Zachary M.; Griffin, Amy L. (2018): Optogenetic suppression of the nucleus reuniens selectively impairs encoding during spatial working memory, in: *Neurobiology of Learning and Memory*, Jg. 155, S. 78–85, doi: 10.1016/j.nlm.2018.06.010.
- Maurice, Nicolas; Deniau, Jean-Michel; Glowinski, Jacques; et al. (1999): Relationships between the Prefrontal Cortex and the Basal Ganglia in the Rat: Physiology of the Cortico-Nigral Circuits, in: *Journal of Neuroscience*, Jg. 19, Nr. 11, S. 4674–4681, doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-11-04674.1999.
- McConnell, George C.; So, Rosa Q.; Hilliard, Justin D; et al. (2012): Effective deep brain stimulation suppresses low frequency network oscillations in the basal ganglia by regularizing neural firing patterns, in: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, Jg. 32, Nr. 45, S. 15657–15668, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2824-12.2012.

- McNally, James M.; McCarley, Robert W. (2016): Gamma band oscillations: a key to understanding schizophrenia symptoms and neural circuit abnormalities, in: *Current opinion in psychiatry*, Jg. 29, Nr. 3, S. 202–210, doi: 10.1097/YCO.0000000000000244.
- Miller, Earl K.; Cohen, Jonathan D. (2001): An Integrative Theory of Prefrontal Cortex Function, in: *Annual Review of Neuroscience*, Jg. 24, Nr. 1, S. 167–202, doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.167.
- Millhorn, D. E.; Bayliss, D. A.; Erickson, J. T.; et al. (1989): Cellular and molecular mechanisms of chemical synaptic transmission, in: *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, Jg. 257, Nr. 6, S. L289–L310, doi: 10.1152/ajplung.1989.257.6.L289.
- Mitrofanis, J. (2005): Some certainty for the “zone of uncertainty”? Exploring the function of the zona incerta, in: *Neuroscience*, Jg. 130, Nr. 1, S. 1–15, doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.08.017.
- Monakow, K. H.; Akert, K.; Künzle, H. (1978): Projections of the precentral motor cortex and other cortical areas of the frontal lobe to the subthalamic nucleus in the monkey, in: *Experimental Brain Research*, Jg. 33, Nr. 3–4, S. 395–403.
- Nagel, G; Szellas, T; Kateriya, S; et al. (2005): Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels, in: *Biochemical Society Transactions*, Jg. 33, S. 4.
- Nagel, Georg; Ollig, Doris; Fuhrmann, Markus; et al. (2002): Channelrhodopsin-1: A Light-Gated Proton Channel in Green Algae, in: *Science*, Jg. 296, Nr. 5577, S. 2395–2398, doi: 10.1126/science.1072068.
- Nagel, Georg; Szellas, Tanjef; Huhn, Wolfram; et al. (2003): Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 100, Nr. 24, S. 13940–13945.
- Nambu, Atsushi; Tokuno, Hironobu; Hamada, Ikuma; et al. (2000): Excitatory Cortical Inputs to Pallidal Neurons Via the Subthalamic Nucleus in the Monkey, in: *Journal of Neurophysiology*, Jg. 84, Nr. 1, S. 289–300, doi: 10.1152/jn.2000.84.1.289.
- Narayanan, Nandakumar S.; Laubach, Mark (2006): Top-Down Control of Motor Cortex Ensembles by Dorsomedial Prefrontal Cortex, in: *Neuron*, Jg. 52, Nr. 5, S. 921–931, doi: 10.1016/j.neuron.2006.10.021.
- Nicolelis, Miguel A.L.; Chapin, John K.; Lin, Rick C.S. (1992): Somatotopic maps within the zona incerta relay parallel GABAergic somatosensory pathways to the neocortex, superior colliculus, and brainstem, in: *Brain Research*, Jg. 577, Nr. 1, S. 134–141, doi: 10.1016/0006-8993(92)90546-L.
- Nonomura, Satoshi; Nishizawa, Kayo; Sakai, Yutaka; et al. (2018): Monitoring and Updating of Action Selection for Goal-Directed Behavior through the Striatal Direct and Indirect Pathways, in: *Neuron*, Jg. 99, Nr. 6, S. 1302–1314.e5, doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.002.

- Oesterhelt, Dieter; Stoeckenius, Walther (1971): Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of *Halobacterium halobium*, in: *Nature New Biology*, Jg. 233, Nr. 39, S. 149–152, doi: 10.1038/newbio233149a0.
- Ongür, D.; Price, J. L. (2000): The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans, in: *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, Jg. 10, Nr. 3, S. 206–219.
- Packer, Adam M.; Roska, Botond; Häusser, Michael (2013): Targeting neurons and photons for optogenetics, in: *Nature neuroscience*, Jg. 16, Nr. 7, S. 805–815, doi: 10.1038/nn.3427.
- Parent, André; Hazrati, Lili-Naz (1995): Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop, in: *Brain Research Reviews*, Jg. 20, Nr. 1, S. 91–127, doi: 10.1016/0165-0173(94)00007-C.
- Périer, Céline; Tremblay, Léon; Féger, Jean; et al. (2002): Behavioral Consequences of Bicuculline Injection in the Subthalamic Nucleus and the Zona Incerta in Rat, in: *Journal of Neuroscience*, Jg. 22, Nr. 19, S. 8711–8719, doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-19-08711.2002.
- Paxinos und Franklin (2012): *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4. Auflage.
- Purves, Dale; Augustine, George J.; Fitzpatrick, David; et al. (2001): Circuits within the Basal Ganglia System, in: *Neuroscience. 2nd edition*,.
- Rainer, Gregor (2014): Local Field Potential in the Visual System, in: Dieter Jaeger und Ranu Jung (Hrsg.), *Encyclopedia of Computational Neuroscience*, New York, NY: Springer New York, S. 1–8, doi: 10.1007/978-1-4614-7320-6_722-1.
- Romito, Luigi Michele; Raja, Michele; Daniele, Antonio; et al. (2002): Transient mania with hypersexuality after surgery for high frequency stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease, in: *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, Jg. 17, Nr. 6, S. 1371–1374, doi: 10.1002/mds.10265.
- Rossi, Mark A.; Hayrapetyan, Volodya Y.; Maimon, Benjamin; et al. (2012): Prefrontal cortical mechanisms underlying delayed alternation in mice, in: *Journal of Neurophysiology*, Jg. 108, Nr. 4, S. 1211–1222, doi: 10.1152/jn.01060.2011.
- Salimpour, Yousef; Anderson, William S. (2019): Cross-Frequency Coupling Based Neuromodulation for Treating Neurological Disorders, in: *Frontiers in Neuroscience*, Jg. 13, doi: 10.3389/fnins.2019.00125.
- Sapiurka, Maya; Squire, Larry R.; Clark, Robert E. (2016): Distinct roles of hippocampus and medial prefrontal cortex in spatial and nonspatial memory, in: *Hippocampus*, Jg. 26, Nr. 12, S. 1515–1524, doi: 10.1002/hipo.22652.
- Schmidt, Robert; Leventhal, Daniel K.; Mallet, Nicolas; et al. (2013): Canceling actions involves a race between basal ganglia pathways, in: *Nature neuroscience*, Jg. 16, Nr. 8, S. 1118, doi: 10.1038/nn.3456.

- Schnitzler, Alfons; Gross, Joachim (2005): Normal and pathological oscillatory communication in the brain, in: *Nature Reviews. Neuroscience*, Jg. 6, Nr. 4, S. 285–296, doi: 10.1038/nrn1650.
- Schulte, Erik; Schumacher, Udo; Schünke, Michael (2018): *PROMETHEUS Kopf, Hals und Neuroanatomie: LernATLAS Anatomie*, 5. Auflage. S.484, S. Thieme.
- Sesack, Susan R.; Deutch, Ariel Y.; Roth, Robert H.; et al. (1989): Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: An anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin, in: *Journal of Comparative Neurology*, Jg. 290, Nr. 2, S. 213–242, doi: 10.1002/cne.902900205.
- Shaw, Victoria; Mitrofanis, John (2002): Anatomical evidence for somatotopic maps in the zona incerta of rats, in: *Anatomy and Embryology*, Jg. 206, Nr. 1–2, S. 119–130, doi: 10.1007/s00429-002-0280-7.
- Shink, E.; Bevan, M. D.; Bolam, J. P.; et al. (1996): The subthalamic nucleus and the external pallidum: two tightly interconnected structures that control the output of the basal ganglia in the monkey, in: *Neuroscience*, Jg. 73, Nr. 2, S. 335–357, doi: 10.1016/0306-4522(96)00022-X.
- Shoji, Hirotaka; Hagihara, Hideo; Takao, Keizo; et al. (2012): T-maze Forced Alternation and Left-right Discrimination Tasks for Assessing Working and Reference Memory in Mice, in: *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, Nr. 60, doi: 10.3791/3300.
- Smith, Y.; Hazrati, L.-N.; Parent, A. (1990): Efferent projections of the subthalamic nucleus in the squirrel monkey as studied by the PHA-L anterograde tracing method, in: *Journal of Comparative Neurology*, Jg. 294, Nr. 2, S. 306–323, doi: 10.1002/cne.902940213.
- Spellman, Timothy; Rigotti, Mattia; Ahmari, Susanne E.; et al. (2015): Hippocampal-prefrontal input supports spatial encoding in working memory, in: *Nature*, Jg. 522, Nr. 7556, S. 309–314, doi: 10.1038/nature14445.
- Steiner, Heinz; Tseng, Kuei Y. (2016): *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function*, 2. Auflage Amsterdam ; Boston: Academic Press.
- Stephenson-Jones, Marcus; Yu, Kai; Ahrens, Sandra; et al. (2016): A basal ganglia circuit for evaluating action outcomes, in: *Nature*, Jg. 539, Nr. 7628, S. 289–293, doi: 10.1038/nature19845.
- Stujenske, Joseph M.; Likhtik, Ekaterina; Topiwala, Mihir A.; et al. (2014): Fear and Safety Engage Competing Patterns of Theta-Gamma Coupling in the Basolateral Amygdala, in: *Neuron*, Jg. 83, Nr. 4, S. 919–933, doi: 10.1016/j.neuron.2014.07.026.
- Takashima, A.; Petersson, K. M.; Rutters, F.; et al. (2006): Declarative memory consolidation in humans: A prospective functional magnetic resonance imaging study, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 103, Nr. 3, S. 756–761, doi: 10.1073/pnas.0507774103.

- Tamura, Makoto; Spellman, Timothy J.; Rosen, Andrew M.; et al. (2017): Hippocampal-prefrontal theta-gamma coupling during performance of a spatial working memory task, in: *Nature Communications*, Jg. 8, Nr. 1, S. 1–9, doi: 10.1038/s41467-017-02108-9.
- Tanninen, Stephanie E.; Nouriziabari, Bardia; Morrissey, Mark D.; et al. (2017): Entorhinal tau pathology disrupts hippocampal-prefrontal oscillatory coupling during associative learning, in: *Neurobiology of Aging*, Jg. 58, S. 151–162, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.06.024.
- Taylor, Paul C. J.; Nobre, Anna C.; Rushworth, Matthew F. S. (2007): Subsecond changes in top down control exerted by human medial frontal cortex during conflict and action selection: a combined transcranial magnetic stimulation electroencephalography study, in: *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, Jg. 27, Nr. 42, S. 11343–11353, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2877-07.2007.
- Telkes, Ilknur; Viswanathan, Ashwin; Jimenez-Shahed, Joohi; et al. (2018): Local field potentials of subthalamic nucleus contain electrophysiological footprints of motor subtypes of Parkinson’s disease, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 115, Nr. 36, S. E8567–E8576, doi: 10.1073/pnas.1810589115.
- Tort, Adriano B. L.; Komorowski, Robert W.; Manns, Joseph R.; et al. (2009): Theta–gamma coupling increases during the learning of item–context associations, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 106, Nr. 49, S. 20942–20947, doi: 10.1073/pnas.0911331106.
- Tort, Adriano B. L.; Kramer, Mark A.; Thorn, Catherine; et al. (2008): Dynamic cross-frequency couplings of local field potential oscillations in rat striatum and hippocampus during performance of a T-maze task, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 105, Nr. 51, S. 20517–20522, doi: 10.1073/pnas.0810524105.
- Triarhou, Lazaros C. (2013): *Dopamine and Parkinson’s Disease*, Landes Bioscience.
- Trottenberg, Thomas; Fogelson, Noa; Kühn, Andrea A.; et al. (2006): Subthalamic gamma activity in patients with Parkinson’s disease, in: *Experimental Neurology*, Jg. 200, Nr. 1, S. 56–65, doi: 10.1016/j.expneurol.2006.01.012.
- Vertes, Robert P. (2002): Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens, in: *Journal of Comparative Neurology*, Jg. 442, Nr. 2, S. 163–187, doi: 10.1002/cne.10083.
- Wang, H.; Peca, J.; Matsuzaki, M.; et al. (2007): High-speed mapping of synaptic connectivity using photostimulation in Channelrhodopsin-2 transgenic mice, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Jg. 104, Nr. 19, S. 8143–8148, doi: 10.1073/pnas.0700384104.
- Wang, Yun; Markram, Henry; Goodman, Philip H.; et al. (2006): Heterogeneity in the pyramidal network of the medial prefrontal cortex, in: *Nature Neuroscience*, Jg. 9, Nr. 4, S. 534–542, doi: 10.1038/nn1670.

- Warden, Melissa R.; Selimbeyoglu, Aslihan; Mirzabekov, Julie J.; et al. (2012): A prefrontal cortex–brainstem neuronal projection that controls response to behavioural challenge, in: *Nature*, Jg. 492, Nr. 7429, S. 428–432, doi: 10.1038/nature11617.
- Wiecki, Thomas V.; Frank, Michael J. (2013): A computational model of inhibitory control in frontal cortex and basal ganglia, in: *Psychological Review*, Jg. 120, Nr. 2, S. 329–355, doi: 10.1037/a0031542.
- Wilson, Charles J.; Bevan, Mark D (2011): Intrinsic dynamics and synaptic inputs control the activity patterns of subthalamic nucleus neurons in health and in Parkinson’s disease, in: *Neuroscience*, Jg. 198, S. 54–68, doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.06.049.
- Wulff, Peer; Ponomarenko, Alexey A.; Bartos, Marlene; et al. (2009): Hippocampal theta rhythm and its coupling with gamma oscillations require fast inhibition onto parvalbumin-positive interneurons, in: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 106, Nr. 9, S. 3561–3566, doi: 10.1073/pnas.0813176106.
- Yizhar, Ofer; Fenno, Lief E.; Davidson, Thomas J.; et al. (2011): Optogenetics in Neural Systems, in: *Neuron*, Jg. 71, Nr. 1, S. 9–34, doi: 10.1016/j.neuron.2011.06.004.
- Zavala, Baltazar A.; Tan, Huiling; Little, Simon; et al. (2014): Midline Frontal Cortex Low-Frequency Activity Drives Subthalamic Nucleus Oscillations during Conflict, in: *Journal of Neuroscience*, Jg. 34, Nr. 21, S. 7322–7333, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1169-14.2014.
- Zavala, Baltazar; Brittain, John-Stuart; Jenkinson, Ned; et al. (2013): Subthalamic Nucleus Local Field Potential Activity during the Eriksen Flanker Task Reveals a Novel Role for Theta Phase during Conflict Monitoring, in: *The Journal of Neuroscience*, Jg. 33, Nr. 37, S. 14758–14766, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1036-13.2013.
- Zavala, Baltazar; Zaghoul, Kareem; Brown, Peter (2015): The subthalamic nucleus, oscillations, and conflict, in: *Movement Disorders*, Jg. 30, Nr. 3, S. 328–338, doi: 10.1002/mds.26072.
- Zhang, Feng; Aravanis, Alexander M.; Adamantidis, Antoine; et al. (2007a): Circuit-breakers: optical technologies for probing neural signals and systems, in: *Nature Reviews Neuroscience*, Jg. 8, Nr. 8, S. 577–581, doi: 10.1038/nrn2192.
- Zhang, Feng; Vierock, Johannes; Yizhar, Ofer; et al. (2011): The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools, in: *Cell*, Jg. 147, Nr. 7, S. 1446–1457, doi: 10.1016/j.cell.2011.12.004.
- Zhang, Feng; Wang, Li-Ping; Brauner, Martin; et al. (2007b): Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry, in: *Nature*, Jg. 446, Nr. 7136, S. 633–639, doi: 10.1038/nature05744.

Zhou, X Edward; Melcher, Karsten; Xu, H Eric (2012): Structure and activation of rhodopsin, in: *Acta Pharmacologica Sinica*, Jg. 33, Nr. 3, S. 291–299, doi: 10.1038/aps.2011.171.

Internetquellen

http://www.everyvector.com/sequences/show_public/57717 (Zugriff am 10.07.2020)

Danksagung

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen hätte die Arbeit in dieser Form nicht realisiert werden können. Für die vielfältig erfahrene Hilfe, die effektiven Gespräche und den Zuspruch möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Alfons Schnitzler, der es mir ermöglichte, in so einem interessanten Thema zu promovieren. Für die konstruktiven Anregungen bin ich Ihnen sowie meiner Co-Betreuerin, Frau Prof. Charlotte von Gall, dankbar.

Meinem Betreuer, Herrn Prof. Alexey Ponomarenko, danke ich für die Initiierung der Studie in diesem herausfordernden Themenbereich und seiner fachlichen Hilfsbereitschaft.

Ich bedanke mich für die Zusammenarbeit bei den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Institutes für Klinische Neurowissenschaften und Medizinische Psychologie und der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben sowie Herrn Changwan Chen für die Einführung in die Mikroskopie.

Sara, my coworker in the lab in Duesseldorf, I am forever grateful for your kind and immense input you invested in our projects. I will never take your support for granted. Stay as passionate in your scientific career as you are.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie, besonders bei meinen Eltern und meinem Bruder, bedanken. Ich danke euch für den stetigen Rückhalt und die bestmögliche Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg. Lieber René, ich danke dir für deine immense Geduld, deine stets positive Art und liebevolle Unterstützung.