

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Die GAD67-GFP(Δ neo)-Maus als ein Tiermodell der Schizophrenie?
Untersuchungen von Verhalten und Neuromorphologie im Vergleich zu
Kontrolltieren.**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Christoph Elmers

aus Stade

Magdeburg 2017

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Elmers, Christoph:

Die GAD67-GFP(Δ neo)-Maus als ein Tiermodell der Schizophrenie? Untersuchungen von Verhalten und Neuromorphologie im Vergleich zu Kontrolltieren.

- 2017. - 130 Bl.: 31 Abb., 31 Tab.

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Dissertation

Kurzreferat

Die vorliegende Arbeit untersucht die GAD67-GFP(Δ neo)-Maus als Tiermodell der Schizophrenie. Durch einen Knock-in in einem unter Kontrolle des GAD67-Promotors stehenden Gens der Glutamat-Decarboxylase (GAD) 67 kommt es zum Verlust eines GAD67-Allels. Dadurch tritt ein ähnliches GABA-Defizit auf, wie es bei Patienten mit Schizophrenie bekannt ist. Die Tiere wurden im Vergleich zu Geschwistertieren (WT) auf Unterschiede im Verhalten und der Neuromorphologie untersucht. Für die Verhaltensversuche wurde ein Teil der Tiere zuvor sozial isoliert. Zudem wurde nach Geschlechtsunterschieden gesucht. Als Versuche dienten die soziale Interaktion im Offenfeld, die Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion (PPI) sowie der Forced Swim Test. Mittels Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Neurone in den Ursprungsregionen des cholinergen (Septum), dopaminergen (Substantia nigra/VTA) und serotonergen Systems (Raphekerne) analysiert. Im Hippokampus und in der Amygdala wurde die Faserdichte untersucht. In der sozialen Interaktion im Offenfeld zeigte sich, dass Genotyp, Geschlecht und Isolation Unterschiede bedingten. In der PPI mit kurzem Interpulsintervall zeigten männliche gegenüber weiblichen Tieren höhere Werte in der Schreckreaktion und der PPI. Bei einem längeren Interpulsintervall zeigten GFP-Mäuse eine niedrigere akustische Startle-Reaktion (ASR) als WT und männliche Tiere eine höhere als weibliche. Im Forced Swim Test zeigten GFP-Tiere unabhängig von einer Isolation ein depressiveres Verhalten als WT. GFP-Mäuse zeigten eine höhere dopaminerge Faserdichte in bestimmten Schichten des dorsalen Hippokampus als WT. Im cholinergen und serotonergen System wurden keine Genotypenunterschiede festgestellt.

Schlüsselwörter

Acetylcholin, Amygdala, Dopamin, Faserdichte, Forced Swim Test, GABA, GAD67, GFP, Hippokampus, Isolation, Präpulsinhibition, Raphekerne, Septum, Serotonin, soziale Interaktion, Substantia nigra, VTA

1. EINLEITUNG	1
1.1. Allgemeine Einleitung	1
1.2. Schizophrenie	2
1.2.1. Historisches	2
1.2.2. Epidemiologie und Klinik	2
1.2.3. Ätiopathogenese und Genetik.....	3
1.2.4. Morphologie	3
1.3. Neurobiochemische Veränderungen	4
1.3.1. Dopamin	4
1.3.1.1. Kerngebiete und Projektionen	4
1.3.1.2. Dopamin-Hypothese	5
1.3.2. Glutamat	5
1.3.2.1. Kerngebiete und Projektionen	5
1.3.2.2. Glutamat-Hypothese	6
1.3.3. GABA.....	6
1.3.3.1. Kerngebiete und Projektionen	6
1.3.3.2. GABA-Hypothese.....	7
1.3.4. Serotonin.....	7
1.3.4.1. Kerngebiete und Projektionen	7
1.3.4.2. Serotonin-Hypothese	8
1.3.5. Acetylcholin	8
1.3.5.1. Kerngebiete und Projektionen	8
1.3.5.2. Acetylcholin-Hypothese	9
1.4. Amygdala	10
1.4.1. Anatomie, Funktion und Projektionen	10
1.4.2. Amygdala und Schizophrenie.....	10
1.5. Hippokampus	11
1.5.1. Anatomie, Funktion und Projektionen	11
1.5.2. GABAerge Interneurone des Hippokampus.....	12
1.5.3. Hippokampus und Schizophrenie.....	12
1.6. Soziale Isolation und Schizophrenie	13
1.7. Geschlechtsunterschiede	14
1.8. Hypothese und Fragestellungen	14
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. Versuchstiere	16
2.1.1. Allgemeine Übersicht.....	16

Inhaltsverzeichnis

2.1.2.	Die Maus als Versuchstier	16
2.1.3.	Die GAD67-GFP(Δ neo)-Maus	17
2.1.4.	Ethische Grundlagen	17
2.1.5.	Versuchstiere	18
2.1.6.	Tierhaltung	18
2.2.	Verhaltensversuche.....	18
2.2.1.	Soziale Interaktion im Offenfeld	18
2.2.1.1.	Apparatur der sozialen Interaktion im Offenfeld.....	20
2.2.1.2.	Durchführung der sozialen Interaktion	20
2.2.2.	Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion.....	21
2.2.2.1.	Die Startle-Apparatur.....	22
2.2.2.2.	Durchführung des Startle-Versuchs.....	23
2.2.2.3.	Berechnung	24
2.2.3.	Forced Swim Test (FST) nach Porsolt	25
2.2.3.1.	Der Versuchsaufbau.....	25
2.2.3.2.	Ablauf des Versuchs	25
2.3.	Experimentelles Design der Verhaltensversuche.....	26
2.3.1.	Soziale Interaktion im Offenfeld	26
2.3.2.	Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion.....	26
2.3.3.	Forced Swim Test (FST) nach Porsolt	26
2.4.	Histologie	26
2.4.1.	Perfusion und Fixation	26
2.4.2.	Histologische Aufarbeitung.....	27
2.4.3.	Immunfluoreszenzfärbungen	27
2.5.	Zellzählung und Flächenbestimmung.....	27
2.5.1.	Technik	27
2.5.2.	Septum.....	28
2.5.3.	Substantia nigra und Area tegmentalis ventralis	28
2.5.4.	Raphekerne	29
2.5.5.	Abercrombie-Korrekturmodell.....	30
2.5.6.	Analyse der Faserdichte in Hippokampus und Amygdala	31
2.6.	Statistik	32
3.	ERGEBNISSE.....	34
3.1.	Soziale Interaktion im Offenfeld	34
3.1.1.	Unterschiede im Sozialverhalten	34
3.1.2.	Vergleich der motorischen Aktivität	37
3.1.3.	Unterschiede im Aufenthalt in den Versuchsregionen.....	38
3.2.	Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion	39
3.2.1.	Überprüfung des Versuchsaufbaus.....	39

Inhaltsverzeichnis

3.2.2.	Präpulsinhibition bei einem Interpulsintervall von 100ms.....	39
3.2.3.	Wirkung verschiedener PULSE-ALONE-Intensitäten auf die ASR.....	39
3.2.4.	Wirkung verschiedener PULSE-ALONE-Intensitäten auf die PPI.....	40
3.2.5.	Präpulsinhibition bei einem Interpulsintervall von 400ms.....	41
3.2.6.	Wirkung verschiedener PULSE-ALONE-Intensitäten auf die ASR.....	41
3.2.7.	Wirkung verschiedener PULSE-ALONE-Intensitäten auf die PPI.....	41
3.3.	Forced Swim Test.....	42
3.4.	Histologie	43
3.4.1.	Immunfluoreszenzfärbungen	43
3.4.2.	Cholinerge Marker.....	45
3.4.2.1.	ChAT-immunoreaktive Neurone im Septum.....	45
3.4.2.2.	ChAT-immunoreaktive Fasern in Hippokampus und Amygdala.....	45
3.4.3.	Dopaminerge Marker.....	47
3.4.3.1.	TH-immunoreaktive Neurone in Substantia nigra und VTA.....	47
3.4.3.2.	TH-immunoreaktive Fasern in Hippokampus und Amygdala.....	47
3.4.4.	Serotonerge Marker	50
3.4.4.1.	5-HT-IR Neurone der Raphekerne	50
3.4.4.2.	5-HT-immunoreaktive Fasern in Hippokampus und Amygdala	51
4.	DISKUSSION.....	53
4.1.	Einleitung der Diskussion	53
4.2.	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	53
4.3.	Versuchstierzahlen.....	55
4.4.	Soziale Interaktion im Offenfeld	55
4.4.1.	Sozialverhalten im Offenfeld	55
4.4.2.	Lokomotorische Aktivität im Offenfeld.....	56
4.4.3.	Angstassoziiertes Verhalten im Offenfeld.....	56
4.5.	Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion	57
4.6.	Forced Swim Test.....	61
4.7.	Neuromorphologie	62
4.7.1.	Synapsen auf GABAergen Neuronen im Hippokampus	62
4.7.2.	ChAT-IR Neurone und Nervenfasern	63
4.7.3.	Tyrosinhydroxylase-IR Neurone und Nervenfasern	63
4.7.4.	5-HT-IR Neurone und Nervenfasern.....	65
5.	ZUSAMMENFASSUNG	67
6.	ANHANG.....	68

Inhaltsverzeichnis

6.1. Literaturverzeichnis	68
6.2. Danksagung	86
6.3. Ehrenerklärung.....	87
6.4. Darstellung des Bildungsweges.....	88
6.5. Anlagen	90
6.5.1. Färbeprotokolle.....	90
6.5.1.1. Protokoll der Nissl-Färbung.....	90
6.5.1.2. Protokoll der immunhistochemischen Färbungen	90
6.5.2. Verfahren zur Bestimmung der Faserdichte	91
6.5.3. Abbildungen	93
6.5.3.1. ChAT-IR Neurone und Faserdichten	93
6.5.3.2. TH-IR Neurone und Faserdichten.....	95
6.5.3.3. 5-HT-IR Neurone und Faserdichten	97
6.5.3.4. Neuronale Verschaltungen der ASR und der PPI.....	99
6.5.4. Tabellen	100
6.5.4.1. Tabellen zu Parametern der sozialen Interaktion.....	102
6.5.4.2. Tabellen zur Präpulsinhibition bei einem Interpulsintervall von 100ms	107
6.5.4.3. Tabellen zur Präpulsinhibition bei einem Interpulsintervall von 400ms	110
6.5.4.4. Tabellen zu Parametern des Forced Swim Test.....	113
6.5.4.5. Tabellen zur Histologie.....	114

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Versuchsaufbau der sozialen Interaktion im Offenfeld	20
Abb. 2: Die Abschwächung der Schreckreaktion durch den Präpuls	22
Abb. 3: Aufbau der Startle-Apparatur	23
Abb. 4: Lage der analysierten Regionen im Septum	29
Abb. 5: Lage der Substantia nigra und Area tegmentalis ventralis	29
Abb. 6: Lage ausgewerteter Raphekerngebiete	30
Abb. 7: Schichtung des dorsalen Hippokampus und der Amygdala	31
Abb. 8: Schichtung des ventralen Hippokampus	32
Abb. 9: Schichtung des Gyrus dentatus des ventralen Hippokampus	32
Abb. 10: Soziale Interaktion	37
Abb. 11: Angstverhalten männlicher und weiblicher Tiere	39
Abb. 12: Wirkung der PULSE-ALONE-Intensitäten auf ASR + PPI beider Geschlechter (IPI 100ms)	40
Abb. 13: Wirkung der PULSE-ALONE-Intensitäten auf ASR + PPI beider Geschlechter (IPI 400ms)	41
Abb. 14: Immobilität und Latenz im Forced Swim Test	43
Abb. 15: ChAT-, TH- bzw. 5-HT-IR Afferenzen auf GFP-positiven GABAergen Neuronen	44
Abb. 16: Aufnahmen der ChAT-IR Neurone im Septum von GFP- und WT-Mäusen	45
Abb. 17: Aufnahmen der ChAT-IR Fasern des dorsalen Hippokampus von GFP- und WT-Mäusen	46
Abb. 18: Aufnahmen der TH-IR Neurone in Substantia nigra und VTA von GFP- und WT-Mäusen	47
Abb. 19: TH-IR Faserdichten in Hippokampus und Amygdala	48
Abb. 20: Aufnahmen der TH-IR Fasern des dorsalen Hippokampus von GFP- und WT-Mäusen	49
Abb. 21: Aufnahmen der 5-HT-IR Neurone im DR von GFP- und WT-Mäusen	50
Abb. 22: Aufnahmen der 5-HT-IR Neurone im MnR und PMnR von GFP-Mäusen und WT	50
Abb. 23: Aufnahmen der 5-HT-IR Fasern des dorsalen Hippokampus von GFP- und WT-Mäusen	51
Abb. 24: Zählgitter zur Faserdichtebestimmung	92
Abb. 25: ChAT-IR Neurone im Septum	93
Abb. 26: ChAT-IR Faserdichten in Hippokampus und Amygdala	94
Abb. 27: TH-IR Neurone in Substantia nigra und VTA	95
Abb. 28: TH-IR Faserdichten in Hippokampus und Amygdala	96
Abb. 29: 5-HT-IR Neurone in den Raphekernen	97
Abb. 30: 5-HT-IR Faserdichten in Hippokampus und Amygdala	98
Abb. 31: Neuronale Verschaltungen der akustischen Schreckreaktion und der Präpulsinhibition	99

Tabellenverzeichnis + Formelverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Parameter der sozialen Interaktion	21
Tab. 2: Bedeutung der Stimulusbezeichnungen	24
Tab. 3: Manuell erhobene Parameter des Forced Swim Test	25
Tab. 4: Primäre Antikörper der immunhistochemischen Färbungen	91
Tab. 5: Sekundäre Antikörper der immunhistochemischen Färbungen	91
Tab. 6: Mittelwerte der Versuche zur sozialen Interaktion	102
Tab. 7: Genotypen-, Geschlechts- und Behandlungsunterschiede der sozialen Interaktion (Teil 1).....	103
Tab. 8: Genotypen-, Geschlechts- und Behandlungsunterschiede der sozialen Interaktion (Teil 2).....	104
Tab. 9: Genotypen- und Behandlungsunterschiede der sozialen Interaktion weiblicher Tiere	105
Tab. 10: Genotypen- und Behandlungsunterschiede der sozialen Interaktion männlicher Tiere	105
Tab. 11: Genotypen-, Geschlechts- und Behandlungsunterschiede der sozialen Interaktion.....	106
Tab. 12: Mittelwerte der Versuche zur Präpulsinhibition bei einem IPI von 100ms	107
Tab. 13: Genotyp, Geschlecht, Behandlung und Intensität der PPI und ASR bei einem IPI von 100ms.....	108
Tab. 14: Genotyp, Behandlung und Intensität der ASR bei einem IPI von 100ms	108
Tab. 15: Genotyp, Behandlung und Intensität der Präpulsinhibition bei einem IPI von 100ms	108
Tab. 16: Genotypen- und Intensitätsunterschiede der ASR bei einem IPI von 100ms	109
Tab. 17: Genotypen- und Intensitätsunterschiede der Präpulsinhibition bei einem IPI von 100ms.....	109
Tab. 18: Mittelwerte der Versuche zur Präpulsinhibition bei einem IPI von 400ms	110
Tab. 19: Genotyp, Geschlecht, Behandlung und Intensität der PPI und ASR bei einem IPI von 400ms.....	111
Tab. 20: Genotyp, Behandlung und Intensität der ASR bei einem IPI von 400ms	111
Tab. 21: Genotyp, Behandlung und Intensität der Präpulsinhibition bei einem IPI von 400ms	111
Tab. 22: Genotypen- und Intensitätsunterschiede der Präpulsinhibition bei einem IPI von 400ms.....	112
Tab. 23: Genotypen- und Intensitätsunterschiede der ASR bei einem IPI von 400ms	112
Tab. 24: Genotypen- und Behandlungsunterschiede des Forced Swim Tests I	113
Tab. 25: Genotypen- und Behandlungsunterschiede des Forced Swim Tests II	113
Tab. 26: Zellzahl, Volumen und Zelldichte ChAT-IR Neurone im Septum	114
Tab. 27: Zellzahl, Volumen und Zelldichte TH-IR Neurone in der Substantia nigra und der VTA.....	114
Tab. 28: Zellzahl, Volumen und Zelldichte 5-HT-IR Neurone in den Raphekernen	115
Tab. 29: Dichte ChAT-IR Fasern in Hippokampus und Amygdala	116
Tab. 30: Dichte TH-IR Fasern in Hippokampus und Amygdala	117
Tab. 31: Dichte 5-HT-IR Fasern in Hippokampus und Amygdala	118

Formelverzeichnis

Formel 1: Errechnung der Präpulsinhibition (PPI)	24
Formel 2: Korrekturformel nach Abercrombie	30
Formel 3: Flächenberechnung zur Faserdichtebestimmung	92
Formel 4: Die Einheitsfläche P_A	92
Formel 5: Geschätzte Länge in einem Volumen L_V (Faserdichte)	93

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
ACh	Acetylcholin
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ANOVA	Analysis of variance
ASCII	American Standard Code for Information Interchange
ASR	akustische Startle-Reaktion
AZ	Aktenzeichen
BLA	basolaterale Amygdala
CA1-3	Cornu-amonis-Region 1-3
Cat. #	Katalognummer
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ce	zentraler Kern der Amygdala
CeC	kapsulärer Teil des zentralen Amygdalakerns
CeM	medialer Teil des zentralen Amygdalakerns
ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
D₁-Rezeptor	Dopamin-1-Rezeptor-Subtyp
DBH	Dopamin- β -Hydroxylase
DA	Dopamin
DG	Gyrus dentatus
DR	Nucleus raphe dorsalis
DNMT1	DNA-Methyltransferase 1
fMRI	funktionelle Magnetresonanztomografie
FST	Forced Swim Test
GABA	γ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GDH	Glutamatdehydrogenase
GFP	Green Fluorescence Protein
Gr	Stratum granulare des Gyrus dentatus
HDB	horizontales diagonales Band von Broca
HRM	heterozygote Reeler-Maus
ICR	Imprinting Control Region
Ig	Immunglobulin
IPI	Interpulsintervall
ISI	Interstimulusintervall
IR	immunoreaktiv

Abkürzungsverzeichnis

La	laterale Amygdala
Ld	lambdoidale septale Zone
LMol	Stratum lacunosum-moleculare
LS	laterales Septum
LSD	Lysergsäurediethylamid
LSD	dorsaler Anteil des lateralen Septums
LSI	intermediärer Anteil des lateralen Septums
LSV	ventraler Anteil des lateralen Septums
LTP	Langzeitpotenzierung
M₁-Rezeptor	muskarinerges Acetylcholin-Rezeptor Subtyp 1
mAChR	muskarinerges Acetylcholin-Rezeptor
MAO	Monoaminoxidase
ML	Stratum multiforme des Gyrus dentatus
MnR	Nucleus raphe medianus
Mol	Stratum moleculare des Gyrus dentatus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	mediales Septum
MSDB	Diagonales Band von Broca Komplex
NA	Noradrenalin
nAChR	nikotinerges Acetylcholin-Rezeptor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Or	Stratum oriens
P21	21. Lebensstag (postnatal)
PARV	Parvalbumin
PBS	Phosphatpuffer
PCP	Phencyclidin
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFC	Präfrontaler Kortex
PMnR	Nucleus raphe paramedianus
PnR	pontiner Nucleus raphe
PPI	Präpulsinhibition
Py	Stratum pyramidale
Rad	Stratum radiatum
RELN	Reelin
SI	Soziale Interaktion

Abkürzungsverzeichnis

SN	Substantia nigra
SNAP-25	Synaptosomal-associated protein 25
SNC	Substantia nigra pars compacta
SNL	Substantia nigra pars lateralis
SNR	Substantia nigra pars reticularis
SPL	Sound pressure level, Schalldruckpegel
TH	Tyrosinhydroxylase
VDB	vertikales diagonales Band
VTA	Area tegmentalis ventralis
WT	Wildtyp (Wurfgeschwister)

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einleitung

Unter der Schizophrenie versteht man eine Gruppe von psychiatrischen Erkrankungen, die durch Ich-Störungen, formale Denkstörungen, Wahn, Halluzinationen, Störungen der Affektivität sowie Störungen der Psychomotorik und des Sozialverhaltens gekennzeichnet sind. Sie weisen in ihrer Symptomatik ein sehr heterogenes Bild auf, wobei nachweisbare somatische Korrelate fehlen können (Möller et al., 2009). Die Grundlagen der Erkrankungen sind bis heute nicht komplett verstanden und daher Inhalt aktueller Forschung. Als Auslöser werden allerdings das Zusammenspiel einer genetischen Disposition sowie verschiedener Umweltfaktoren vermutet (Möller et al., 2009). Neuropsychopharmakologische Studien fokussieren sich auf die Rolle verschiedener Neurotransmittersysteme, was bis dato zu zahlreichen Entstehungshypothesen der Schizophrenie führte. Da jedoch keine dieser Hypothesen allein die Erkrankung erklären kann, scheint die Annahme einer Beteiligung mehrerer Systeme zugleich plausibel. Post-mortem-Untersuchungen haben gezeigt, dass schizophrene Patienten eine um 50% verminderte Glutamat-Decarboxylase 67 (GAD67)-mRNA-Expression im präfrontalen Kortex, Hippokampus und anderen Hirnarealen aufweisen. Die GAD67 ist neben der GAD65 eine Isoform der Glutamat-Decarboxylase, dem Enzym zur Synthese von GABA (γ -Aminobuttersäure). Ein GAD67-Defizit hat zunächst Auswirkungen auf das GABAerge System der genannten Regionen. Daraus resultiert aber wiederum eine Beeinflussung nachgeschalteter Neurotransmittersysteme (Akbarian et al., 1995; Impagnatiello et al., 1998; Guidotti et al., 2000; Duncan et al., 2010). Die GAD67-GFP(Δ neo)-Maus (Tamamaki et al., 2003), im Folgenden als GAD67-GFP-Maus bezeichnet, weist durch einen Knock-in in einem Allel des GAD67-Gens ein GABAerges Defizit, vergleichbar mit dem schizophrener Patienten, auf (Wang et al., 2009). Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit, herauszufinden, ob und inwiefern sich die GAD67-GFP-Maus als Tiermodell der Schizophrenie eignet. Interessant sind dabei vor allem die möglichen Auswirkungen des selektiven GAD67-Defizits auf das Verhalten sowie auf die Morphologie bestimmter Hirnareale, wie sie bereits in Post-mortem-Studien bei Patienten mit Schizophrenie beobachtet wurden (Bakhshi und Chance, 2015). Eines der Ziele war der Nachweis cholinerg, dopaminerger und serotonerger Terminalien auf einem GAD67-positiven GABAergen Neuron im Hippokampus. Weitere morphologische Studien konzentrierten sich auf die Analyse cholinerg, dopaminerger und serotonerger Marker in den neuronalen Ursprungs- und Zielgebieten an GAD67-GFP-Tieren im Vergleich zu Wurfgeschwistertieren (WT). Zudem erfolgte die Analyse des Verhaltensphänotyps

1 Einleitung

(Sozialverhalten, Motorik, sensorimotorische Filterfunktion, depressives Verhalten). Zur Untersuchung von Verhaltensauffälligkeiten diente die Beurteilung der sozialen Interaktion im Offenfeld zwischen zwei Tieren. Weiterhin wurden Versuche zur Präpulsinhibition (PPI) als Untersuchungsmethode des sensorimotorischen Gatings und der Forced Swim Test (FST) zur Untersuchung von depressivem Verhalten durchgeführt.

1.2. Schizophrenie

1.2.1. Historisches

Einzelne Symptome der Erkrankung wurden bereits in der Antike beschrieben. Eine erste Einordnung nahm jedoch Emil Kraepelin im Jahre 1893 vor, der das Krankheitsbild als „Dementia praecox“ (vorzeitige Verblödung) beschrieb (Kraepelin, 1893; Möller et al., 2009) und dabei auf eine „ungemein rasche Entwicklung eines dauernden psychischen Schwächezustands“ hinwies. Im Jahre 1911 führte Eugen Bleuler den Begriff „Schizophrenie“ (Bewusstseinsspaltung) ein, wobei für ihn die Spaltung des psychischen Erlebens eine Hauptrolle spielte (Bleuler, 1911; Möller et al., 2009). Er benannte „Grundsymptome“ wie Autismus, Ambivalenz, Assoziationslockerung und Affektstörung, sowie sogenannte „akzessorische“ Symptome (Wahnphänomene, katatone Symptome und Sinnestäuschungen) als Reaktion auf die Erkrankung.

1.2.2. Epidemiologie und Klinik

Die Prävalenz der schizophrenen Psychosen liegt zwischen 1,4 und 4,6 pro 1.000 Einwohner, die Inzidenz etwa bei 16 – 42 pro 100.000 Einwohner (Jablensky, 2000). Das Lebenszeitrisko der Durchschnittsbevölkerung beträgt ungefähr 1%. Männer und Frauen sind dabei insgesamt gleich häufig betroffen, jedoch erkranken bis zum 21. Lebensjahr mehr Männer, wohingegen nach dem 30. Lebensjahr vor allem bei Frauen die Erstdiagnose einer Schizophrenie gestellt wird (Möller et al., 2009; Haeffner et al., 1995). Es präsentiert sich ein sehr heterogenes Erscheinungsbild schizophrener Erkrankungen, wobei im klinischen Sprachgebrauch oft eine Unterteilung in Positiv- und Negativsymptomatik vorgenommen wird (Crow, 1980; Andreasen, 1987; Kay et al., 1987). Unter dem Begriff der Positivsymptomatik werden solche Symptome zusammengefasst, die zusätzlich zum normalen Erleben auftreten (Wahnvorstellungen, Halluzinationen, Ich-Störungen, formale Denkstörungen). Die Negativsymptome sind durch den Wegfall vorher vorhandener, physiologischer Merkmale gekennzeichnet (Alogie, Affektverflachung, Apathie, Anhedonie, Asozialität, Aufmerksamkeitsstörungen, depressive Verstimmung). Es müssen dabei nie alle Symptome gemeinsam vorhanden sein, sie können ebenso einzeln auftreten (Braus, 2005).

1 Einleitung

Abzugrenzen von der Negativsymptomatik bei Patienten mit Schizophrenie ist die Depression, welche den affektiven Störungen zugeordnet wird und als eigenständige Erkrankung gilt. Sie ist gekennzeichnet durch Antriebshemmung, negative Gedanken und gedrückte Stimmung (Möller et al., 2009). Damit einhergehend ist oft eine deutliche Minderung der Leistungsfähigkeit und des Interesses am Leben. Aufmerksamkeits- und Informationsverarbeitungsstörungen sind typisch für schizophrene Patienten und werden zu den Hauptsymptomen gezählt. Dies führt zu einer Reizüberflutung durch das Versagen der sensorimotorischen Filterfunktion, da nicht mehr zwischen wichtigen und unwichtigen Umwelteinflüssen unterschieden werden kann (Meincke et al., 2001).

1.2.3. Ätiopathogenese und Genetik

Die multifaktorielle Genese der Erkrankung gilt als sehr wahrscheinlich, wobei offenbar genetische Faktoren die Hauptrolle spielen. Einen Hinweis darauf gibt beispielsweise eine Konkordanzrate von 30-50% bei monozygoten Zwillingen und von 10% bei dizygoten Zwillingen (Wong und van Tol, 2003). Ein polygenes Vererbungsmuster gilt als sehr wahrscheinlich, wobei der genaue Vererbungsmodus trotz moderner molekulargenetischer Forschung bisher unklar ist (O'Tuathaigh et al., 2007). Die unvollständige Konkordanz bei monozygoten Zwillingen deutet allerdings darauf hin, dass neben genetischen noch weitere Faktoren eine Rolle spielen und die genetische Disposition keine 100%ige Penetranz besitzt (Möller et al., 2009). Zu den bekannten Risiko- bzw. Umweltfaktoren zählen daher noch prä- und perinatale Komplikationen (u.a. Virusinfektionen), Cannabiskonsum, Alter, soziale Faktoren, Migration, frühe traumatische Erlebnisse sowie Epilepsie durch strukturelle Abnormitäten des ZNS (Cantor-Graae, 2007; McGrath et al., 2008; Schlossberg, 2010; Brown 2011). Daraus ergibt sich die „Two-hit-Hypothese“, wonach einem „First hit“ (genetische Disposition) ein „Second hit“ (z.B. Umweltfaktoren, Drogenkonsum, Stress) folgt, welcher das durch zunächst ausreichende Kompensationsmechanismen erreichte psychische Gleichgewicht aufhebt und zum Ausbruch der Erkrankung führt (Bayer et al., 1999). Bei der bereits erwähnten polygenen Vererbung wird eine Kopplung sog. „Vulnerabilitätsgene“ angenommen. Studiendaten machen deutlich, dass mehrere genetische Faktoren die Schizophrenie bedingen können, was eine Heterogenie als Ursache sehr wahrscheinlich macht (O'Tuathaigh et al., 2007).

1.2.4. Morphologie

Neuromorphologische Studien an Patienten mit Schizophrenie zeigen Erweiterungen der Ventrikel sowie der äußeren Liquorräume (Andreasen et al., 1997; Harrison, 1999).

1 Einleitung

Typische neuropathologische Befunde wie ein genereller Zellverlust oder eine reaktive Gliose fehlen jedoch (Bogerts, 1999). Zentrale limbische Strukturen im Temporallappen weisen neben pathologischen Zellanordnungen auch Parenchymverluste auf. So zeigen sich beispielsweise Atrophien des Hippokampus (Heckers und Konradi, 2014). In der funktionellen Bildgebung stellen sich zudem eine Hypoämie bzw. ein Hypometabolismus des Frontallappens („Hypofrontalität“) dar (Möller et al., 2009). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Dichte synaptischer Spines auf Pyramidenzellen der Schicht III des Kortex schizophrener Patienten reduziert ist, was am meisten im temporalen und frontalen Assoziationskortex deutlich wird (Garey et al., 2010; Ide und Lewis, 2010). Diese Veränderungen können als morphologische Korrelate von Verhaltensänderungen bei Patienten mit Schizophrenie gedeutet werden, wobei allerdings von einer langen Latenz bis zu deren Manifestation auszugehen ist (Lewis und Levitt, 2002).

1.3. Neurobiochemische Veränderungen

In die Genese der Schizophrenie sind offenbar mehrere Transmittersysteme involviert. Von besonderem Interesse sind dabei das dopaminerge, glutamaterge, GABAerge, serotonerge und das cholinerge System (Carlsson et al., 2001; Abi-Dargham et al., 1997; Lewis et al., 2005; Raedler et al., 2007). Hieraus können verschiedene Entstehungshypothesen abgeleitet werden.

1.3.1. Dopamin

1.3.1.1. Kerngebiete und Projektionen

Die dopaminergen Kerngebiete sind vornehmlich in der Substantia nigra (SN), dort im Wesentlichen in der Pars compacta (SNC), und der ventralen tegmental Area (VTA) des Mittelhirns lokalisiert. Ebenfalls liegen dopaminerge Neurone vereinzelt in der Substantia nigra pars reticularis (SNR) und pars lateralis (SNL), wobei die SNR jedoch vor allem GABAerge Neurone enthält. Es werden, ausgehend von diesen Ursprungsregionen, mehrere dopaminerge Bahnsysteme unterschieden: Die mesolimbische Bahn enthält Projektionen der VTA zum Nucleus accumbens, dem Hippokampus, der Amygdala und dem Septum. Über die mesokortikale Bahn ist die VTA mit dem orbito-, präfrontalen und zingulären Kortex verbunden, welche wichtig für Verhaltens-, Lern- und Gedächtnisvorgänge, Motivation und Aufmerksamkeit sind. Die nigrostriatale Bahn hingegen verbindet die SN mit dem dorsalen Striatum, wobei ihre Bedeutung in der Bewegungsinitiierung und sensorimotorischen Funktion liegt (Meltzer und Stahl, 1976; Mogenson et al., 1980; Guillin et al., 2007). Zudem verlaufen Kollateralen zum Thalamus und in den Hirnstamm (Prensa et al., 2009). Eine

1 Einleitung

absolute morphologische Trennung dieser drei Bahnsysteme ist jedoch nicht möglich, da Neurone sich teilweise über SN und VTA verteilen und somit Projektionen in andere Zielgebiete möglich sind. Daher kann ebenfalls eine Einteilung in einen ventralen und einen dorsalen Bereich der dopaminergen Ursprungsgebiete vorgenommen werden (Bjorklund und Dunnett, 2007).

1.3.1.2. Dopamin-Hypothese

Für eine dopaminerge Beteiligung der Schizophrenie spricht einerseits, dass durch klassische Neuroleptika wie Haloperidol über die Blockade von D₂-Rezeptoren eine Reduktion von psychotischen Symptomen erreicht werden kann. Dabei wurde eine Korrelation der antipsychotischen Potenz der jeweiligen Neuroleptika mit der Affinität zum D₂-Rezeptor festgestellt (Seeman et al., 1976; Gelders et al., 1990). Andererseits ist die Auslösung und Verstärkung schizophreientypischer Psychosen durch Amphetamin, einem Dopamin-Rezeptorantagonisten, bei Patienten mit Schizophrenie und Gesunden bekannt (Hawken und Beninger, 2013). Dopaminagonisten können eine Negativsymptomatik mindern, was durch klassische Neuroleptika jedoch kaum möglich ist (Carlsson et al., 1999; Lewis und Lieberman, 2000; Berger et al., 2004). Die Dopamin-Hypothese geht von einer dopaminergen Hypoaktivität im Frontalhirn aus, welche mit Negativsymptomen einhergeht, und einer Hyperaktivität im mesolimbischen System, welche mit Positivsymptomen verbunden ist (van Rossum, 1966; Jentsch und Roth, 1999). Zusammenfassend ist diese Hypothese aufgrund eines dopaminergen Ungleichgewichtes ein guter Ansatz zur Erklärung der Positivsymptomatik. Da jedoch klassische Neuroleptika keine Wirkung auf die Negativsymptomatik haben, reicht sie allein nicht aus.

1.3.2. Glutamat

1.3.2.1. Kerngebiete und Projektionen

Von Pyramidenzellen des Kortex aus verlaufen glutamaterge Projektionen in Hippokampus, Amygdala, Basalganglien und kortikale Neuronenschaltkreise. Zudem wurde der NMDA-Rezeptor auf GABAergen, noradrenergen und serotonergen Neuronen nachgewiesen, welche wiederum glutamaterge Pyramidenzellen in Kortex und Hippokampus inhibieren (Farber et al., 2003). Im Hippokampus ist der NMDA-Rezeptor essentiell für die Langzeitpotenzierung (Michaelis, 1998; Kessels und Malinow, 2009). Die intrahippokampalen Moosfasern der Körnerzellen aktivieren ebenfalls glutamaterg die Pyramidenzellen der CA3-Region (Frotscher, 1989).

1 Einleitung

1.3.2.2. Glutamat-Hypothese

Bei der Glutamat-Hypothese als Erklärungsansatz der Schizophrenie handelt es sich um die Annahme einer Rezeptorfunktionsstörung oder fehlerhaften Erregungsübertragung. Über präsynaptische NMDA-Rezeptoren in glutamatergen Arealen wie dem präfrontalen Kortex (PFC) und dem Hippokampus wird die tonische Freisetzung von Dopamin in subkortikalen Arealen getriggert (Kegeles et al., 2000). Das glutamaterge und dopaminerge System sind daher eng miteinander verbunden. Dopaminerge Neurone modulieren zudem glutamaterge Neurone in Hippokampus und Kortex. Aufgrund dieser Interaktionen wird angenommen, dass ein Glutamatmangel einen Anstieg der phasischen Dopaminfreisetzung bewirkt, was eine subkortikale dopaminerge Hyperfunktion zur Folge hätte (Grace, 1991). Zudem wurde beobachtet, dass NMDA-Rezeptorantagonisten wie Ketamin, Dizocilpin oder Phencyclidin (PCP) psychoseähnliche Symptome mit sowohl Positiv- als auch Negativsymptomatik auslösen können (Javitt und Zukin, 1991). PCP setzt dabei offenbar den NMDA-Rezeptortonus auf GABAergen Neuronen des Hippokampus herab. Dies führt zu einer Disinhibition nachgeschalteter Pyramidenzellen, bedingt durch eine GABAerge Hypofunktion. Daraus wiederum kann eine Hyperlokomotion resultieren (Olney und Farber, 1995; Greene, 2001).

1.3.3. GABA

Der Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) wird durch die bereits erwähnte Glutamat-Decarboxylase (GAD) synthetisiert, welche in den Isoformen 65kDa (GAD65) und 67kDa (GAD67) existiert. Dabei werden beide Isoformen gemeinsam von GABAergen Neuronen exprimiert (Benes und Berretta, 2001). Der GABA-Rezeptor wird indes in drei Subtypen unterteilt, den GABA_A-, GABA_B- und GABA_C-Rezeptor. Allen ist gemein, dass eine Aktivierung zur Hyperpolarisation des Neurons führt, was GABA zum wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im ZNS macht. Der GABA_A-Rezeptor hat die Besonderheit, dass er eine Bindungsstelle für Alkohol, Benzodiazepine und Barbiturate aufweist (Bormann, 2000; Stephenson, 2006; Enna und McCarson, 2013). GABAerge Neurone exprimieren zudem kalziumbindende Proteine (Calbindin, Calretinin, Parvalbumin) sowie verschiedene Neuropeptide, wodurch sie ebenfalls weiter unterteilt werden können.

1.3.3.1. Kerngebiete und Projektionen

GABA wird hauptsächlich von inhibitorischen Interneuronen des Kortex, limbischen Systems und Thalamus exprimiert (Bogerts, 2008). GABAerge Neurone nehmen eine wichtige Stellung in den Basalganglien ein, wo sie an der Modulation von Motorik beteiligt sind. Vom diagonalen Band von Broca Komplex des medialen Septums (MSDB) verlaufen

1 Einleitung

GABAerge Fasern über den Fornix in den limbischen Kortex und den Hippokampus. Letzter projiziert ebenfalls GABAerg zurück zum MSDB. GABAerge Neurone des medialen Septums sind weiterhin an Gedächtnisvorgängen beteiligt (Pang et al., 2011).

1.3.3.2. GABA-Hypothese

Post-mortem-Studien an Patienten mit Schizophrenie haben eine um etwa 50% verminderte GAD67-mRNA u.a. im Hippokampus und im präfrontalen Kortex gezeigt, wohingegen die GAD65-mRNA nicht beeinflusst war (Akbarian et al., 1995; Impagnatiello et al., 1998; Guidotti et al., 2000). Ein GAD67-Defizit hat Auswirkungen auf das GABAerge System der genannten Regionen, woraus wiederum eine Beeinflussung nachgeschalteter Neurotransmittersysteme resultieren kann. Vermutet wird, dass ein GABA-Mangel zur Disinhibition des dopaminergen Systems führen kann, was sich wiederum in Verhaltensänderungen äußern soll. Denkbar wären hier unter anderem ein gestörtes Sozialverhalten, eine gestörte sensorimotorische Filterfunktion oder auch eine lokomotorische Hyperaktivität. So wird einer gestörten PPI ein Mangel an GABA als Ursache zugeschrieben (Bogerts, 2008). Zudem fand man bei Patienten mit Schizophrenie eine verminderte Anzahl Parvalbumin (PARV)-positiver Neurone in Kortex und Hippokampus (Benes et al., 1998; Reynolds et al., 2001; Bitanhirwe et al., 2009), wobei allerdings noch nicht klar ist, ob lediglich eine verminderte PARV-Expression vorherrscht oder gar die Neuronenzahl herabgesetzt ist (Lewis et al., 2005). Eine GABAerge Unterfunktion von Interneuronen kann nachfolgend zur glutamatergen Exzitation von Pyramidenzellen führen, da GABAerge Interneurone Pyramidenzellen physiologisch direkt inhibitorisch modulieren. Ein weiteres Merkmal einer GABAergen Unterfunktion ist, dass in Hippokampi von Patienten mit Schizophrenie teils erhöhte GABA-Rezeptordichten gemessen wurden (Benes und Berretta, 2001). Grundsätzlich kann jedoch eine Hypofunktion im GABAergen System alleine nicht für die Symptomatik der Schizophrenie verantwortlich gemacht werden. Das zeigt die fehlende antipsychotische Wirksamkeit von Benzodiazepinen, welche, wie bereits erwähnt, synergistisch an GABA_A-Rezeptoren wirken (Bogerts, 2008).

1.3.4. Serotonin

1.3.4.1. Kerngebiete und Projektionen

Serotonerge Neurone sind v.a. in den Raphekernen lokalisiert, welche sich in der medialen Formatio reticularis vom Mittelhirn über den Pons bis in die Medulla oblongata ausdehnen (Azmitia und Whitaker-Azmitia, 1995). Die Nuclei raphes werden in eine inferiore und eine superiore Gruppe eingeteilt, wobei bei den superioren Kernen zudem in eine rostrale und

1 Einleitung

eine kaudale Gruppe unterschieden wird. Die superiores rostralen Kerne umfassen unter anderem den Nucleus raphe dorsalis (DR). Zur superiores kaudalen Gruppe werden neben anderen der Nucleus raphe medianus (MnR) und Nucleus raphe paramedianus (PMnR) gezählt (Azmitia und Whitaker-Azmitia, 1995). Vom DR verlaufen Bahnen zum Frontalhirn, in das Striatum, in die Amygdala und den ventralen Hippokampus, in den anterioren olfaktorischen Kortex, den mediodorsalen Thalamus und das Septum (Adell und Myers, 1995; McQuade und Sharp, 1997; De Olmos und Heimer, 1980; Risold und Swanson, 1997; Waselus, 2011). Der MnR ist hingegen mit dem dorsalen Hippokampus, dem zingulären Kortex und dem Septum efferent verbunden (Mokler et al., 1998; Thomas et al., 2000; Moore und Halaris, 1975). Beide Kerne unterhalten Faserverbindungen zum Nucleus accumbens, der VTA und dem Hypothalamus (Kapur und Remington, 1996; Abi-Dargham et al., 1997). Das Rückenmark erhält Fasern aus der inferioren Kerngruppe (Azmitia und Whitaker-Azmitia, 1995). Zudem wurde festgestellt, dass auch die einzelnen Subkerngebiete der Nuclei raphes untereinander gut vernetzt sind (Jacobs und Azmitia, 1992).

1.3.4.2. Serotonin-Hypothese

Eine Verbindung zur Schizophrenie lässt sich über die Beobachtung herstellen, dass halluzinogene Substanzen wie Meskalin oder Lysergsäurediethylamid (LSD) eine agonistische Wirkung an 5-HT₂-Rezeptoren besitzen und darüber Positivsymptome auslösen können (Penington und Fox, 1994; Halberstadt und Geyer, 2013). Zudem ist bekannt, dass atypische Neuroleptika wie Clozapin an 5-HT₂-Rezeptoren antagonistisch, sowie teilweise an 5-HT₁-Rezeptoren agonistisch, wirken und somit eine Negativsymptomatik verbessern. Studien an Hirnen schizophrener Patienten ergaben niedrigere Konzentrationen von 5-HT₂-Rezeptoren und höhere von 5-HT₁-Rezeptoren (Burnet et al., 1997; Harrison, 1999). Obwohl es keinerlei Hinweise auf eine direkte Dysfunktion des serotonergen Systems bei schizophrenen Patienten gibt (Bogerts, 2008), wird aufgrund der geschilderten Vernetzungen mit anderen Transmittersystemen und klinischen Beobachtungen nach Applikation der genannten Substanzen von einer Mitbeteiligung bei der Genese der Schizophrenie ausgegangen (Roth und Meltzer, 2000; Abdolmaleky et al., 2014).

1.3.5. Acetylcholin

1.3.5.1. Kerngebiete und Projektionen

Im ZNS wurden zwei Typen von cholinergen Neuronen nachgewiesen. So kommen cholinerge Interneurone vor allem im Striatum und Nucleus accumbens vor, cholinerge Projektionsneurone wurden im basalen Vorderhirn sowie im Hirnstamm nachgewiesen. Die

1 Einleitung

cholinergen Projektionsneurone des basalen Vorderhirns liegen dabei vor allem im medialen Septum (MS), im diagonalen Band von Broca Komplex (MSDB) und im Nucleus basalis magnocellularis (Meynert). Projektionen verlaufen in den Kortex sowie den Hippokampus. Dort wirken sie regulierend auf die synaptische Kommunikation und sind an kognitiven Vorgängen beteiligt (Yakel, 2013). Vom lateralen Septum (LS) projizieren cholinerge Projektionsneurone in die Area praeoptica des Hypothalamus, in die Amygdala, in den Thalamus und in den Hippokampus (Risold und Swanson, 1997). Im Hirnstamm finden sich cholinerge Neurone v.a. im laterodorsalen und pedunculopontinen tegmentalen Kerngebiet und projizieren in Mittelhirn und andere Gebiete des Hirnstamms (Mesulam et al., 1983; Perry et al., 1999; Mesulam, 2004).

1.3.5.2. Acetylcholin-Hypothese

Post-mortem-Untersuchungen an Patienten mit Schizophrenie zeigen eine reduzierte Anzahl cholinergischer Interneurone im ventralen Striatum (Holt et al., 1999 + 2005). Ebenfalls fand man verminderte Rezeptordichten von M₁- und M₄-Rezeptoren im dorsalen Striatum, Hippokampus, präfrontalen Kortex und Gyrus temporalis superior schizophrener Patienten (Dean et al., 1996 + 2002; Crook et al., 1999 + 2001; Deng und Huang, 2005). Es wird vermutet, dass die regional verminderte Dichte dieser Rezeptoren schizophrenietypisch ist, da sie bei anderen psychiatrischen Erkrankungen wie den bipolaren Störungen oder der Depression nicht nachgewiesen werden konnte (Raedler et al., 2007). In pharmakologischen Studien zeigte sich, dass Anticholinergika wie Atropin und Skopolamin, welche als mAChR-Antagonisten wirken, bei Gesunden kognitive Dysfunktionen und in höheren Dosen sogar schizophrenietypische Halluzinationen induzieren können (Ellis et al., 2006; Perry und Perry, 1995). Aus der Applikation dieser Medikamente bei Patienten mit Schizophrenie resultierte zwar eine Verschlechterung des psychischen Zustandes, jedoch eine Milderung der Negativsymptomatik, was oft einen Substanzmissbrauch zur Folge hat (Johnstone et al., 1983; Singh et al., 1987; Chouinard et al., 1987; Tandon et al., 1991, 1992; Zemishlany et al., 1996). Weiter zeigte sich bei Patienten mit Schizophrenie nach Applikation von Acetylcholinesteraseinhibitoren und folglich steigender ACh-Konzentration im synaptischen Spalt eine 20%ige Reduktion von Positivsymptomen bei gleichzeitiger Gabe von Neuroleptika wie Risperidon oder Olanzapin (Tandon, 1999). Dass die meisten an Schizophrenie erkrankten Patienten Raucher sind, wird mit der „Hypothese der Selbstmedikation“ erklärt, die besagt, dass durch im Zigarettenrauch enthaltenes Nikotin nACh-Rezeptoren aktiviert und somit kognitive Prozesse verbessert werden (Young und Geyer, 2013; Romano et al., 2014).

1 Einleitung

Mit keinem der genannten Transmittersysteme allein kann die Pathogenese der Schizophrenie vollständig erklärt werden. Somit muss eine Dysbalance mehrerer Systeme gleichzeitig vorliegen (Carlsson et al., 1999).

1.4. Amygdala

1.4.1. Anatomie, Funktion und Projektionen

Die Amygdala liegt als Teil des limbischen Systems beiderseits im Temporallappen und umfasst eine sehr heterogene Kerngruppe, wobei die jeweiligen Kerne durch ihre Chemo- und Zytoarchitektur sowie durch ihre efferenten Faserverläufe gut voneinander abgrenzbar sind. Die Amygdala ist an Prozessen von Aufmerksamkeit und Gedächtnis sowie an der Furchtgenerierung und der Bewertung emotionalen und sensorischen Inputs beteiligt (Davis, 1992; Amaral und Insausti, 1992; Fernando et al., 2013). Sie empfängt ihre Afferenzen über den lateralen Amygdalakomplex (La), der jedoch keine weiteren intraamygdalären Afferenzen aufweist (Pitkänen et al., 1997). Die amygdalären Efferenzen nehmen ihren Ursprung hauptsächlich im zentralen Kern (Ce), nachdem sie zwischen den einzelnen Kernen verschaltet und modifiziert wurden. Sie verlaufen zum Hypothalamus, zum basalen Vorderhirn, in den Hirnstamm sowie ins Septum, wo eine Antwort auf die sensorischen Stimuli generiert wird (Pitkänen et al., 1997).

1.4.2. Amygdala und Schizophrenie

Obwohl bereits viele Untersuchungen der Amygdala im Hinblick auf neurobiochemische Veränderungen bei Patienten mit Schizophrenie erfolgt sind, ist ihre Beteiligung an der Erkrankung noch immer nicht vollständig verstanden. Allerdings wurde eine Volumenreduktion der Amygdala bei diesen Patienten nachgewiesen (Levitt et al., 2010). Zudem zeigte sich eine amygdaläre Hypoaktivität bei der Präsentation von emotionalen Gesichtsausdrücken (Heimberg et al., 1992; Kosaka et al., 2002; Li et al., 2010). Da der Amygdala ein hoher Stellenwert bei der Entstehung von Angst und Emotion zugeschrieben wird, vermutet man eine Beteiligung an der emotionalen Dysregulation bei Patienten mit Schizophrenie (Davis, 1992; Aleman und Kahn, 2005). In Tierversuchen zeigte sich, dass Individuen mit erheblichen Schädigungen der Amygdala ihre Angstreaktionen vollständig verlieren, was ebenfalls teilweise bei an Schizophrenie erkrankten Patienten beobachtet wird (Benes, 2010). Weiterhin hat die mediale Amygdala eine große Bedeutung für das Sozialverhalten (Murakami et al., 2011). So rufen Läsionen ein reduziertes Aggressionsverhalten und sozialen Rückzug hervor (Wang et al., 2013).

1.5. Hippokampus

1.5.1. Anatomie, Funktion und Projektionen

Auch der Hippokampus gehört zum limbischen System und erstreckt sich mit seiner gebogenen Form von rostral-dorsal der Septumkerne nach kaudal-ventral in den Temporallappen beider Hemisphären. Im Gegensatz zum Neokortex weist der Hippokampus lediglich eine Dreischichtung auf (Andersen et al., 1969). Es werden folgende Areale unterschieden: der Gyrus dentatus (DG), die drei Cornu ammonis (CA)-Regionen CA1-3 sowie das Subiculum. Dabei zeigen die CA-Regionen einen ähnlichen Aufbau und bestehen jeweils aus folgenden Schichten: Stratum oriens (Or), Stratum pyramidale (Py), Stratum radiatum (Rad) und Stratum lacunosum-moleculare (LMol). Die Schichtung des DG besteht aus Stratum moleculare (Mol), Stratum granulare (Gr) und Stratum multiforme (ML, Hilus). Funktionell wird der Hippokampus in einen dorsalen und einen ventralen Anteil untergliedert. Der dorsale Hippokampus hat eine Bedeutung für kognitive Funktionen, der ventrale für Stress, Emotionen und Affekthandlungen. So korreliert die Genexpression in Neuronen des dorsalen Hippokampus mit kortikalen Neuronen und die des ventralen Hippokampus mit Neuronen der Amygdala und des Hypothalamus (Fanselow und Dong, 2010). Afferente Konnektionen haben ihren Ursprung vornehmlich im entorhinalen Kortex (Tractus perforans) und enden vornehmlich an Dendriten körnerzellartiger Neurone der äußeren Molekularschicht des DG. Diese Neurone projizieren glutamaterg als Moosfasern an Pyramidenzellendendriten des Stratum lucidum der CA3-Region, welches nur dort vorkommt. Von hier aus verlaufen Axone als sog. Schaffer-Kollaterale zu Pyramidenzellen der CA1-Region. Efferenzen ziehen über die Fornix zu Kortex, Septumkernen, Hypothalamus, Amygdala und den Corpora mamillaria. Ein Großteil verläuft direkt in das Subiculum (Amaral und Witter, 1989; Amaral et al., 2007). Diese Art der Verschaltung wird als unidirektionaler (gerichteter) trisynaptischer Schaltkreis bezeichnet. Der Hippokampus als Integrationsorgan vieler Hirnfunktionen beeinflusst über seine Efferenzen viszerale, endokrine und emotionale Prozesse. Er ist wichtig für die Stressverarbeitung sowie für Lernprozesse und Gedächtnisbildung. Letztere werden durch die Langzeitpotenzierung (LTP) ermöglicht, einem Prozess, bei dem hippokampale NMDA-Rezeptoren eine große Bedeutung haben. Dabei bewirken repetitive, hochfrequente Reize Umbauprozesse auf Synapsenebene, wodurch eine Anpassung an den Stimulus erreicht wird. Dies bedingt schließlich die synaptische Plastizität (Malenka und Nicoll, 1999; Nakazawa et al., 2004; Kessels und Malinow, 2009).

1 Einleitung

1.5.2. GABAerge Interneurone des Hippokampus

Über eine direkte Inhibition bzw. indirekte Disinhibition der exzitatorischen Pyramidenzellen können GABAerge Interneurone die hippokampalen Verschaltungen modulieren (Freund und Buzsaki, 1996; Benes und Berretta, 2001). Sie werden aufgrund der Expression von GAD67 (Stone et al., 1999) sowie bereits erwähnter kalziumbindender Proteine immunhistochemisch identifiziert (Andressen et al., 1993). PARV nimmt dabei Einfluss auf die Freisetzung von GABA (Vreugdenhil et al., 2003; Schwaller, 2012). Hippokampale Interneurone empfangen wichtige cholinerge Afferenzen vom diagonalen Band von Broca Komplex (MSDB) des medialen Septums (Frotscher und Léránth, 1985). Sie besitzen dazu nikotinerge und muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren, welche ihre Aktivität regulieren. Defizite in diesem System führen zur Minderung kognitiver Funktionen, welche beispielsweise bei der Schizophrenie von Bedeutung sind (Griguoli und Cherubini, 2012). Zudem können die Acetylcholin-Rezeptoren auf intrinsischen cholinergen Interneuronen aktiviert werden (Frotscher et al., 1986). Diese befinden sich im Gyrus dentatus und haben spezifische Projektionen zu GABAergen Interneuronen (Freund und Buzsaki, 1996), was wiederum regulierend auf die CA3-Region des Hippokampus wirkt (Cobb et al., 1999). Swanson beschrieb dopaminerge Verbindungen des mesolimbischen Systems, die die Substantia nigra pars compacta und VTA mit dem Hippokampus verbinden (Swanson, 1982). Ihm zufolge machen diese Fasern den Hauptanteil des dopaminergen Inputs des Hippokampus aus. Wie auch in Kapitel 1.5.1. beschrieben, ist Dopamin ein wichtiger Transmitter für die LTP-Entstehung im Hippokampus. Dabei scheinen dopaminerge Interneurone der CA1-Region entscheidend zu sein (Lisman und Grace, 2005). Neurone der CA3-Region sind in die schnelle Erfassung von Eindrücken involviert und haben dabei u.a. Verbindungen in die CA1-Region sowie den DG (Wen et al., 2015). Über 5-HT₃-Rezeptoren erhalten GABAerge Interneurone des Gyrus dentatus serotonerge Afferenzen (Halasy et al., 1992). Diese stammen aus den medianen Raphekernen (Kosofsky und Molliver, 1987). Calbindinhaltige GABAerge Interneurone sind die am stärksten serotonerg innervierten und kommen im Stratum radiatum und im Stratum oriens der CA1- und CA3-Region vor (Freund et al., 1990).

1.5.3. Hippokampus und Schizophrenie

Post-mortem-Studien an Hirnen von Patienten mit Schizophrenie zeigten eine reduzierte Dichte an NMDA- (Law und Deakin, 2001; Kerwin et al., 1988; Kornhuber et al., 1989) sowie AMPA-Rezeptoren (Kurumaji et al., 1992; Porter et al., 1997). Zudem wurde eine erhöhte Dichte von 5-HT₁- und eine niedrigere Dichte von 5-HT₂-Rezeptoren im

1 Einleitung

Hippokampus festgestellt (Lopez-Figueroa et al., 2004; Matsumoto et al., 2005), jedoch kamen andere Studien nicht zu diesem Ergebnis (Burnet et al., 1997; Hashimoto et al., 1991). Weiterhin konnte mittels funktioneller Magnetresonanztomographie (fMRI) ein hypermetabolischer Zustand des linken Hippokampus bei Patienten mit Schizophrenie gezeigt werden (Kawasaki et al., 1992). Es wurde eine verminderte Expression synaptischer Proteine wie SNAP-25 nachgewiesen, zudem fand man Veränderungen in der Größe und Anordnung von Pyramidenzellen (Harrison, 1999; Knable et al., 2004). Weitere hirmorphologische Auffälligkeiten wurden bereits in den Kapiteln 1.2.3., 1.2.4. sowie 1.3. (jeweilige Transmitter-Hypothesen) beschrieben.

1.6. Soziale Isolation und Schizophrenie

Die soziale Isolation ist mit einem erhöhten Risiko für Depressivität und Suizidalität bei Patienten mit Schizophrenie assoziiert (Pješčić et al., 2014). Unter der sozialen Isolation eines Versuchstieres versteht man die Trennung von der Mutter, nachdem es von dieser postnatal eine bestimmte Zeit lang gesäugt wurde. Das in Isolation gehaltene Tier wird daraufhin in einen Einzelkäfig verbracht. Ein Grund für eine solche Isolation im Versuch ist die dadurch mögliche Auslösung des sog. „Second hit“ im Rahmen der „Two-hit-Hypothese“ (siehe Kap. 1.2.3.), um schizophreientypische Verhaltensweisen untersuchen zu können (Bayer et al., 1999). Es ist bekannt, dass soziale Isolation für eine Reihe von Verhaltensänderungen bei neuropsychiatrischen Erkrankungen verantwortlich ist (Fone und Porkess, 2008). So wurde gezeigt, dass Isolation während einer wichtigen Periode der postnatalen Entwicklung bei Ratten Hyperaktivität im Offenfeld, schizophreientypische Defizite in der Präpulsinhibition (PPI), erhöhte soziale Interaktion und Aggression sowie erhöhtes Angstverhalten auslöst (Samsom und Wong, 2015). Zudem wurde beschrieben, dass hirmorphologische Veränderungen ebenfalls isolationsbedingt auftreten können. So wiesen beispielsweise Fone und Porkess bei Nagern eine erhöhte dopaminerge Aktivität im Nucleus accumbens und im ventralen Striatum nach, fanden jedoch eine reduzierte Aktivität im PFC (Fone und Porkess, 2008). Außerdem konnten eine veränderte Spine-Dichte und Morphologie im PFC, Striatum und Hippokampus gezeigt werden (Comery et al., 1995 + 1996; Silva-Gómez et al., 2003; Pascual et al., 2006). Diese und andere Erkenntnisse verdeutlichen, dass die soziale Isolation ein gutes Instrument zur Untersuchung schizophreientypischer Verhaltensweisen ist.

1 Einleitung

1.7. Geschlechtsunterschiede

Bei Männern und Frauen wird insgesamt ungefähr gleich häufig eine Schizophrenie diagnostiziert, wobei Männer im Durchschnitt jedoch früher erkranken. Eine mögliche Erklärung dafür liefert die Tatsache, dass junge Frauen einen physiologisch höheren Estradiolspiegel haben, was der Entwicklung einer Schizophrenie vorbeugen könnte (Seeman, 1983; Seeman und Lang, 1990). Diese These stützt zudem, dass es einen Inzidenz-Peak bei Frauen im Alter über 45 Jahren gibt, bei denen die Menopause beginnt und somit der Estradiolspiegel wieder fällt (Riecher-Rössler et al., 1997). Hirnmorphologische Studien konnten zeigen, dass an Schizophrenie erkrankte Männer größere Ventrikel und damit eine reduzierte Gesamthirnmasse im Vergleich zu erkrankten Frauen haben. Dies wird besonders in frontalen (PFC) und temporalen Hirnarealen sichtbar (Mendrek und Mancini-Marie, 2015). Insgesamt scheint der Krankheitsverlauf bei Männern schwerwiegender zu sein, was jedoch mit einem durchschnittlich früheren Erkrankungsbeginn erklärt wird (siehe Kap. 1.2.2.).

1.8. Hypothese und Fragestellungen

Da bei unter Schizophrenie leidenden Patienten ebenfalls ein GAD67-Mangel („First hit“) nachgewiesen wurde, schien es plausibel, dass der hier verwendete Inzuchtstamm als Schizophreniemodell dienen könnte. Im Sinne der „Two-hit-Hypothese“ sollte durch Isolation einer Gruppe des Inzuchtstammes der „Second hit“ erfolgen, um somit schizophrenietypische Verhaltensweisen in der sozialen Interaktion, eine veränderte sensorimotorische Filterfunktion sowie Verhalten in auswegloser Situation untersuchen zu können. Im Zuge der hirnmorphologischen Studien wurden zudem Neuronenzahlen in Ursprungsregionen der an der Genese der Schizophrenie beteiligten Neurotransmittersysteme und Faserdichten in deren Zielregionen untersucht, um herauszufinden, welche Auswirkungen das GAD67-Defizit auf diese hat. Zudem sollte der Nachweis erbracht werden, dass cholinerge, dopaminerge und serotonerge Nervenfasern Synapsen auf GAD67-positiven GABAergen Neuronen haben. Die Arbeitshypothese lautet daher:

Ein GAD-67-Defizit bewirkt Veränderungen der sozialen Interaktion, Präpulsinhibition und dem Verhalten in auswegloser Situation, sowie hirnmorphologische Veränderungen in Ursprungs- und Zielregionen verschiedener Transmittersysteme.

1 Einleitung

Im Hinblick auf diese Hypothese galt es, folgende Fragen zu beantworten:

1. Weisen beide Genotypen Unterschiede in der sozialen Interaktion, der motorischen Aktivität oder im angstassoziierten Verhalten auf?
2. Bewirkt ein GAD67-Defizit Veränderungen der Startle-Reaktion bzw. der Präpulsinhibition?
3. Unterscheiden sich beide Genotypen im Verhalten in auswegloser Situation?
4. Wird das Verhalten durch das Geschlecht bzw. die Isolationshaltung beeinflusst?
5. Sind Unterschiede in der Anzahl cholinergischer Neurone im Septum nachweisbar?
6. Gibt es zwischen den Genotypen Unterschiede in der Anzahl dopaminergischer Neurone in deren Kerngebieten in Substantia nigra und VTA?
7. Lassen sich Unterschiede in der Anzahl serotonergischer Neurone in den Raphekernen erkennen?
8. Unterscheiden sich beide Genotypen in der cholinergen, dopaminergen und serotonergen Innervation des Hippokampus und der Amygdala?
9. Wie können die Ergebnisse in den Kontext der aktuellen Schizophrenieforschung gesetzt werden?

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

2.1.1. Allgemeine Übersicht

Anhand von Tiermodellen und mittels vorher aufgestellter, spezifischer Hypothesen ist es möglich, pathophysiologische Mechanismen zu analysieren. So kann eine gezielte Aktivierung oder Deaktivierung bestimmte neurologische Funktionen modulieren und somit zu Verhaltensänderungen des Versuchstieres führen. Durch diese kann man wiederum Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen neuropathologischen Veränderungen und Verhaltensauffälligkeiten ziehen. Zur Untersuchung der Schizophrenie würde jedoch ein einzelnes Tiermodell nicht ausreichen, da es nur den jeweiligen Aspekt beleuchtet, nicht aber die komplette Pathophysiologie dieser in ihrer Ausprägung sehr heterogenen Erkrankung. Des Weiteren sind Tiermodelle nicht ohne Einschränkungen auf den Menschen übertragbar. Viele Übereinstimmungen lassen sich aber dennoch durch valide Tierexperimente darstellen (Light und Braff, 1999; Geyer und Moghaddam, 2002; Koch, 2013). Man macht sich dabei das Konzept der Endophänotypen zunutze, welches sich auf einfache physiologische Merkmale stützt. Diese können im Gegensatz zum klinischen Symptom leichter im Versuchstier dargestellt werden, da sie näher an der biologischen Ursache der jeweiligen Störung liegen. Dabei werden Parameter bevorzugt, die einfach zu erheben und bei der Schizophrenie verändert sind. So sind Störungen der sensorimotorischen Filterfunktion oder der Motorik Beispiele für Endophänotypen (Gottesman und Gould, 2003).

2.1.2. Die Maus als Versuchstier

Charakteristisch für Inzuchtstämme sind die genetische Homogenität der einzelnen Individuen und deren Folgegenerationen. Als Versuchstier ist besonders die Maus geeignet, welche in einer Fülle unterschiedlicher Stämme mit verschiedenen Eigenschaften zur Verfügung steht (Staats, 1980). Da die Tiere genetisch identisch sind (Inzuchtstämme), erweisen sich die mit ihnen durchgeführten Experimente als reproduzierbar, denn Verhaltensunterschiede sind vor allem durch äußere Einflüsse bedingt. Somit sind sie gut geeignete Versuchsobjekte standardisierter Tierversuche. Weitere Vorteile der Verwendung der Maus sind die einfache Haltung, die schnelle Reproduktion sowie die hohe Aktivität der Tiere, was sie zur Erforschung von Verhalten prädestiniert. Zudem wurde durch langjährige morphologische Studien eine genaue Kartierung des Mäusegehirns erstellt, was weitere derartige Untersuchungen, auch im Vergleich zu anderen Stämmen, ermöglicht.

2 Material und Methoden

2.1.3. Die GAD67-GFP(Δ neo)-Maus

Bei der Schaffung der GAD67-GFP(Δ neo)-Maus wurde in den Genlocus der Glutamat-Decarboxylase 67 (GAD67) eine Kasette für das Green Fluorescence Protein (GFP) mittels Knock-in integriert. Dabei wurde GFP-codierende cDNA über homologe Rekombination in das entsprechende Gen embryonaler Stammzellen eingebracht (Tamamaki et al., 2003). Dieser Schritt fand im Acht-Zell-Stadium statt, wodurch eine chimäre Maus generiert werden konnte. Die daraus resultierende männliche Maus wurde anschließend mit C57BL/6- oder ICR-Weibchen verpaart. Die heterozygoten Nachkommen wurden mit C57BL/6-Mäusen zur GAD67-GFP rückgekreuzt. Für die Versuche wurden ausschließlich heterozygote Tiere verwendet, da homozygote GAD67-GFP-Mäuse nicht lebensfähig sind (Tamamaki et al., 2003). Die Expression des GFP-Proteins in GABAergen Neuronen bewirkt eine Immunfluoreszenz und ermöglicht damit die Markierung dieser Neurone. Da der GFP-Knock-in im GAD67-Gen (GAD1) erfolgte, wird die Expression des GFP über den GAD67-Promotor reguliert. Bei den heterozygoten Tieren führt der Knock-in lediglich in einem Allel zur funktionellen Zerstörung, aus welcher eine verminderte GAD67-Expressionsrate resultiert. Bei der adulten GAD67-GFP-Maus wurde somit ein auf etwa 64% reduziertes GAD67-Protein-Level beobachtet, woraus sich eine verminderte GABA-Expression ergibt. Diese ist zudem altersabhängig (Wang et al., 2009; Tamamaki et al., 2003). So ist die GABA-Synthese bei neugeborenen GAD67-GFP-Mäusen geringer als bei sieben Wochen alten Tieren. Während der Entwicklung der GAD67-GFP-Maus kommt es weiterhin zu einer Störung in der Ausbildung synaptischer Verbindungen (Nakayama et al., 2007). Ebenfalls wurde festgestellt, dass GAD67-GFP-Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit für maternalen Stress zeigen. Dieser ist ebenfalls als „Second hit“ zu verstehen und zählt zu den Risikofaktoren der Schizophrenie (Uchida et al., 2011). Außerdem zeigten Studien einen um zwei Stunden verschobenen Tag-Nacht-Rhythmus (Sandhu et al., 2014), was auch für die Schizophrenie beschrieben wird (Pritchett et al., 2012). Die GAD67-GFP-Maus kann somit einen wichtigen Beitrag in der Erforschung der Pathophysiologie der Schizophrenie leisten.

2.1.4. Ethische Grundlagen

Alle Tierversuche entsprechen der Europäischen Richtlinie für Tierversuche von 2010 (EU Directive 2010/63/EU). Sie wurden nach dem deutschen Tierschutzgesetz an der Universität Magdeburg durchgeführt und vom Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Halle, Referat 203 (AZ: 42502-2-1134 Uni MD) genehmigt.

2 Material und Methoden

2.1.5. Versuchstiere

Für die Verhaltensversuche wurden männliche und weibliche GAD67-GFP-Mäuse (GFP; ♂, n=36; ♀, n=32) im Alter von 13-18 Wochen, sowie männliche und weibliche Wurfgeschwister (WT; ♂, n=36; ♀, n=24) im Alter von 13-18 Wochen verwendet. Zudem wurden die Tiere in isolierte und nicht-isolierte unterteilt. Dabei wurden die in Isolation gehaltenen Tiere am 21. postnatalen Tag von ihren Müttern abgesetzt und in Einzelhaltung verbracht. Für die morphologischen Studien wurden ausschließlich männliche GAD67-GFP-Mäuse (n=6) und Kontrolltiere (WT, n=8) im Alter von 13-18 Wochen verwendet. Die Tiere stammten aus der Zucht des Institutes für Biologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Prof. O. Stork.

2.1.6. Tierhaltung

Die Tiere wurden in Makrolon-Käfigen Typ II (26,5cm (L) x 20cm (B) x 14cm (H)) mit Standard-Einstreu bei 22-25°C Umgebungstemperatur gehalten. Nach dem Absetzen von den Muttertieren am 21. Lebenstag (P21) wurden die Tiere einzeln (soziale Isolation) oder in Gruppen von zwei bis drei Tieren gehalten. Es wurden Standard-Pelletdiät und Wasser ad libitum geboten. Die Raumbeleuchtung folgte einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Rhythmus mit Beleuchtungsbeginn um 06:00 Uhr und einer zweistündigen Dämmerungsphase jeweils zu Beginn der Licht- bzw. Dunkelphase. Die Tiere wurden vor jedem Versuch gewogen. Alle Verhaltensversuche erfolgten in der Aktivitätsphase (Dunkelphase). Zur Unterscheidung der Tiere dienten Ohrlochmarkierungen.

2.2. Verhaltensversuche

2.2.1. Soziale Interaktion im Offenfeld

Häufige Erscheinungen im Rahmen einer Schizophrenie sind eine von der Norm abweichende lokomotorische Aktivität, sowie ein verändertes Sozial- und angstassoziiertes Verhalten (Mohn et al., 1999). Sie beinhalten bestimmte Aspekte der Positiv- und Negativsymptomatik und können zudem in Tiermodellen der Schizophrenie abgebildet werden (Ellenbroek und Cools, 2000). Mit dem Versuch zur sozialen Interaktion im Offenfeld lassen sich genau diese Verhaltensauffälligkeiten evaluieren. Es wird dabei das Sozialverhalten von zwei einander unbekanntem Mäusen gleichen Geschlechts und gleichen Genotyps in einer neuen Umgebung untersucht (File und Hyde, 1978). Der Versuch wurde ursprünglich als ein Modell zur Analyse von Angst entwickelt (File und Seth, 2003). Mäuse bevorzugen einen abgedunkelten, kleinen und möglichst geschlossenen Raum, wohingegen ein heller, großer und offener Raum vermieden wird. Für den Versuch bedeutet dies, dass ein Aufenthalt im

2 Material und Methoden

Randbereich normalerweise präferiert wird. Der natürliche Drang der Tiere führt aber ebenfalls dazu, die neue Umgebung möglichst vollständig zu erkunden, weshalb sie in einen Motivationskonflikt von Furcht und Neugier geraten, welcher das Sozialverhalten beeinflusst (Crawley, 1999; Mällo et al., 2006). Hinzu kommt die natürliche Angst vor einem unbekanntem, neuen Versuchspartner. Generell führt eine neue, hell erleuchtete Umgebung bei Nagern zu verminderter motorischer Aktivität. Eine abgedunkelte Umgebung hingegen fördert Motorik und exploratives Verhalten (Hooks und Kalivas, 1995). Weiterhin ist für eine aktive soziale Interaktion die Motivation zum Kontakt nötig, bei einer passiven sozialen Interaktion sitzen oder liegen die Tiere lediglich nebeneinander (Sams-Dodd, 1999). Als Parameter werden nur Veränderungen des natürlichen Verhaltens einbezogen, wobei die Versuchstiere von äußeren Einflüssen abgeschirmt sind (File und Hyde, 1978; Sams-Dodd, 1999). Im Zuge der Versuche wurden soziale Interaktionen unter anderem in Form von Schnüffeln und Folgen des Partners, sowie aggressive Verhaltensweisen wie Beißen protokolliert. Zudem lassen sich die motorische Aktivität (Ermittlung der Laufstrecke) sowie das Angstverhalten (Aufenthalt am Rand oder im Zentrum) analysieren. Dabei beeinflussen sich beide Versuchstiere stets gegenseitig, weswegen sie als eine Einheit angesehen werden und damit einen gemeinsamen Messwert generieren (File und Seth, 2003). Es ist bekannt, dass die Lokomotion der Prozessierung von Motivation, Emotion sowie kognitiver Planung unterliegt (Mogenson et al., 1980; Haber, 2003). Studien zeigten, dass emotionale, kognitive und motorische Informationen, die für eine adäquate soziale Interaktion nötig sind, entlang kortiko-striatal-thalamisch-kortikaler Schleifen prozessiert werden (Haber und Fudge, 1997; Joel und Weiner, 2000). Während der Nucleus accumbens dabei limbische und motorische Wege integriert, ist das dorsale Striatum für die Bewegungsinitiierung zuständig. Der präfrontale Kortex, der Hippokampus und die Amygdala projizieren glutamaterg in den Nucleus accumbens und sind somit in die Integration eingebunden. Zusätzlich findet eine Beeinflussung durch dopaminerge Projektionen der VTA und der SN statt (Everitt et al., 1991). Auch serotonerge Neurone haben Efferenzen in den Nucleus accumbens (Azmitia und Whitaker-Azmitia, 1995). Aus dem ventrolateralen Septum verlaufen ebenfalls Fasern in dorsale Anteile des Nucleus accumbens (Risold und Swanson, 1997). Durch diese komplizierten Verschaltungen der einzelnen Areale kann ein Ungleichgewicht, z.B. bedingt durch ein GABAerges Defizit, das Sozialverhalten und die Motorik der Versuchstiere beeinflussen (Guillin et al., 2007).

2 Material und Methoden

2.2.1.1. Apparatur der sozialen Interaktion im Offenfeld

Die Versuche wurden in einer 85cm (L) x 85cm (B) x 30cm (H) großen, hellgrauen und oben offenen PVC-Box (siehe Abb. 1 A) durchgeführt. Eine indirekte schattenfreie Ausleuchtung (300 Lux) erfolgte mittels Neonröhren. Über der Versuchsbox befand sich eine fest installierte, auf die Versuchsregion kalibrierte Kamera (Panasonic CCTV Camera, Mod. WV-BL200/6), welche das Bild in einen separaten Beobachtungsraum auf den dortigen PC übertrug. Das Bildmaterial wurde sowohl am Bildschirm beobachtet, als auch mittels Videorekorder aufgezeichnet. Mit der Auswertungssoftware Videomot 2 (Vers. 5.40, TSE, Bad Homburg) wurde die Versuchsregion (85cm x 85cm Gesamtversuchsfläche) in Informationsregionen (vier Eckregionen von 21,25cm x 21,25 cm, vier Randregionen von 21,25cm x 42,5cm und eine Zentrumsregion von 42,5cm x 42,5cm) eingeteilt (siehe Abb. 1 B). Zudem wurde eine weitere Unterteilung in 100 Steuerregionen von 8,5cm x 8,5cm vorgenommen, die zur automatischen Protokollierung der Tierbewegungen in den Versuchsregionen diente.

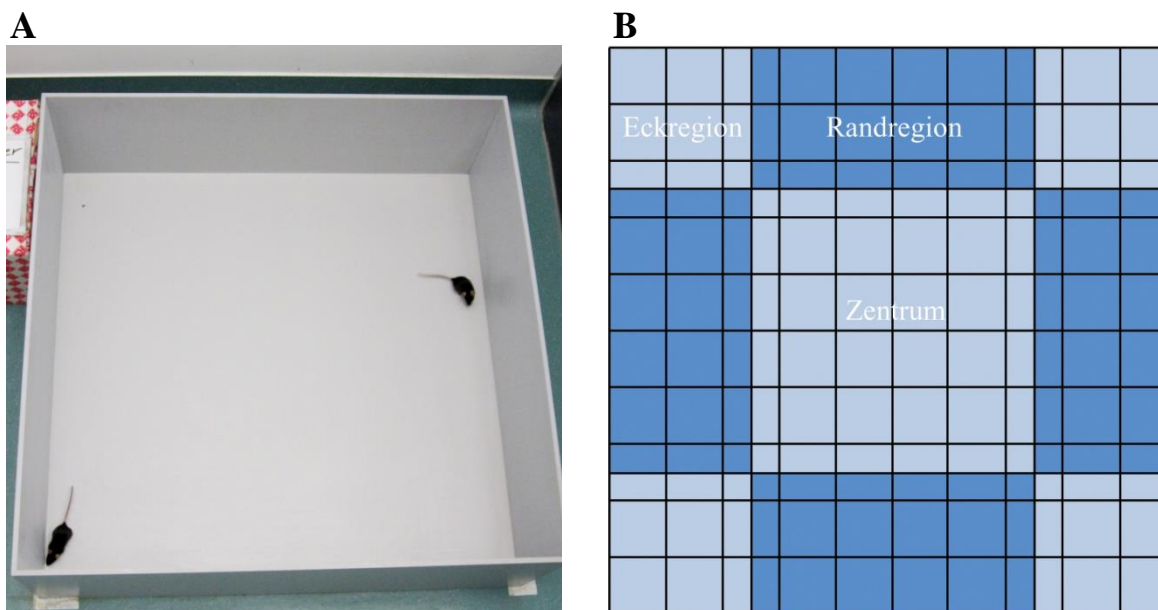


Abb. 1: Versuchsaufbau der sozialen Interaktion im Offenfeld

A: Das Offenfeld während des Versuches mit einem Mäusepaar. B: Grafik des Offenfeldes mit schematischer Einteilung der Regionen. Die vier Eck- und vier Randregionen ergeben zusammen den Randbereich.

2.2.1.2. Durchführung der sozialen Interaktion

Für die Versuche wurden jeweils zwei einander unbekannte Tiere gleichen Geschlechts, gleichen Genotyps und ähnlichen Gewichts (Versuchspaar) in gegenüberliegende Ecken der Offenfeld-Box gesetzt. Die zehnminütige Beobachtung fand dabei computerisiert, videografisch und teilautomatisiert statt. Mittels der definierten räumlichen Koordinaten und der

2 Material und Methoden

festen Versuchszeit wurden mehrere Parameter eines Versuchspaares durch die Software automatisch analysiert. Die Versuche wurden anschließend ebenfalls anhand der Videobänder manuell und verblindet ausgewertet (siehe Tab. 1).

Automatisch erhobene Parameter:	Manuell erhobene Parameter:
1. Laufstrecke [m]	1. Schnüffeln [n]
2. mittlerer Abstand zwischen den Tieren [cm]	2. anogenitales Schnüffeln [n]
3. Kontaktanzahl [n]	3. Folgen [n]
4. Kontaktdauer [sec]	4. aggressives Verhalten [n]
5. aktive soziale Interaktion; Gesamtzeit in [%]	5. Faecesboli [n]
6. passive soziale Interaktion; Gesamtzeit in [%]	6. Kontakte [n]
7. Rand-/Zentrumsaufenthalt; Gesamtzeit in [%]	7. Aufstellen in der Mitte (Rearing) [n]
	8. Aufstellen am Rand der Box (Leaning) [n]
	9. Putzen [n]

Tab. 1: Parameter der sozialen Interaktion

Die Tabelle zeigt in der linken Spalte die automatisch und in der rechten Spalte die manuell erhobenen Parameter der sozialen Interaktion.

Eine aktive bzw. passive soziale Interaktion wurde dabei so definiert, dass sich die Tiere in einem bestimmten Abstand oberhalb (3cm/s, aktive SI) bzw. unterhalb (1cm/s, passive SI) eines Geschwindigkeitsschwellenwertes zueinander bewegten (Sams-Dodd et al., 1997). Nach 10min erfolgte das automatische Versuchsende. Die Box wurde nach Entnahme der Tiere mit 70%igem Ethanol gereinigt. Da sich die mit dem Programm Videomot2 erhebbaren Parameter bereits in vorherigen Versuchen als nicht ausreichend erwiesen, wurden einzelne Rohdaten im ASCII-Format mit einem separaten Programm erneut ausgewertet. Hierzu wurden Elemente der Fuzzy-Logik verwendet, um Schwächen bei der Bilderkennung durch die Videomot2-Software auszugleichen. Eine Evaluation der Software fand bereits zuvor an Ratten und Mäusen statt (Wolf, 2004).

2.2.2. Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion

Unerwartet starke sensorische (taktile, visuelle oder akustische) Reize lösen als Reaktion den sog. Startle-Reflex (Schreckreflex) aus, eine bei Säugetieren ubiquitär vorkommende phylogenetisch alte motorische Antwort (Braff et al., 2001). Diese besteht aus einem schnell habituierten Zusammenschrecken, dem sog. „Freezing“. Hierbei kommt es zur Muskelkontraktion im Schulter-Nacken-Bereich, zu einem Lidschluss und zur abrupten Unterbrechung der momentan ablaufenden Tätigkeit (Kohl et al., 2013). Damit einhergehend sind Veränderungen des Vegetativums wie ein Anstieg der Herzfrequenz und ein erhöhter Blutdruck (Koch, 1999; Meincke et al., 2001). Die akustische Startle-Reaktion (ASR) wird

2 Material und Methoden

beim Menschen elektromyographisch am Lidschlussreflex gemessen. Im Mausversuch hingegen ist dazu eine spezielle Startle-Box nötig, welche die motorische Ganzkörperreaktion aufzeichnet. Bei der sogenannten Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion (PPI) führt ein kaum wahrnehmbarer akustischer Stimulus (Präpuls, engl. prepulse), welcher dem eigentlichen, starken akustischen Schreckreiz (>80dB SPL, sog. pulse) ungefähr 30-500ms vorausgeht, zu einer deutlichen Abschwächung der ASR (Koch, 1999; Braff et al., 2001; siehe Abb. 2). Die PPI stellt dabei eine protektive Filterfunktion für das Gehirn dar, wobei inhibitorische Mechanismen die unbewusste Wahrnehmung und Verarbeitung des schwächeren Präpulses vor Einflüssen durch den stärkeren Schreckreiz schützen (Braff et al., 2001; Meincke et al., 2004). Die Verarbeitung des eigentlichen Schreckreizes wird behindert, um so die Analyse des Präpulses störungsfrei zu ermöglichen. Der Präpuls darf dabei jedoch nur so stark sein, dass er selbst keine Startle-Reaktion auslöst (Braff et al., 2001). Eine verminderte PPI konnte bei Patienten mit Schizophrenie festgestellt werden (Koch, 1999; Kohl et al., 2013), was einen Defekt im Gating-Mechanismus wahrscheinlich macht (Ludewig et al., 2003). Eine gestörte sensorimotorische Filterfunktion gilt daher als spezifischer Marker der Schizophrenie. Eine Grafik der neuronalen Verschaltungen von ASR und PPI ist dem Anhang zu entnehmen (siehe Abb. 31).

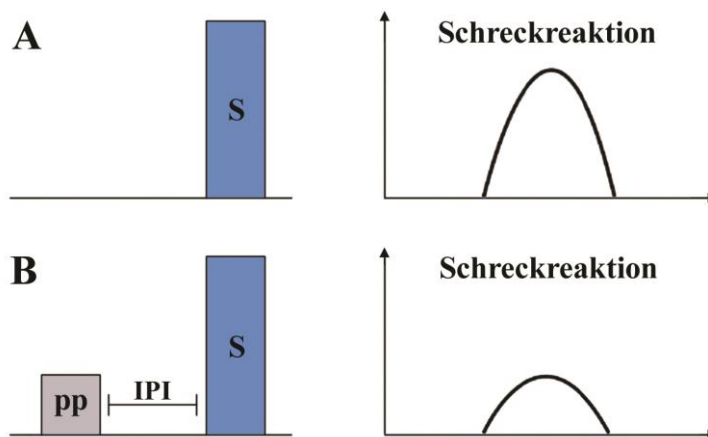


Abb. 2: Die Abschwächung der Schreckreaktion durch den Präpuls

A: Ein Schreckreiz (S) löst eine Schreckreaktion aus. B: Ein vor dem Schreckreiz (S) präsentierter schwacher Reiz (pp) reduziert die Schreckreaktion. Zudem ist das Interpulsintervall (IPI) dargestellt.

2.2.2.1. Die Startle-Apparatur

Die Startle-Apparatur (Campden Instruments Ltd., UK; Piezo-Amp-System, Universität Tübingen) diente der Messung der ASR und PPI. Dazu wurden zwei baulich identische Messplätze mit beleuchteten (5W, Neonbeleuchtung), belüfteten und schallgedämpften Boxen (50cm (B) x 45cm (H) x 40cm (T)) verwendet (siehe Abb. 3). Piezoelektrische Kraftsensoren (PiezoAmp Signal Amplifier, Universität Tübingen) zeichneten die Bewegungen der sich in 5cm (B) x 5,5cm (H) x 8cm (T) großen Gitterkäfigen befindlichen Tiere auf. Die Berechnung der akustischen Signale wurde am PC durch die Signal-

2 Material und Methoden

Synthesizer-Software SigGen PC 1.44 (Waldmann, Tübingen) realisiert. Mit dem PC verbunden waren zudem ein Stimulus Generator (ASPI, ELF-31, Medav, Nürnberg) und ein Verstärker (WPA-600, Sony, Tokyo, Japan). Die akustischen Stimuli wurden über einen in der Box integrierten, 21cm vom Gitterkäfig entfernten, Lautsprecher präsentiert. Tierbewegungen während der Versuche erzeugten Spannungsänderungen im Piezoelement, welche proportional zur aufgenommenen Kraft waren. Ein Datenaufnahmeprozessor (DAP 1200a, Microstar Laboratories Inc, Bellvue, WA, USA) digitalisierte die so gemessene Spannung mit der Software DAP View Plus Vers. 1.20 (Microstar Laboratories Inc, Bellvue, WA, USA) am PC. Da das Gewicht der Tiere jeweils vor Versuchsbeginn ermittelt wurde, konnten die Kraftwerte F (N) in Beschleunigungswerte $a=F/m$ (m/s^2) umgerechnet werden. Diese Beschleunigungswerte ermöglichten die Erfassung der Amplitude der Schreckreaktion unabhängig vom jeweiligen Tiergewicht.

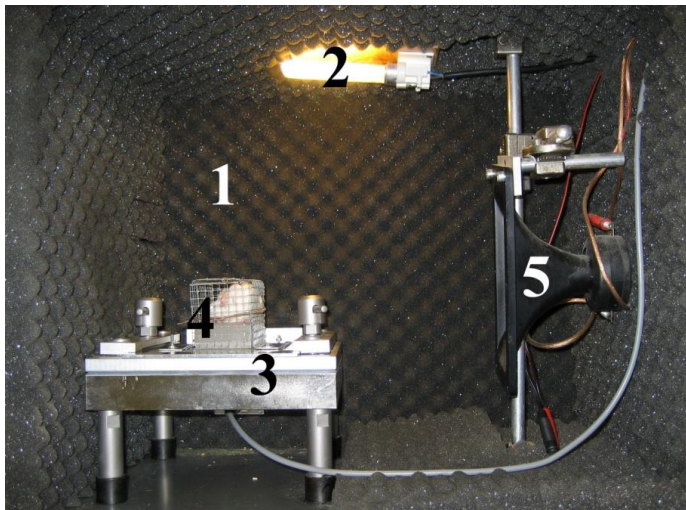


Abb. 3: Aufbau der Startle-Apparatur

- 1: schallgedämpfte Wand
- 2: Lichtquelle
- 3: piezoelektrischer Kraftsensor
- 4: Gitterkäfig
- 5: Lautsprecher

2.2.2.2. Durchführung des Startle-Versuchs

Die Versuche erfolgten jeweils nach einer Habituationsphase von 5min, in der keine Stimuli präsentiert wurden. Erst dann begann die eigentliche Testphase (Session) bei konstantem Hintergrundrauschen von 65dB (white noise) während des gesamten Versuchs. In der Testphase wurden unterschiedliche akustische Stimulustypen geboten, wobei ein Interstimulusintervall (ISI, Zeit zwischen zwei Stimuli) von jeweils 30s und versuchsabhängig ein Interpulsintervall (IPI, Zeit zwischen PREPULSE und PULSE) von 100ms bzw. 400ms festgelegt wurden (siehe Tab. 2).

2 Material und Methoden

Bezeichnung	Stimulustyp
1. NOSTIM	Kein Stimulus, nur Hintergrundrauschen bei 65dB
2. PREPULSE	Präpuls allein, Sinuston, 10kHz, 75dB Sound pressure level (SPL), Dauer 20ms, Anstiegs-/Abstiegsflanke 0,4ms
3. PULSE-ALONE	Startle-Stimulus allein, weißes Rauschen bei 93, 107 oder 113dB SPL, Dauer 20ms, ohne Anstiegs-/Abstiegsflanke
4. PREPULSE+PULSE	Startle-Stimulus bei 93, 107 oder 113dB SPL mit vorausgehendem Präpuls bei 75dB SPL, Interpulsintervall programmabhängig 100ms bzw. 400ms

Tab. 2: Bedeutung der Stimulusbezeichnungen

Jede Session bestand aus insgesamt 85 Einzelmessungen (Trials) und begann mit einer Akklimatisationsphase von zehn NOSTIM-Trials und anschließenden drei PULSE-ALONE-Trials (113dB). Diese 13 Trials wurden nicht in die Berechnungen einbezogen. Im Anschluss erfolgte die Akquisitionsphase bestehend aus 18 Blöcken mit jeweils vier randomisiert präsentierten Einzelmessungen. Somit ergaben sich 72 zu analysierende Einzelmessungen. Die Gitterkäfige wurden nach jedem Durchgang mit 70%igem Ethanol gereinigt und desinfiziert.

2.2.2.3. Berechnung

Aus den 72 Rohwerten wurde je Stimulustyp ein Mittelwert errechnet, sodass sich die PPI aus folgender Formel ergab:

$$\text{PPI (\%)} = \left[\frac{X-Y}{X} \right] * 100$$

Formel 1: Errechnung der Präpulsinhibition (PPI)

X= Mittelwert von PULSE-ALONE, Y= Mittelwert von PREPULSE+PULSE.

Als PPI bezeichnet man dabei den prozentualen Unterschied zwischen der Reaktion auf den gebotenen akustischen Schreckreiz und der Reaktion auf den Schreckreiz mit vorausgehendem Präpuls. Ein hohes Maß an Präpulsinhibition geht dabei mit einer hohen Prozentzahl einher. Andererseits sagt ein negativer Wert aus, dass es zu keiner PPI kam. Dabei ist PREPULSE+PULSE größer als PULSE-ALONE. Der Präpuls allein darf keine Schreckreaktion bewirken.

2 Material und Methoden

2.2.3. Forced Swim Test (FST) nach Porsolt

Einer der am häufigsten genutzten Tests zur Untersuchung neuer Antidepressiva ist der Forced Swim Test, für den Porsolt als Erstbeschreiber gilt (Porsolt et al., 1977). Er wurde als Paradigma zur Analyse depressiven Verhaltens entwickelt und ermöglicht die Messung antidepressiver Effekte von Medikamenten, beispielsweise in Mäusen. Der Test untersucht dabei das Verhalten von Tieren in einer ausweglosen Situation. Diese müssen in einem mit Wasser gefüllten Becherglas schwimmen, um nicht unterzugehen. Dies führt letztlich zum Aufgeben, also zu Immobilität und Treibenlassen der Tiere an der Wasseroberfläche. Sie ertrinken allerdings auch bei Immobilität nicht. Der Test ist leicht durchführ- und gut reproduzierbar.

2.2.3.1. Der Versuchsaufbau

Die Versuche wurden bei Raumbelichtung in einem Becherglas (Volumen: 3l, Durchmesser: 12cm, Höhe: 19cm) durchgeführt, welches mit 23°C warmem Wasser (Füllhöhe: 12cm) befüllt wurde. Zur exakten Temperaturerhaltung diente eine Cold-/ Hotplate (Mod. 35100, Ugo Basile). Die Datenerhebung erfolgte mittels einer selbstprogrammierten Software (Dipl. Ing. C. Kurz).

2.2.3.2. Ablauf des Versuchs

Zu Versuchsbeginn wurde jeweils ein Tier auf den Rand des Becherglases gesetzt und mit dem Gesäß zuerst ins Wasser geschoben. Anschließend wurde die Latenzzeit bis zum Auftreten der ersten Immobilitätsphase gemessen. Die Datenerhebung weiterer manuell erhobener Parameter (siehe Tab. 3) fand zwischen der zweiten und sechsten Minute des Experiments statt.

Manuell erhobene Parameter:

1. Latenz bis zur ersten Immobilitätsphase [sec]	5. immobiles Treiben [sec]
2. Klettern am Glasrand [sec]	6. Klettern am Glasrand [n]
3. aktives Schwimmen [sec]	7. aktives Schwimmen [n]
4. Mobilität (Schwimmen/ Klettern) [sec]	8. Faeces-Boli [n]

Tab. 3: Manuell erhobene Parameter des Forced Swim Test

Nach sechs Minuten (Versuchsende) wurden die Tiere aus dem Becherglas entnommen, abgetrocknet und unter der Infrarotlampe gewärmt. Das Wasser wurde nach jedem Versuch gewechselt und das Becherglas gereinigt.

2 Material und Methoden

2.3. Experimentelles Design der Verhaltensversuche

Die Versuchstiere wurden jeweils zuerst im Offenfeld und im Anschluss daran in der Startle-Apparatur getestet. Daran schloss sich die Perfusion mit anschließender Hirnentnahme und histologischer Aufarbeitung an. Für den Forced Swim Test wurden separate Tiere verwendet.

2.3.1. Soziale Interaktion im Offenfeld

Die Versuche wurden an männlichen und weiblichen, isolierten bzw. nicht-isolierten GFP-Mäusen und WT durchgeführt. Hierzu wurden einander unbekannte Tiere innerhalb der jeweiligen Tierlinie, des gleichen Geschlechts und Isolationsmusters (isoliert/ nicht-isoliert) zu Versuchspaaren aufgeteilt. So wurden 36 männliche Tierpaare (WT isoliert (n=8), WT nicht-isoliert (n=10), GFP isoliert (n=9) und GFP nicht-isoliert (n=9)) und 28 weibliche Tierpaare (WT isoliert (n=6), WT nicht-isoliert (n=6), GFP isoliert (n=6) und GFP nicht-isoliert (n=10)) getestet. Alle Messungen erfolgten mit identischem Aufbau und unter identischen Bedingungen.

2.3.2. Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion

Die Testung von 69 männlichen Tieren (WT isoliert (n=16), WT nicht-isoliert (n=20), GFP isoliert (n=19) und GFP nicht-isoliert (n=14)) und 56 weiblichen Tieren (WT isoliert (n=12), WT nicht-isoliert (n=12), GFP isoliert (n=12) und GFP nicht-isoliert (n=20)) fand einzeln und randomisiert in den Startle-Boxen statt. Alle Messungen erfolgten mit identischem Aufbau und identischen Methoden. Zwischen beiden Verhaltensexperimenten lag jeweils mindestens eine Stunde, in der sich die Tiere in ihren Käfigen befanden.

2.3.3. Forced Swim Test (FST) nach Porsolt

Der FST wurde nur an männlichen Tieren (n=59) durchgeführt. Davon waren 33 GFP-Tiere (isoliert (n=20) und nicht-isoliert (n=13)) und 26 WT (isoliert (n=15) und nicht-isoliert (n=11)). Alle Messungen erfolgten mit identischem Aufbau und unter identischen Bedingungen.

2.4. Histologie

2.4.1. Perfusion und Fixation

Zunächst wurden die Tiere durch intraperitoneale Pentobarbital-Injektion (180mg/kg KG, Narcoren 6%, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) tief narkotisiert, bis keine Reaktion auf Schmerzreize mehr nachweisbar war. Nach Freipräparation des Herzens

2 Material und Methoden

erfolgte die transkardiale Perfusion von 50ml NaCl zum Herauswaschen des Blutes aus dem Gefäßsystem und anschließend mit 50ml Immunfixans (15% gesättigte Pikrinsäure und 4% Paraformaldehyd in 0,2mol Phosphatpuffer (PBS), pH 7,4) für 8min. Nach Dekapitation der Tiere erfolgte die sofortige Hirnentnahme. Das so gewonnene Gewebe wurde für vier Stunden in Immunfixans nachfixiert und anschließend für weitere 24 Stunden in 20%iger Saccharoselösung in 0,1mol PBS inkubiert. Es folgte die Kryokonservierung bei -40°C durch 2-Methylbutan, woraufhin die Hirne bei -80°C gelagert wurden.

2.4.2. Histologische Aufarbeitung

Die Hirne wurden bei -20°C mit einem Gefrier-Mikrotom (Leica CM 3050 S, Firma Leica, Nussloch, Deutschland) von Bregma 1.10mm bis Bregma -5.02mm (nach Paxinos und Franklin, 2004) koronar mit einer Dicke von 40µm geschnitten. Dabei wurden die Hirne von GFP-Mäusen und WT in jeweils vier korrespondierende Serien geteilt. Diese wurden anschließend allesamt wie folgt gefärbt: 1. Nissl-Färbung; 2. Cholin-Acetyl-Transferase (ChAT)-Färbung; 3. Tyrosin-Hydroxylase (TH)-Färbung; 4. 5-Hydroxytryptamin (5-HT)-Färbung. Die Nissl-Färbung diente zur genaueren Abgrenzung der auszuwertenden Hirnregionen.

2.4.3. Immunfluoreszenzfärbungen

Die Immunfluoreszenzfärbung der Hirnschnitte gegen ChAT, TH und 5-HT erfolgte in „Free-floating“-Technik. Die genauen Protokolle zu den Färbungen finden sich im Anhang (siehe Kap. 6.5.1.). Für den Nachweis von cholinergen, dopaminergen und serotonergen Synapsen auf GAD67-positiven GABAergen Neuronen wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit den gleichen Antikörpern und nach gleichem Färbeprotokoll durchgeführt.

2.5. Zellzählung und Flächenbestimmung

2.5.1. Technik

Die Auswertung erfolgte verblindet an codierten Objektträgern. Sämtliche Angaben beziehen sich dabei auf den Hirn-Atlas „The Mouse Brain – Compact Second Edition“ von George Paxinos und Keith B. J. Franklin (Paxinos und Franklin, 2004). Die auszuwertenden Kern- und Fasergebiete wurden zunächst mikroskopisch digital fotografiert (Zeiss AxioImager.Z2 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen), Rodamine-Filter (20HE Rodamine, 540-552nm), Kamera AxioCam MRm Rev. 3.1 (Carl Zeiss Mikroskopie, Jena)), um im Anschluss am Computer manuell ausgezählt zu werden. Für die Zählung der immunoreaktiven Neurone wurden Bilder in 400facher Vergrößerung

2 Material und Methoden

erzeugt und später am Computer mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) wieder zusammengesetzt. Mit dem Programm ImageJ 1.47 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) wurden die Neurone zur Zählung manuell markiert, um Doppelzählungen zu vermeiden. Die skalierten Flächenbestimmungen erfolgten ebenfalls am Computer an Fotos in 50facher Vergrößerung. Hierfür wurde das Programm Axiovision 4.6.1.0. LE® (Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH) genutzt. Die Bilder zur Bestimmung der Faserdichte wurden ebenfalls in 400facher Vergrößerung bei einer Belichtungszeit von 250ms erstellt.

2.5.2. Septum

Für die Auswertung der gegen ChAT gefärbten Schnitte wurde die septale Region in das mediale (MS) und das laterale Septum (LS) unterteilt (siehe Abb. 4). So wurden zum MS ebenfalls Neurone des horizontalen (HDB) und vertikalen (VDB) diagonalen Bandes sowie der lambdoidalen septalen Zone (Ld) gezählt. Das LS beinhaltete die Kerngebiete von dorsalem Anteil des lateralen Septums (LSD), intermediärem Anteil des lateralen Septums (LSI) und ventralem Anteil des lateralen Septums (LSV). Es wurden nur eindeutig definierbare Neurone gezählt, in denen ein Zellkern sichtbar war. Die Auswertung begann bei Bregma 1.10mm und endete bei Bregma 0.26mm. Zudem wurden Neurone des Nucleus basalis magnocellularis von Bregma -0.34mm bis Bregma -1,34mm erfasst. Bei vier Serien wurde somit jeder vierte Schnitt von rostral nach kaudal ausgezählt. Eine Hemisphären-trennung fand nicht statt. Digitale Bildaufnahmen in 50facher Vergrößerung ermöglichten skalierte Flächenbestimmungen mit dem Messtool des Programms Axiovision 4.6, indem die Regionen manuell mit dem Cursor umfahren wurden. Aus der Skalierung ergab sich die Fläche in μm^2 , wodurch die Berechnung von Volumen und Zelldichte bei bekannter Schnittdicke ($40\mu\text{m}$) und analysierter Zellzahl realisiert werden konnte.

2.5.3. Substantia nigra und Area tegmentalis ventralis

Um die gegen TH gefärbten Neurone in den dopaminergen Kerngebieten von SN und VTA auszuzählen, wurde die SN in folgende Unterregionen eingeteilt: SNC, SNR und SNL (siehe Abb. 5). Die Auswertung erfolgte ebenfalls von rostral nach kaudal, wobei mit dem Schnitt begonnen wurde, auf dem die ersten Neurone in der SNR angefärbt waren (Bregma -2.46mm). Kaudal wurde geendet, sobald der Nervus oculomotorius angeschnitten wurde (Bregma -3.52mm). Auch hier wurden nur eindeutig definierbare Neurone gezählt, in denen ein Zellkern sichtbar war. Es wurden lediglich Kerngebiete der rechten Hemisphäre ausgewertet. Die Flächenbestimmung erfolgte auf die gleiche Weise wie im Septum.

2 Material und Methoden

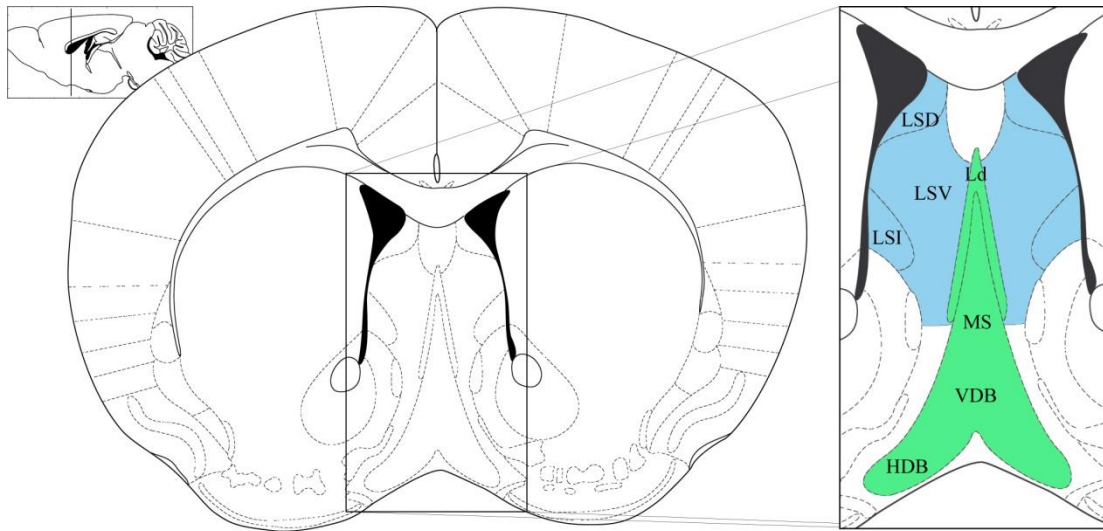


Abb. 4: Lage der analysierten Regionen im Septum

Abkürzungen: MS, mediales Septum; VDB, vertikales diagonales Band; HDB, horizontales diagonales Band; Ld, lambdoidale septale Zone; LSD, dorsaler Anteil des lateralen Septums; LSI, intermediärer Anteil des lateralen Septums; LSV, ventraler Anteil des lateralen Septums (nach Paxinos und Franklin, 2004; Bregma: 0,86).

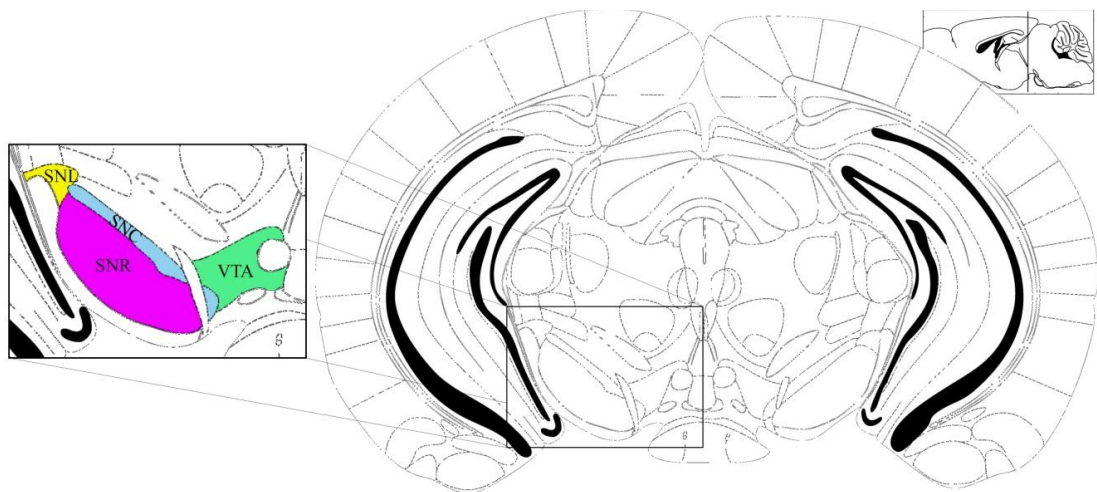


Abb. 5: Lage der Substantia nigra und Area tegmentalis ventralis

Abkürzungen: VTA, Area tegmentalis ventralis; SNC, Substantia nigra pars compacta; SNR, Substantia nigra pars reticularis; SNL, Substantia nigra pars lateralis (nach Paxinos und Franklin, 2004; Bregma: -3,16).

2.5.4. Raphekerne

Die serotonergen Neurone der Nuclei raphe wurden auf gegen 5-HT gefärbten Schnitten ausgewertet. Dabei wurde folgende Unterteilung dieser Kerngebiete vorgenommen: DR, MnR und PMnR (siehe Abb. 6). Es wurden nur angefärbte Neurone mit eindeutiger Zellform und sichtbarem Zellkern gezählt. Eine Hemisphärentrennung fand nicht statt. Die Schnitte wurden von rostral nach kaudal ausgewertet, wobei mit dem Schnitt begonnen wurde, auf dem die ersten gefärbten Neurone des DR ausgemacht werden konnten (Bregma -4.04mm).

2 Material und Methoden

Geendet wurde mit dem Schnitt, auf dem die letzten Neurone des MnR und PMnR verschwanden und der pontine Nucleus raphe (PnR) sichtbar wurde (Bregma -5.02mm). Die Flächenbestimmung und weitere Auswertung erfolgten wie bei den zuvor beschriebenen Kerngebieten.

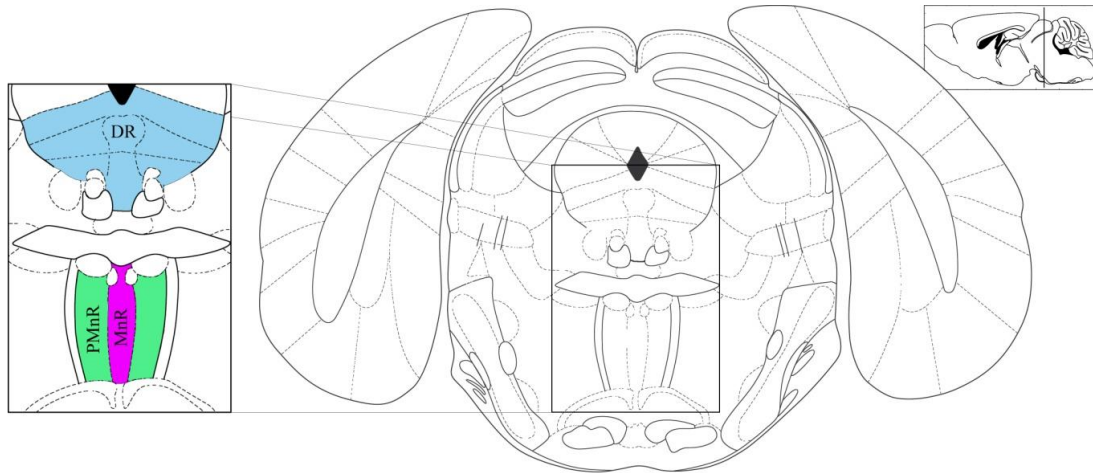


Abb. 6: Lage ausgewerteter Raphekerngebiete

Abkürzungen: DR, dorsaler Nucleus raphe; MnR, medianer Nucleus raphe, PMnR, paramedianer Nucleus raphe (nach Paxinos und Franklin, 2004; Bregma: -4,48).

2.5.5. Abercrombie-Korrekturmodell

Da es beim Schneiden der Hirne an den Schnittgrenzen zur Teilung von Neuronen kommt, können diese, je nach Größe, auf zwei oder mehrere angrenzende Schnitte verteilt sein. Dies führt zum sog. „Overcounting“, der Zählung von falsch hohen Zellzahlen. Zur Vermeidung wurde die gezählte Zellzahl nach folgender Formel (Abercrombie, 1946) korrigiert:

$$n_{\text{korrigiert}} = n_{\text{gezählt}} * \frac{\text{Schnittdicke}}{\text{Schnittdicke} + d_{\text{Zelle}}} = n_{\text{gezählt}} * \frac{b_{\text{Sn}}}{b_{\text{Sn}} + d_{\text{Zelle}}}$$

Formel 2: Korrekturformel nach Abercrombie

$n_{\text{korrigiert}}$, korrigierte Gesamtzellzahl einer Region; $n_{\text{gezählt}}$, unkorrigierte gezählte Gesamtzellzahl; d_{Zelle} , mittlerer Zelldurchmesser der gezählten Zellen in μm ; b_{Sn} , Schnittdicke der Hirnschnitte.

Um dabei den mittleren Zelldurchmesser (d_{Zelle}) zu ermitteln, wurden auf fünf Schnitten pro Hirn und Region fünf Zellen in 400facher Vergrößerung ausgemessen. Insgesamt wurden somit 25 Zellen pro Kerngebiet erfasst. Die Schnittdicke war die festgelegte Schnittdicke von $40\mu\text{m}$. Der Wert der korrigierten Zellzahl ($n_{\text{korrigiert}}$) wurde für sämtliche weitere Berechnungen verwendet. Volumen und Zelldichte ergaben sich aus der Fläche bzw. der korrigierten Zellzahl unter Berücksichtigung der festgelegten Schnittdicken.

2 Material und Methoden

2.5.6. Analyse der Faserdichte in Hippokampus und Amygdala

Für die Bestimmung der Faserdichte wurden koronare Schnitte des dorsalen Hippokampus (linke Hemisphere, ab Bregma -1.80mm; siehe Abb. 7), ventralen Hippokampus (rechte Hemisphere, ab Bregma -2.92mm; siehe Abb. 8 + 9) und der Amygdala (linke Hemisphere, ab Bregma -0.94mm; siehe Abb. 7) herangezogen. Auch hierbei fand die verblindete Analyse an codierten Schnitten statt. Zur differenzierten Analyse wurden der ventrale und dorsale Hippokampus in die drei Schichten der CA1- und CA3-Region (jeweils Or, Rad, LMol) unterteilt, der DG in zwei Schichten (Mol, ML). Bei der Auswertung der Amygdala fand eine Aufteilung in vier Unterregionen statt: laterale Amygdala (La), basolaterale Amygdala (BLA), zentraler kapsulärer Amygdalakern (CeC) und medialer Teil des zentralen Amygdalakerns (CeM). Vom Hippokampus wurde jeweils ein Bild pro Schicht auf fünf einander folgenden Schnitten erstellt (außer ventraler DG, hier waren lediglich drei einander folgende Schnitte möglich), von der Amygdala jeweils ein Bild pro Unterregion auf drei einander folgenden Schnitten (400fache Vergrößerung).

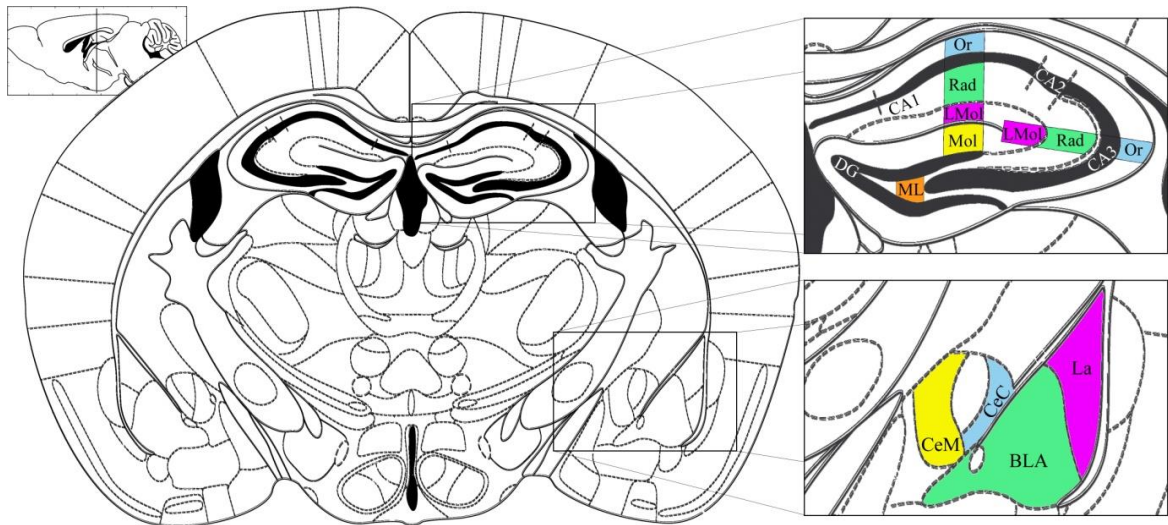


Abb. 7: Schichtung des dorsalen Hippokampus und der Amygdala

Der obere Ausschnitt zeigt den dorsalen Hippokampus mit seiner typischen Schichtung sowie den CA-Regionen, der untere die Amygdala mit ihren Unterregionen. Abkürzungen: CA1-3, Cornu-Ammonis-Regionen 1-3; DG, Gyrus dentatus; Or, Stratum oriens; Rad, Stratum radiatum; LMol, Stratum lacunosum-moleculare; Mol, Stratum moleculare des DG; ML, Stratum multiforme des DG, BLA, basolateraler Kern der Amygdala; La, lateraler Kern der Amygdala, CeC, kapsulärer Teil der zentralen Amygdala, CeM, medialer Teil der zentralen Amygdala. Die Farbmarkierungen zeigen exemplarisch die ausgewerteten Bereiche des Hippokampus, die jeweiligen Schichten gehen jedoch darüber hinaus (nach Paxinos und Franklin, 2004; Bregma: -1,46).

2 Material und Methoden

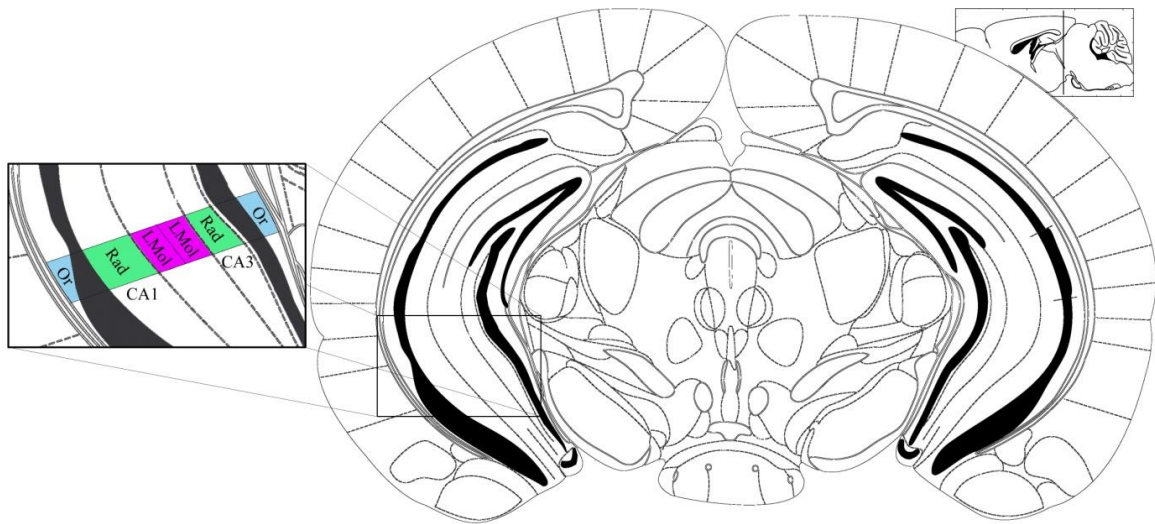


Abb. 8: Schichtung des ventralen Hippokampus

Abkürzungen: siehe Abb. 7. Die Farbmarkierungen zeigen lediglich einen Ausschnitt (nach Paxinos und Franklin, 2004; Bregma: -3,08).

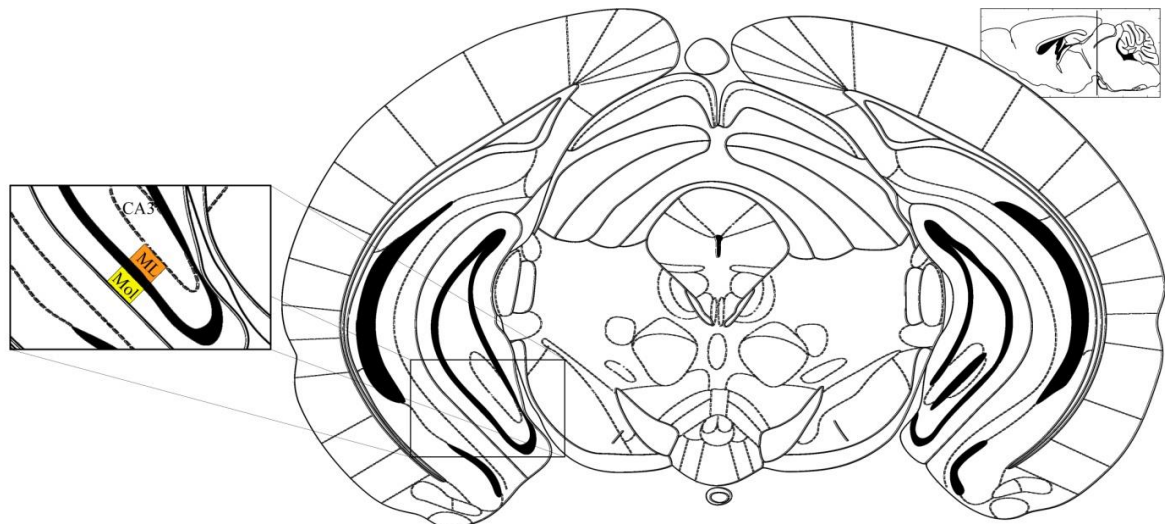


Abb. 9: Schichtung des Gyrus dentatus des ventralen Hippokampus

Abkürzungen: siehe Abb. 7. Die Farbmarkierungen zeigen lediglich einen Ausschnitt (nach Paxinos und Franklin, 2004; Bregma: -3,64).

Das Verfahren zur Bestimmung der Faserdichte wird im Anhang (siehe Kap. 6.5.2) detailliert erläutert.

2.6. Statistik

Für die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde das Programm SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY, USA) verwendet. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde auf Normalverteilung untersucht, für Einzelvergleiche wurden robuste t-Tests unter Annahme ungleicher Varianzen (Welch-Test) genutzt. Mehrfachver-

2 Material und Methoden

gleiche wurden mittels Varianzanalysen (ANOVA) mit und ohne Messwiederholung ermöglicht. Hierbei diente der Levene-Test zur Prüfung der Varianzhomogenität. Traf die Sphärizitätenannahme (Mauchly-Test) nicht zu, wurde der Greenhouse-Geysler-Test genutzt. Reguläre Post-hoc-Tests waren bei jeweils nur zweistufigen Zwischensubjektfaktoren nicht anwendbar. Deshalb wurden anschließende Post-hoc-Untersuchungen mit multiplen t-Tests (Welch-Test) unter Bonferroni-Holm-Adjustierung durchgeführt. Bei der sozialen Interaktion im Offenfeld, der Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion und dem Forced Swim Test wurden mehrere Parameter verschiedenster Blickrichtungen ausgewertet. Da dabei keine Beschränkung auf einen primären Endpunkt vorlag, wurden in der Auswertung keine α -Adjustierungen vorgenommen. Daher sollten die Ergebnisse im explorativen Sinne interpretiert werden. Das Alphaniveau lag bei allen Analysen (Interaktionen und Haupteffekte) bei 0,05. Eine detaillierte Beschreibung der statistischen Analysen jedes Experimentes ist im Ergebnisteil nachzuvollziehen.

3. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die signifikanten Versuchsergebnisse dargestellt. Sämtliche hier genannte Tabellen sowie Abbildungen zu nicht-signifikanten Ergebnissen sind in den Kapiteln 6.5.3. und 6.5.4. im Anhang einzusehen.

3.1. Soziale Interaktion im Offenfeld

3.1.1. Unterschiede im Sozialverhalten

Die dreifaktorielle multivariate ANOVA (Zwischensubjektfaktoren GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG) ergab keine signifikanten Interaktionen für die Faktoren GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG (n.s., siehe Tab. 7). Mit „BEHANDLUNG“ ist gemeint, ob ein Tier vorher isoliert bzw. nicht-isoliert war. Ebenfalls waren für GENOTYP x GESCHLECHT keine Interaktionen nachweisbar (n.s., siehe Tab. 8). Für die Faktoren GENOTYP x BEHANDLUNG zeigten sich jedoch signifikante Interaktionen im Abstand zwischen den Tieren ($F(1; 56) = 5,520$; $p < 0,05$) und im Aufstellen in der Mitte des Offenfeldes, dem sog. Rearing ($F(1; 56) = 6,979$; $p < 0,05$). Zwischen den Faktoren GESCHLECHT x BEHANDLUNG waren signifikante Interaktionen im Schnüffeln ($F(1; 56) = 11,246$; $p < 0,001$), im anogenitalen Schnüffeln ($F(1; 56) = 6,580$; $p < 0,05$), im Rearing ($F(1; 56) = 6,311$; $p < 0,05$), im Putzen ($F(1; 56) = 8,649$; $p < 0,01$), in der Latenz bis zum ersten Kontakt ($F(1; 56) = 7,243$; $p < 0,01$) sowie in der Anzahl der aggressiven Kontakte ($F(1; 56) = 5,619$; $p < 0,05$) nachweisbar. Für andere Parameter ergaben sich keinerlei signifikante Interaktionen (n.s., siehe Tab. 8).

Für den Faktor GENOTYP ergab die dreifaktorielle multivariate ANOVA einen signifikanten Haupteffekt für die im freundlichen Kontakt verbrachte Zeit als wichtigstem Parameter der sozialen Interaktion. Diese war bei GFP-Tieren signifikant kürzer als bei WT ($F(1; 56) = 7,319$ $p < 0,01$; siehe Abb. 10). Außerdem zeigten die GFP-Tiere einen signifikant höheren mittleren Abstand zueinander als WT ($F(1; 56) = 6,903$; $p < 0,05$; siehe Abb. 10). GFP-Mäuse wiesen ebenfalls eine signifikant geringere aktive soziale Interaktion auf ($F(1; 56) = 4,956$; $p < 0,05$). Lediglich Trends zu einem signifikanten Haupteffekt ergaben sich für eine geringere passive soziale Interaktion ($F(1; 56) = 3,382$; n.s.) sowie ein häufigeres Aufstellen am Rand des Offenfeldes, dem sog. Leaning ($F(1; 56) = 2,925$; n.s.) von GFP-Mäusen gegenüber WT. Die Untersuchung der anderen Parameter ergab keine Unterschiede (n.s., siehe Tab. 7).

3 Ergebnisse

Für den Faktor GESCHLECHT zeigte die dreifaktorielle multivariate ANOVA, dass männliche Tiere einen signifikant geringeren mittleren Abstand zueinander einhielten als weibliche Tiere ($F(1; 56) = 5,101; p < 0,05$). Ebenfalls zeigten sich ein häufigeres anogenitales Schnüffeln ($F(1; 56) = 22,789; p < 0,001$) und ein häufigeres Folgen ($F(1; 56) = 9,920; p < 0,01$) bei Männchen im Vergleich zu Weibchen. Eine höhere Kontaktanzahl der männlichen Tiere spiegelte sich sowohl in den signifikant häufigeren freundlichen ($F(1; 56) = 9,691; p < 0,01$) und auch aggressiven Kontakten ($F(1; 56) = 5,158; p < 0,05$) männlicher Versuchstiere wider. Lediglich ein Trend zeigte sich für die längere im aggressiven Kontakt zugebrachte Zeit von Männchen ($F(1; 56) = 2,855; n.s.$). In weiteren untersuchten Parametern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (n.s., siehe Tab. 7).

Die dreifaktorielle multivariate ANOVA zeigte für den Faktor BEHANDLUNG eine signifikant höhere passive soziale Interaktion bei isoliert gehaltenen Tieren ($F(1; 56) = 11,572; p < 0,001$; siehe Abb. 10). Diese schnüffelten signifikant häufiger am unbekanntem Versuchspartner ($F(1; 56) = 28,862; p < 0,001$). Isolierte Versuchstiere verbrachten signifikant mehr Zeit im freundlichen Kontakt miteinander ($F(1; 56) = 5,580; p < 0,05$) und zeigten mehr aggressive Kontakte als nicht-isolierte Tiere ($F(1; 56) = 4,665; p < 0,05$). Nicht-isolierte Tiere wiesen ein signifikant häufigeres Rearing auf ($F(1; 56) = 8,823; p < 0,01$) und putzten sich signifikant häufiger ($F(1; 56) = 5,352; p < 0,05$). Lediglich ein Trend zeichnete sich im Aufstellen in der Mitte ab, alle übrigen Parameter ergaben ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (n.s., siehe Tab. 7).

Unter separater Betrachtung beider Geschlechter wurde für die Untersuchung männlicher Tiere eine zweifaktorielle ANOVA (Zwischensubjektfaktoren GENOTYP x BEHANDLUNG) durchgeführt. Diese ergab für die Faktoren GENOTYP x BEHANDLUNG signifikante Interaktionen in der passiven sozialen Interaktion ($F(1; 32) = 6,936; p < 0,05$) und im Rearing ($F(1; 32) = 6,384; p < 0,05$).

Ebenfalls ergaben sich signifikante Haupteffekte für den Faktor GENOTYP. So wiesen männliche GFP-Tiere eine signifikant kürzere in freundlichem Kontakt verbrachte Zeit auf ($F(1; 32) = 4,743; p < 0,05$). Trends waren für den mittleren Abstand der Tiere untereinander sowie für die passive soziale Interaktion festzustellen. Für die übrigen Parameter zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (n.s., siehe Tab. 10). Bezüglich signifikanter Haupteffekte für den Faktor BEHANDLUNG zeigten isolierte Männchen eine signifikant häufigere passive soziale Interaktion ($F(1; 32) = 14,613; p < 0,001$), ein häufigeres Beschnüffeln ($F(1; 32) = 45,682; p < 0,001$) und anogenitales Schnüffeln ($F(1; 32) = 4,812; p < 0,05$). Isolierte Männchen stellten sich signifikant häufiger auf (Rearing; $F(1; 32) = 12,703; p < 0,001$) und putzten sich signifikant weniger ($F(1; 32) = 13,728; p < 0,001$). Darüber hinaus zeigten

3 Ergebnisse

isolierte männliche Tiere signifikant häufiger aggressive Kontakte ($F(1; 32) = 6,923; p < 0,05$) und einen Trend zu längerer in aggressivem Kontakt verbrachter Zeit (n.s., siehe Tab. 10).

Bei separater Betrachtung der weiblichen GFP-Mäuse und WT zeigte die zweifaktorielle ANOVA (Zwischensubjektfaktoren GENOTYP x BEHANDLUNG) für GENOTYP x BEHANDLUNG lediglich Trends zu einer Interaktion im mittleren Abstand und im Putzverhalten (n.s., siehe Tab. 9). Signifikante Haupteffekte für den Faktor GENOTYP spiegelten sich nur in einer signifikant niedrigeren aktiven sozialen Interaktion weiblicher GFP-Tiere ($F(1; 32) = 4,443; p < 0,05$) wider. Ein Trend zu einem größeren mittleren Abstand war für weibliche GFP-Tiere erkennbar (n.s., siehe Tab. 9).

Für den Faktor BEHANDLUNG zeigte sich ein signifikant häufigeres Aufstellen nicht-isolierter Tiere am Rand ($F(1; 32) = 9,980; p < 0,01$), eine signifikant höhere Latenz bis zum Auftreten des ersten Kontakts bei nicht-isolierten Tieren ($F(1; 32) = 4,336; p < 0,05$) sowie signifikant längere Zeit in freundlichem Kontakt bei isolierten Tieren ($F(1; 32) = 4,403; p < 0,05$). Trends zeigten sich bei der passiven sozialen Interaktion sowie dem anogenitalen Schnüffeln, alle weiteren Parameter zeigten keine signifikanten Unterschiede (n.s., siehe Tab. 9).

Um Unterschiede innerhalb der Behandlungsgruppen nachzuweisen, wurden t-Tests durchgeführt. Isolierte männliche GFP-Tiere wiesen eine signifikant geringere passive soziale Interaktion auf ($T = -2,32; df = 15; p < 0,05$). Lediglich ein Trend war für die im freundlichen Kontakt verbrachte Zeit zu erkennen, wonach diese bei GFP-Mäusen kürzer war als bei WT ($T = -2,02; df = 15; n.s.$). Männliche nicht-isolierte GFP-Mäuse stellten sich signifikant häufiger auf als ihre Geschwistertiere (Rearing; $T = 2,88; df = 17; p < 0,01$).

Für isolierte GFP-Weibchen zeigte sich eine signifikant höhere Latenz bis zum ersten Kontakt ($T = 2,59; df = 10; p < 0,05$). Für die aktive soziale Interaktion war lediglich ein Trend erkennbar und für weitere Parameter ergaben sich keine Signifikanzen (n.s., siehe Tab. 11). Nicht-isolierte GFP-Weibchen zeigten lediglich einen Trend für häufigeres Putzen ($T = 1,86; df = 14; n.s.$).

Zusammenfassend lässt sich herausstellen, dass GFP-Tiere einen signifikant höheren Abstand zueinander, eine geringere aktive soziale Interaktion, sowie geringere in freundlichem Kontakt verbrachte Zeit gegenüber WT zeigten. Somit hatten GFP-Tiere insgesamt eine verminderte soziale Interaktion im Vergleich zu WT. Dies war besonders auf männliche GFP-Tiere zurückzuführen, welche signifikant weniger Zeit in freundlichem Kontakt verbrachten als männliche WT. Isolierte männliche GFP-Mäuse zeigten dabei eine signifikant geringere passive soziale Interaktion als isolierte männliche WT. Bei weiblichen GFP-Mäusen wurde ebenfalls eine signifikant niedrigere aktive soziale Interaktion beobach-

3 Ergebnisse

tet als bei weiblichen WT. Isolierte weibliche GFP-Tiere zeigten zudem eine höhere Latenz bis zum ersten Kontakt im Vergleich zu isolierten weiblichen WT. Isolierte Tiere zeigten eine signifikant höhere passive soziale Interaktion als nicht-isolierte Tiere. Isolierte Männchen zeigten insgesamt eine höhere Kontaktanzahl, auch aggressiver Art, als nicht-isolierte Männchen. Nicht-isolierte weibliche Tiere hatten eine signifikant geringere Kontaktanzahl und eine signifikant höhere Latenz bis zum Auftreten des ersten Kontakts verglichen mit isolierten Weibchen. Isolierte weibliche Tiere verbrachten eine signifikant längere Zeit in freundlichem Kontakt als nicht-isolierte.

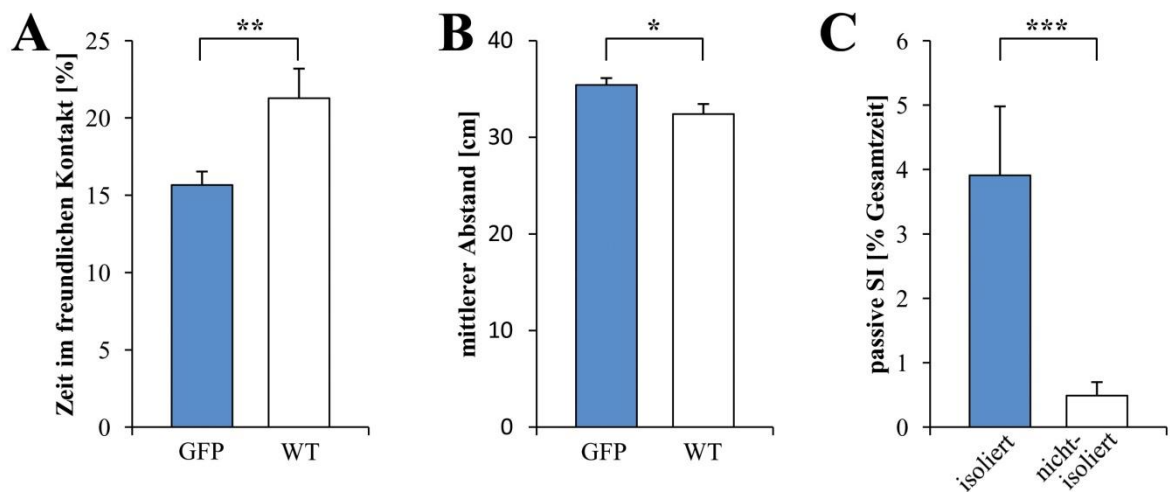


Abb. 10: Soziale Interaktion

Soziale Interaktion von GFP- und WT-Mäusen sowie von isolierten und nicht-isolierten Tieren. A: Das Diagramm zeigt die Zeit im freundlichen Kontakt in Prozent [%] von GFP- und WT-Mäusen. B: Dargestellt wird der mittlere Abstand in Zentimetern [cm] von GFP- und WT-Mäusen. C: Gezeigt wird die passive soziale Interaktion prozentual zur Gesamtzeit des Versuches [% Gesamtzeit] von isolierten und nicht-isolierten Tieren. Angaben in MW \pm SEM. Dreifaktorielle multivariate ANOVA (Zwischensubjektfaktoren GENOTYP (A+B) bzw. BEHANDLUNG (C)). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.1.2. Vergleich der motorischen Aktivität

Als Marker für die Aktivität und Motorik der Versuchstiere wurde die Laufstrecke im Offenfeld untersucht. Die dreifaktorielle multivariate ANOVA (Zwischensubjektfaktoren GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG) und die zweifaktoriellen multivariaten ANOVA (Zwischensubjektfaktoren GENOTYP x BEHANDLUNG) beider Geschlechter zeigten jedoch keinerlei signifikante Interaktionen oder Haupteffekte. Zu erwähnen ist, dass lediglich die einfaktorielle ANOVA (Zwischensubjektfaktor: GENOTYP) eine signifikant größere Laufstrecke männlicher isolierter GFP-Mäuse verglichen mit männlichen isolierten WT zeigte ($F(1; 15) = 5,965$; $p < 0,05$; siehe Tab. 11).

3 Ergebnisse

3.1.3. Unterschiede im Aufenthalt in den Versuchsregionen

Um Rückschlüsse auf das Angstverhalten der Versuchstiere ziehen zu können, wurde das Offenfeld für die Auswertung in Zentrum und Randbereich unterteilt (siehe Abb. 1 B). Für ein normales angstassoziiertes Verhalten in unbekannter Umgebung bei schattenfreier Beleuchtung wird ein längerer Aufenthalt im geschützten Randbereich erwartet.

Die dreifaktorielle multivariate ANOVA (Zwischensubjektfaktoren GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG) zeigte für den Rand- und Zentrumsaufenthalt keine Interaktionen von GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG, GENOTYP x GESCHLECHT und GENOTYP x BEHANDLUNG (n.s., siehe Tab. 8). Dennoch waren signifikante Interaktionen für GESCHLECHT x BEHANDLUNG im Rand- ($F(1; 56) = 7,285$; $p < 0,01$) und Zentrumsaufenthalt ($F(1; 56) = 7,075$; $p < 0,05$) nachweisbar. Für den Zwischensubjektfaktor GENOTYP war jedoch kein Haupteffekt zu sehen (n.s., siehe Tab. 9). Für den Faktor GESCHLECHT ergab sich ein signifikant häufigerer Aufenthalt der Weibchen am Rand des Offenfeldes ($F(1; 56) = 13,023$; $p < 0,001$; siehe Abb. 11), wohingegen sich Männchen signifikant häufiger in der Mitte aufhielten ($F(1; 56) = 12,985$; $p < 0,001$). Für den Faktor BEHANDLUNG zeigte sich jeweils nur ein Trend, so waren isolierte Tiere häufiger am Rand anzutreffen und nicht-isolierte vermehrt in der Mitte (n.s., siehe Tab. 11).

Bei näherer Betrachtung männlicher Tiere zeigte die zweifaktorielle multivariate ANOVA (Zwischensubjektfaktoren GENOTYP x BEHANDLUNG) keine Interaktionen oder Haupteffekte (n.s., siehe Tab. 10). In der ANOVA (Zwischensubjektfaktoren GENOTYP x BEHANDLUNG) von weiblichen Mäusen waren keine Effekte für GENOTYP (n.s., siehe Tab. 9), jedoch signifikante Haupteffekte für den Faktor BEHANDLUNG erkennbar. So zeigten isolierte Weibchen einen signifikant längeren Randaufenthalt ($F(1; 24) = 12,915$; $p < 0,001$), während nicht-isolierte Weibchen sich signifikant häufiger in der Mitte des Offenfeldes aufhielten ($F(1; 24) = 12,678$; $p < 0,01$).

3 Ergebnisse

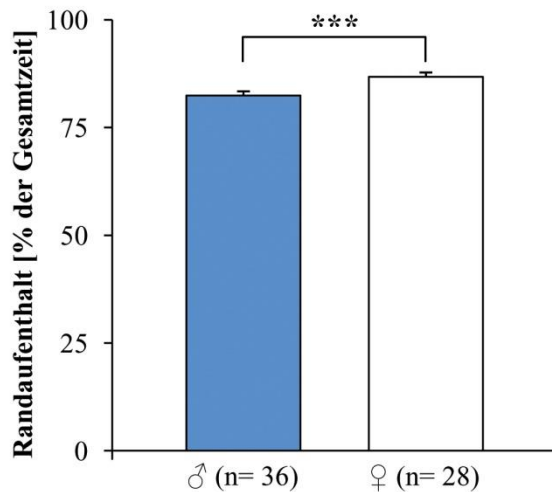


Abb. 11: Angstverhalten männlicher und weiblicher Tiere

Randaufenthalt als Hinweis für Angstverhalten. Dargestellt ist der Randaufenthalt in Prozent der Gesamtzeit [% der Gesamtzeit] von männlichen und weiblichen Tieren. Angaben in MW \pm SEM. Dreifaktorielle multivariate ANOVA (Zwischen-subjektfaktor GESCHLECHT). *** $p < 0,001$.

Zusammenfassend zeigten weibliche Tiere ein ängstlicheres Verhalten als männliche, bei isolierten Weibchen war dieses Verhalten deutlicher ausgeprägt als bei nicht-isolierten. Ein Genotypenunterschied konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

3.2. Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion

3.2.1. Überprüfung des Versuchsaufbaus

Zunächst wurde der Versuchsaufbau überprüft und die Untersuchung auf grundsätzliche Unterschiede in der Reaktion auf verschiedene akustische Stimuli hin vorgenommen. Die akustische Startle-Reaktion (ASR) ist die motorische Antwort auf einen Startle-Stimulus (PULSE-ALONE), wobei die Startle-Amplitude die Reaktion auf verschiedene Stimuli beschreibt. Es wurden vier verschiedene Stimulustypen untersucht und dabei die ASR aufgezeichnet: 1. Kein Stimulus (NOSTIM), 2. Präpuls bei 10kHz und 75dB (PREPULSE), 3. Startle-Stimulus (PULSE-ALONE) bei 93, 107 und 113dB, 4. Präpuls (75dB) mit nachfolgendem Startle-Stimulus bei 93, 107 und 113dB (PREPULSE+PULSE).

3.2.2. Präpulsinhibition bei einem Interpulsintervall von 100ms

Für die Versuche wurden 65 GFP-Tiere sowie 60 WT herangezogen. Von den GFP-Tieren waren 32 weiblich, davon wiederum 12 isoliert und 20 nicht-isoliert, sowie 33 männlich, wovon 19 isoliert und 14 nicht-isoliert waren. Von den WT waren 24 weiblich, davon wiederum 12 isoliert und 12 nicht-isoliert, sowie 36 männlich, wovon 16 isoliert und 20 nicht-isoliert waren.

3.2.3. Wirkung verschiedener PULSE-ALONE-Intensitäten auf die ASR (IPI 100ms)

Um zu untersuchen, inwieweit die Intensität des Startle-Stimulus (PULSE-ALONE) eine Veränderung der Startle-Reaktion (ASR) bewirkte, wurden die Startle-Antworten bei drei

3 Ergebnisse

verschiedenen PULSE-ALONE-Intensitäten (93, 107 und 113dB SPL) gemessen. In der vierfaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung (INTENSITÄT x GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG) zeigte sich eine signifikante Interaktion für die Innersubjektfaktoren INTENSITÄT x GESCHLECHT ($F(1,69; 197,45) = 9,48; p < 0,001$), sowie ein signifikanter Haupteffekt für den Zwischensubjektfaktor GESCHLECHT ($F(1; 117) = 24,86; p < 0,001$; siehe Abb. 12 A). Es waren keine weiteren signifikanten Interaktionen oder Haupteffekte zu beobachten. Somit zeigten sich Geschlechtsunterschiede in der ASR, wobei männliche Tiere höhere Werte in der Schreckreaktion aufwiesen. Jedoch waren keine Genotypen- oder Behandlungsunterschiede nachweisbar (n.s., siehe Tab. 13-17).

3.2.4. Wirkung verschiedener PULSE-ALONE-Intensitäten auf die PPI (IPI 100ms)

Die Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion (PPI) wurde ebenfalls bei verschiedenen PULSE-ALONE-Intensitäten (93, 107 und 113dB SPL) gemessen. In der vierfaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung (INTENSITÄT x GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG) zeigten sich keine signifikanten Interaktionen, jedoch ein signifikanter Haupteffekt für den Zwischensubjektfaktor GESCHLECHT ($F(1; 117) = 5,75; p < 0,05$; siehe Abb. 12 B). Es waren keine weiteren signifikanten Interaktionen oder Haupteffekte zu beobachten. Damit zeigten männliche Tiere bei einem Interpulsintervall von 100ms eine höhere Präpulsinhibition (PPI) als weibliche Tiere. Ein Genotypenunterschied oder ein Unterschied zwischen isolierten und nicht-isolierten Tieren war nicht feststellbar (n.s., siehe Tab. 13-17).

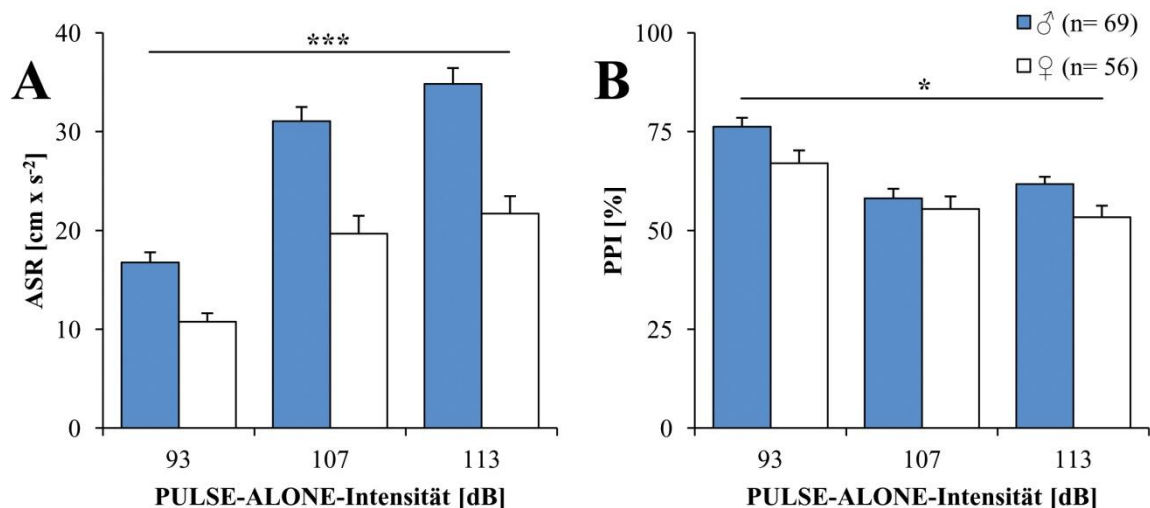


Abb. 12: Wirkung der PULSE-ALONE-Intensitäten auf ASR + PPI beider Geschlechter (IPI 100ms)

(A) zeigt die Startle-Amplitude [cm x s⁻²] und (B) die PPI [%] in Abhängigkeit von den Intensitäten der PULSE-ALONE-Stimuli in Dezibel [dB] bei männlichen und weiblichen Tieren. Angaben in MW ± SEM. Vierfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (INTENSITÄT x GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG), Innersubjektfaktoren INTENSITÄT x GESCHLECHT. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.2.5. Präpulsinhibition bei einem Interpulsintervall von 400ms

Bei diesem Experiment war der methodische Aufbau gleich dem des Versuches mit einem Interpulsintervall von 100ms. Die Versuchstierzahlen sowie untersuchten Stimulustypen entsprachen dem vorherigen Experiment, sodass alle Gruppen vergleichbar blieben. Als Unterschied wurde lediglich das Interpulsintervall auf 400ms verlängert. Für die Versuche wurden dieselben Tiere genutzt, dazwischen lagen sieben Tage.

3.2.6. Wirkung verschiedener PULSE-ALONE-Intensitäten auf die ASR (IPI 400ms)

In der vierfaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung (INTENSITÄT x GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG) zeigte sich eine signifikante Interaktion für die Innersubjektfaktoren INTENSITÄT x GESCHLECHT ($F(1,65; 193,00) = 10,22; p < 0,001$), sowie ein signifikanter Haupteffekt für die Zwischensubjektfaktoren GENOTYP ($F(1; 117) = 4,01; p < 0,05$) und GESCHLECHT ($F(1; 117) = 31,05; p < 0,001$; siehe Abb. 13 A + Tab. 18). Es waren keine weiteren signifikanten Interaktionen oder Haupteffekte zu beobachten. Somit wiesen GFP-Tiere eine niedrigere ASR als WT auf und männliche eine höhere ASR als weibliche Tiere. Ein Unterschied zwischen isolierten und nicht-isolierten Tieren war nicht nachweisbar (n.s., siehe Tab. 19-23).

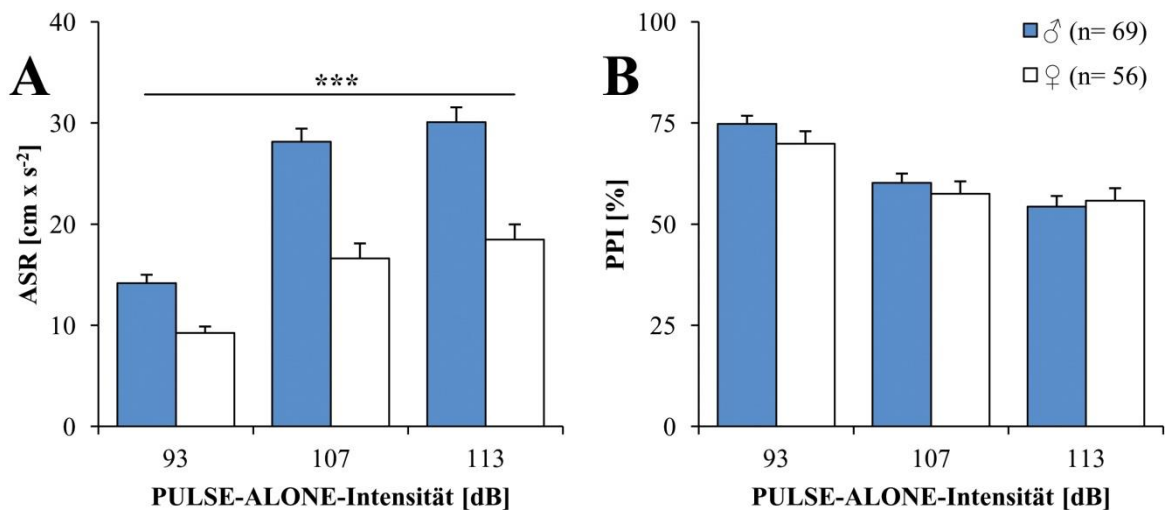


Abb. 13: Wirkung der PULSE-ALONE-Intensitäten auf ASR + PPI beider Geschlechter (IPI 400ms)

(A) zeigt die Startle-Amplitude [cm x s⁻²] und (B) die PPI [%] in Abhängigkeit von den Intensitäten der PULSE-ALONE-Stimuli in Dezibel [dB] bei männlichen und weiblichen Tieren. Angaben in MW ± SEM. Vierfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (INTENSITÄT x GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG), Innersubjektfaktoren INTENSITÄT x GESCHLECHT. *** $p < 0,001$.

3.2.7. Wirkung verschiedener PULSE-ALONE-Intensitäten auf die PPI (IPI 400ms)

In der vierfaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung (INTENSITÄT x GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG) konnten weder signifikante Interaktionen, noch

3 Ergebnisse

Haupteffekte gezeigt werden (n.s., siehe Abb. 13 B und Tab. 19-23). Zusammenfassend ergaben sich bei einem Interpulsintervall von 400ms keinerlei Genotypen-, Geschlechts- oder Behandlungsunterschiede in der PPI.

3.3. Forced Swim Test

Dieser Test dient der Untersuchung von Verhalten in auswegloser Situation. Dabei gilt eine längere in Immobilität (Regungslosigkeit) verbrachte Zeit als Zeichen für eine höhere Empfindlichkeit gegenüber negativen Stimmungen. Es wurden ausschließlich männliche GFP-Tiere (n=33, davon 20 isoliert und 13 nicht-isoliert) und männliche WT (n=26, davon 15 isoliert und 11 nicht-isoliert) untersucht.

Die zweifaktorielle multivariate ANOVA (GENOTYP x BEHANDLUNG) ergab keine signifikanten Interaktionen für GENOTYP x BEHANDLUNG (n.s., siehe Tab. 25). Jedoch fanden sich signifikante Haupteffekte für den Zwischensubjektfaktor GENOTYP. So zeigten GFP-Mäuse eine signifikant niedrigere Latenz bis zum Auftreten von Immobilität ($F(1; 55)=6,233$; $p<0,05$), schwammen signifikant weniger ($F(1; 55)=56,605$; $p<0,001$) und verweilten folglich signifikant länger in Immobilität ($F(1; 55)=50,670$; $p<0,001$). Außerdem kletterten GFP-Mäuse signifikant länger am Rand des Becherglases ($F(1; 55)=7,484$; $p<0,01$). Bei der Betrachtung des Faktors BEHANDLUNG zeigten isolierte Tiere eine signifikant höhere Latenz bis zum Auftreten von Immobilität ($F(1; 55)=14,040$; $p<0,001$) und setzten signifikant weniger Faeces-Boli ab ($F(1; 55)=6,792$; $p<0,05$). Andere Parameter ergaben keine Unterschiede (n.s., siehe Tab. 25).

Bei separater Betrachtung der isolierten Tiere zeigte die Post-hoc-Analyse, dass isolierte GFP-Tiere eine signifikant niedrigere Latenz bis zum Auftreten der ersten Immobilität aufwiesen ($T=-2,79$; $df=22,51$; $p<0,05$; siehe Abb. 14 B), signifikant weniger schwammen ($T=-5,6$; $df=32,64$; $p<0,001$) und folglich signifikant mehr Zeit in Immobilität verbrachten ($T=5,43$; $df=32,59$; $p<0,001$; siehe Abb. 14 A). Für andere Parameter waren die gemessenen Unterschiede nicht signifikant (n.s., siehe Tab. 25). Für die nicht-isolierten GFP-Mäuse und WT zeigte die Post-hoc-Analyse, dass GFP-Mäuse länger am Rand des Becherglases kletterten ($T=3,09$; $df=18,65$; $p<0,01$), kürzere Zeit schwammen ($T=-5,98$; $df=19,76$; $p<0,001$) und damit länger immobil waren ($T=5,26$; $df=21,2$; $p<0,001$; siehe Abb. 14 A). Weitere signifikante Unterschiede wurden nicht beobachtet (n.s., siehe Tab. 25).

3 Ergebnisse

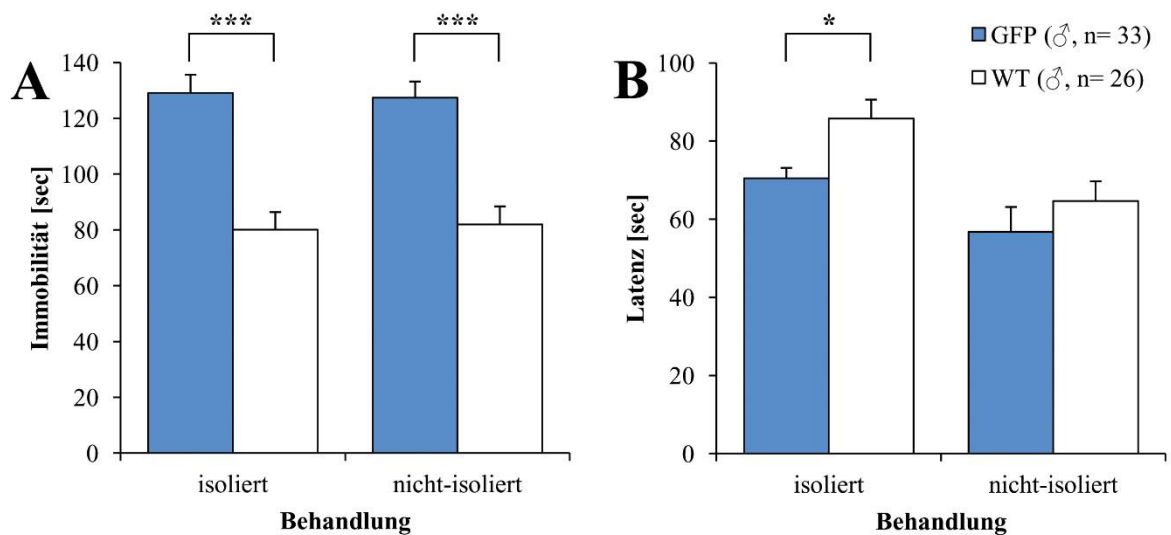


Abb. 14: Immobilität und Latenz im Forced Swim Test

A: Dargestellt sind die Immobilität in Sekunden [sec] sowie (B) die Latenz bis zum ersten Auftreten von Immobilität in Sekunden [sec] bei isolierten (n= 20) und nicht-isolierten (n= 13) GFP-Mäusen und isolierten (n= 15) und nicht-isolierten (n= 11) WT. Angaben in MW \pm SEM. Post-hoc-Test: Welch-Tests mit Bonferroni-Holm-Adjustierung. *p<0,05; ***p<0,001.

Somit zeigten GFP-Tiere eine signifikant geringere Latenz bis zum Auftreten der ersten Immobilität und verbrachten signifikant mehr Zeit in Immobilität als WT. Isolierte GFP-Tiere und WT zeigten interessanterweise eine deutlich höhere Latenz bis zum Auftreten der ersten Immobilität als nicht-isolierte Tiere.

3.4. Histologie

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Hirne von männlichen GFP- (n=6) und WT-Mäusen (n=6) ausgewertet. Dabei wurden im medialen und lateralen Septum (Anti-ChAT-Färbung), der Substantia nigra und VTA (Anti-TH-Färbung) sowie den Raphekernen (Anti-5-HT-Färbung) jeweils die Zellzahl, das Volumen sowie die Zelldichte bestimmt. Die Dichte der ChAT-, TH- und 5-HT-immunoreaktiven (IR) Nervenfasern wurde im ventralen und dorsalen Hippokampus, dem DG sowie in der Amygdala gemessen. In der mikroskopischen Übersichtsaufnahme zeigten sich bei keiner der Untersuchungen generelle morphologische Unterschiede zwischen den Tierlinien.

3.4.1. Immunfluoreszenzfärbungen

Zum Nachweis von cholinergen, dopaminergen und serotonergen Synapsen auf GAD67-positiven GABAergen Neuronen wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt und exemplarisch in der CA1-Region des dorsalen Hippokampus eines GFP-Tieres ausgewertet.

3 Ergebnisse

Dabei konnte gezeigt werden, dass alle drei Fasertypen Synapsen mit GABAergen Neuronen haben (siehe Abb. 15).

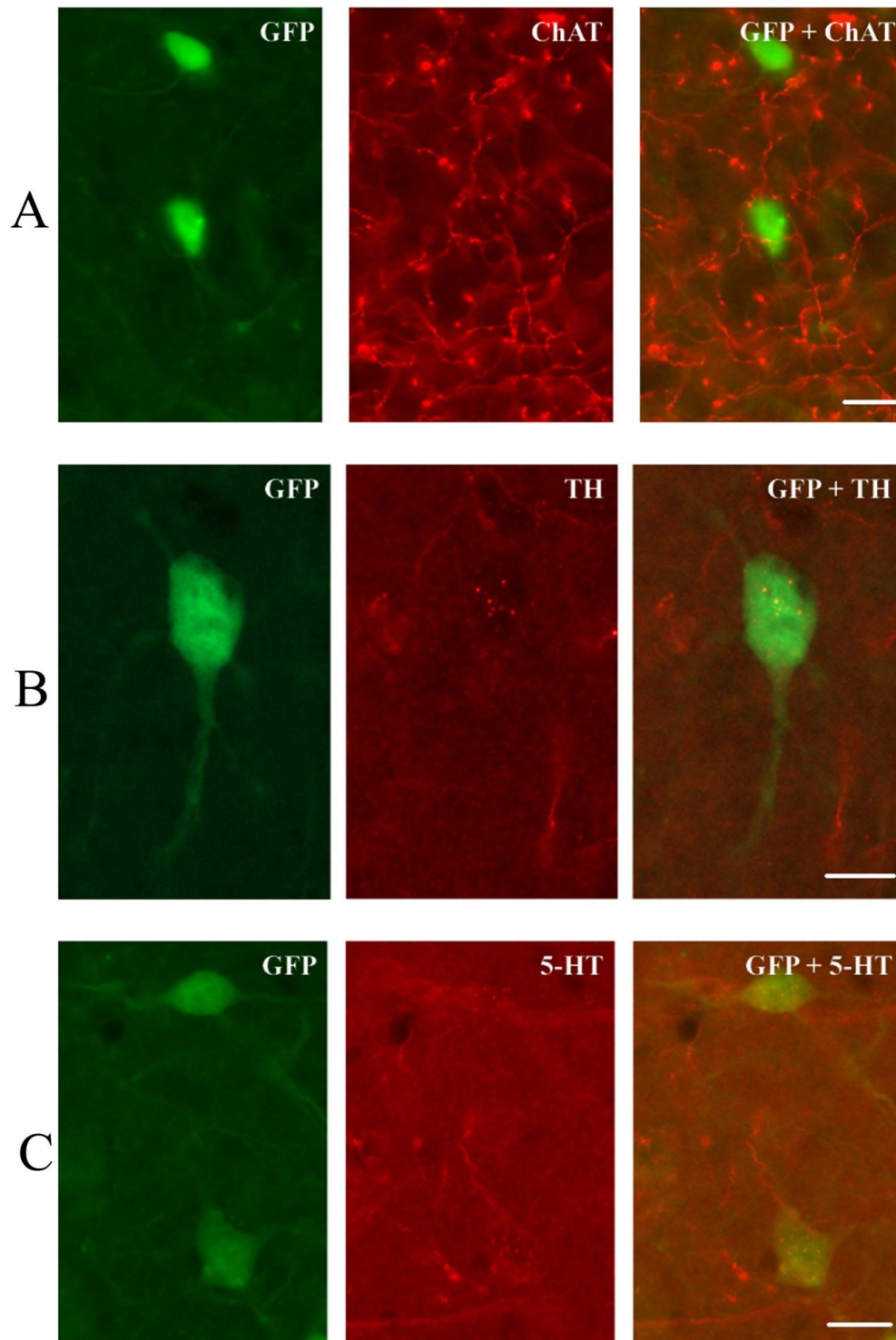


Abb. 15: ChAT-, TH- bzw. 5-HT-IR Afferenzen auf GFP-positiven GABAergen Neuronen

Die Fotos zeigen jeweils das Stratum lacunosum-moleculare der CA1-Region des dorsalen Hippokampus der gleichen Maus. Die erste Säule zeigt Mikrofotografien von GFP-positiven Neuronen. Die mittlere Säule zeigt Mikrofotografien desselben, jedoch gegen ChAT (A), TH (B) bzw. 5-HT (C) gefärbten, Schnittes. Auf den Fotos der rechten Säule wurden beide Mikrofotografien übereinandergelegt. Skalierungsbalken: 10µm.

3 Ergebnisse

3.4.2. Cholinerge Marker

3.4.2.1. ChAT-immunoreaktive Neurone im Septum

Die Untersuchung des medialen (MS) und lateralen Septums (LS) erfolgte an gegen ChAT gefärbten Schnitten (siehe Abb. 16). Bei der Zellzahl ergab die zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Innersubjektfaktor REGION; Zwischensubjektfaktor GENOTYP) eine signifikante Interaktion der Faktoren REGION x GENOTYP ($F(1; 10)=9,317$; $p<0,05$), jedoch keinen signifikanten Haupteffekt für den Zwischensubjektfaktor GENOTYP ($F(1; 10)=2,570$; n.s.). Für das Volumen und die Neuronendichte fanden sich keine signifikanten Interaktionen oder Haupteffekte (n.s., siehe Abb. 25 und Tab. 26). Die Untersuchung des Nucleus basalis magnocellularis erbrachte keine signifikanten Differenzen. GFP-Tiere und WT wiesen somit keine Unterschiede in den untersuchten Parametern auf.

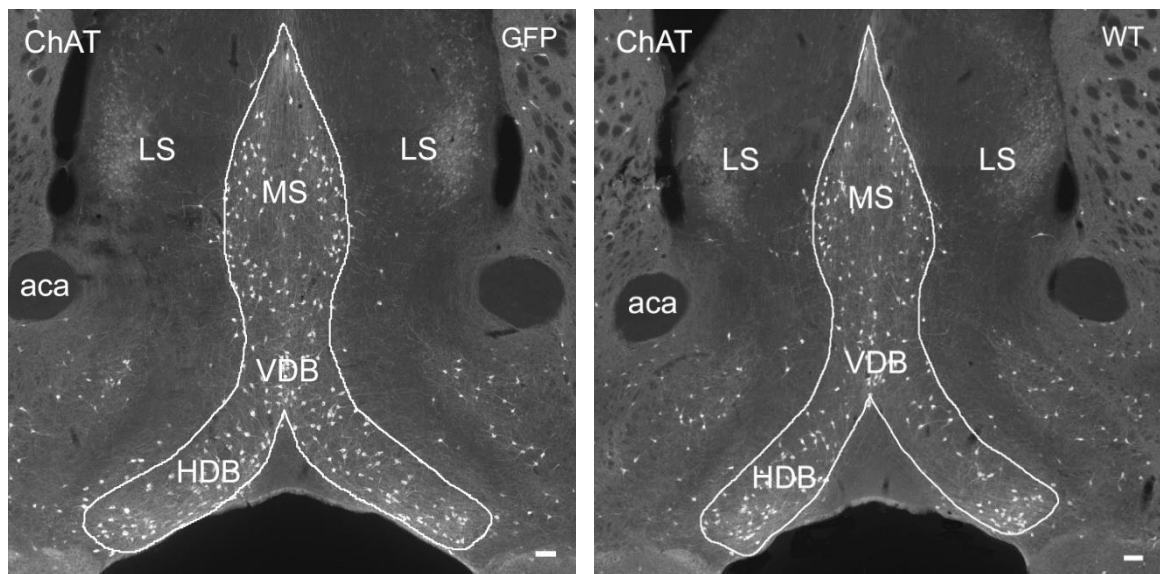


Abb. 16: Aufnahmen der ChAT-IR Neurone im Septum von GFP- und WT-Mäusen

Die Abgrenzungen des medialen Septums sowie VDB und HDB sind mit weißen Linien dargestellt. Abkürzungen: aca, Kommissura anterior; HDB, horizontales diagonales Band; LS, laterales Septum; MS, mediales Septum; VDB, ventrales diagonales Band. Skalierungsbalken: 100 μ m.

3.4.2.2. ChAT-immunoreaktive Fasern in Hippokampus und Amygdala

Im dorsalen und ventralen Hippokampus wurden jeweils die CA1- und CA3-Regionen mit ihren drei Schichten Or, Rad und LMol sowie der DG mit seinen Schichten Mol und ML ausgewertet (siehe Abb. 17). Dabei ergaben sich keine signifikanten Interaktionen oder Haupteffekte (n.s., siehe Tab. 29). Gleiches ergab die Untersuchung der Dichte der ChAT-IR Fasern der vier analysierten Unterregionen der Amygdala (n.s., siehe Tab. 29). Somit zeigten sich keine Unterschiede in den untersuchten Parametern (siehe Abb. 26).

3 Ergebnisse

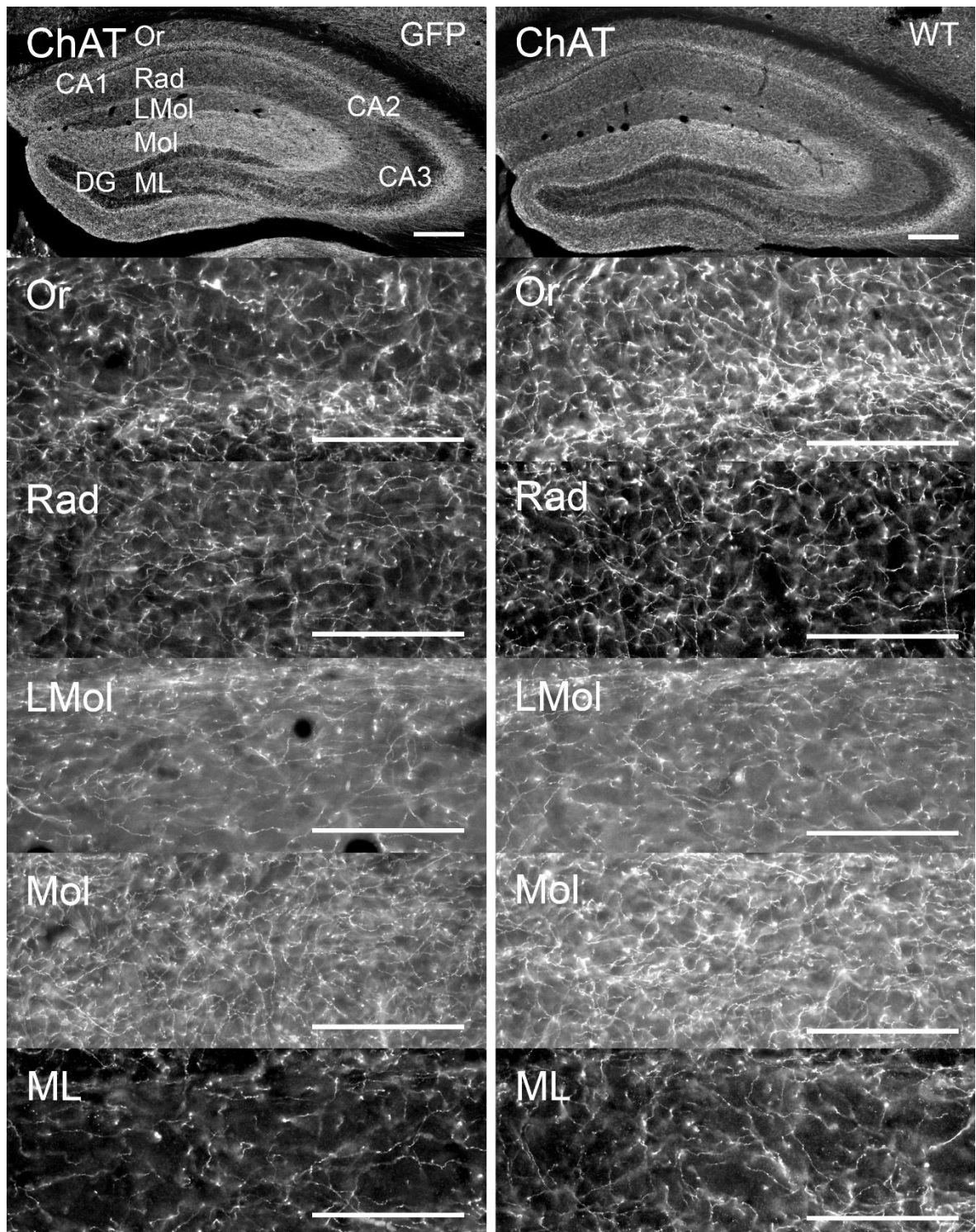


Abb. 17: Aufnahmen der ChAT-IR Fasern des dorsalen Hippokampus von GFP- und WT-Mäusen

Das jeweils oberste Foto zeigt eine Übersicht der Hippokampusformation der ChAT-IR Hirnschnitte einer GFP- (linke Säule) und einer WT-Maus (rechte Säule). Die darunterliegenden Fotos zeigen die Schichten der CA1-Region sowie des dorsalen DG. Abkürzungen: Or, Stratum oriens; Rad, Stratum radiatum; LMol, Stratum lacunosum-moleculare; Mol, Stratum moleculare des Gyrus dentatus; ML, Stratum multiforme des Gyrus dentatus. Die Fotos stammen jeweils von der gleichen Maus. Skalierungsbalken: 100µm.

3 Ergebnisse

3.4.3. Dopaminerge Marker

3.4.3.1. TH-immunoreaktive Neurone in Substantia nigra und VTA

Für die Untersuchung wurden die dopaminergen Ursprungsgebiete im Mesencephalon in die Unterregionen SNC, SNR, SNL sowie die VTA unterteilt (siehe Abb. 18). Die zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Innersubjektfaktor REGION; Zwischensubjektfaktor GENOTYP) ergab für die Zellzahlen der SN-Regionen keine signifikanten Interaktionen für REGION x GENOTYP und keinen Haupteffekt für GENOTYP (n.s., siehe Tab. 27). Ein Vergleich der VTA beider Genotypen zeigte ebenfalls keine Differenz ($T=-0,08$; $df=6,41$; n.s.). Die Analyse der Volumina der Substantia nigra zeigte einen Trend zur signifikanten Interaktion von REGION x GENOTYP ($F(2; 20)=2,613$; n.s.), jedoch keinen Haupteffekt für GENOTYP ($F(1; 10)=2,311$; n.s.). Die Untersuchung der Neuronendichte beider Genotypen ergab ebenfalls keine signifikante Interaktion von REGION x GENOTYP sowie keine Haupteffekte für den Zwischensubjektfaktor GENOTYP (n.s., siehe Tab. 27). Auch die VTA von WT und GFP-Tieren unterschied sich weder im Volumen ($T=-1,16$; $df=9,40$; n.s.), noch in der Neuronendichte ($T=1,30$; $df=6,86$; n.s.). Somit konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen GFP-Mäusen und WT aufgezeigt werden (siehe Abb. 27).

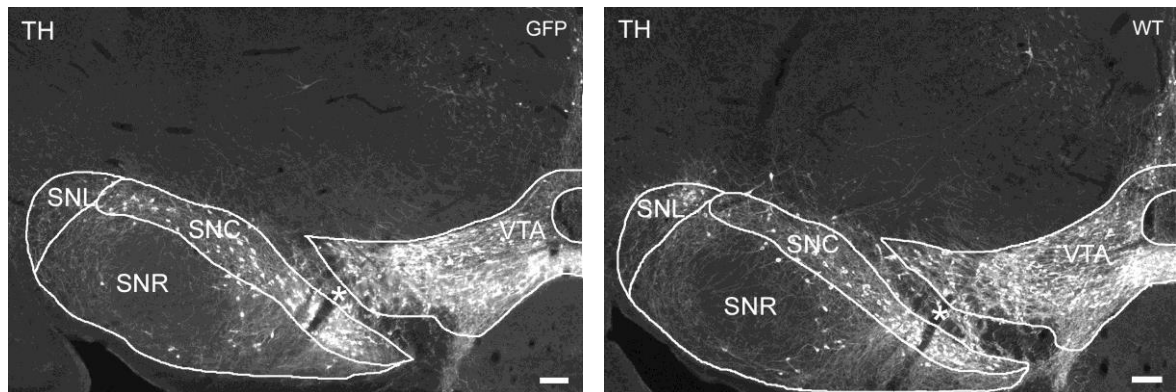


Abb. 18: Aufnahmen der TH-IR Neurone in Substantia nigra und VTA von GFP- und WT-Mäusen

Die Abgrenzungen der Regionen von Substantia nigra und VTA sind mit weißen Linien dargestellt. Abkürzungen: siehe Text; *, Nervus oculomotorius. Skalierungsbalken: 100 μ m.

3.4.3.2. TH-immunoreaktive Fasern in Hippokampus und Amygdala

Die Auswertung des dorsalen und ventralen Hippokampus erfolgte jeweils im Or, Rad und LMol der CA1 und CA3, sowie im Mol und ML des DG (siehe Abb. 20). Für den dorsalen Hippokampus ergab die zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Innersubjektfaktor SCHICHT; Zwischensubjektfaktor GENOTYP) keine signifikanten Interaktionen von SCHICHT x GENOTYP in der CA1 ($F(2; 20)=0,02$; n.s.), jedoch einen signifikanten

3 Ergebnisse

ten Haupteffekt für den Zwischensubjektfaktor GENOTYP in der CA1 ($F(1; 10)=20,85$; $p<0,01$). Die Post-hoc-Analysen zeigten im Or ($T=6,481$; $df=8,422$; $p<0,001$), Rad ($T=2,541$; $df=9,900$; $p<0,05$) und LMol ($T=3,022$; $df=5,953$; $p<0,05$) eine signifikant höhere Faserdichte bei GFP-Mäusen (siehe Abb. 19). Bei der Betrachtung der CA3-Region ergab sich keine signifikante Interaktion von SCHICHT x GENOTYP und kein signifikanter Haupteffekt (n.s., siehe Abb. 28 und Tab. 30). Im DG war eine Signifikanz für den Zwischensubjektfaktor GENOTYP nachweisbar ($F(1; 10)=6,294$; n.s.). Jedoch zeigten die zugehörigen t-Tests nicht-signifikante Ergebnisse (n.s., Abb. 28 und Tab. 30). Ebenso zeigte die Auswertung des ventralen Hippokampus sowie des DG keine signifikanten Interaktionen von SCHICHT x GENOTYP und auch keine signifikanten Haupteffekte. In den vier untersuchten Unterregionen der Amygdala ergab die zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Innersubjektfaktor REGION; Zwischensubjektfaktor GENOTYP) keine signifikanten Interaktionen für REGION x GENOTYP und keinen signifikanten Haupteffekt (n.s., Abb. 28 und Tab. 30).

GFP-Tiere wiesen somit im Vergleich zu WT eine höhere Faserdichte im Or, Rad und LMol der CA1-Region des dorsalen Hippokampus auf (siehe Abb. 19).

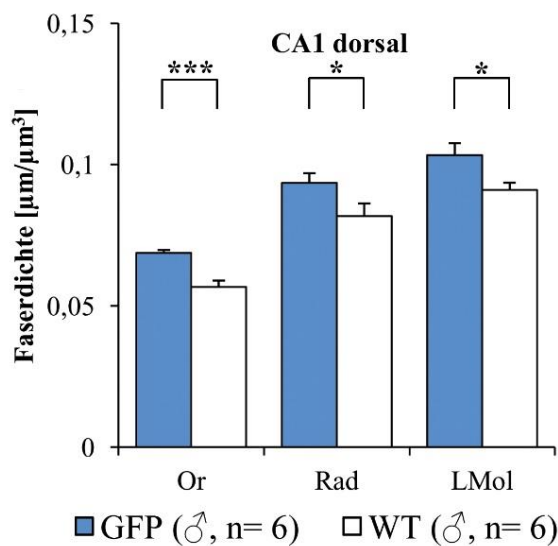


Abb. 19: TH-IR Faserdichten im Hippokampus
Dargestellt sind die Faserdichten [$\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$] der Schichten der CA1 des dorsalen Hippokampus von von GFP- und WT-Mäusen. Angaben in $MW \pm SEM$. Zweifaktorielle ANOVA mit Messwertwiederholung (Innersubjektfaktor SCHICHT (drei Stufen: Or, Rad, LMol) und Zwischensubjektfaktor GENOTYP (zwei Stufen: GFP, WT)). Post-hoc-Test: Welch-Test mit Bonferroni-Holm-Adjustierung. * $p<0,05$; *** $p<0,001$. Abkürzungen: siehe Text.

3 Ergebnisse

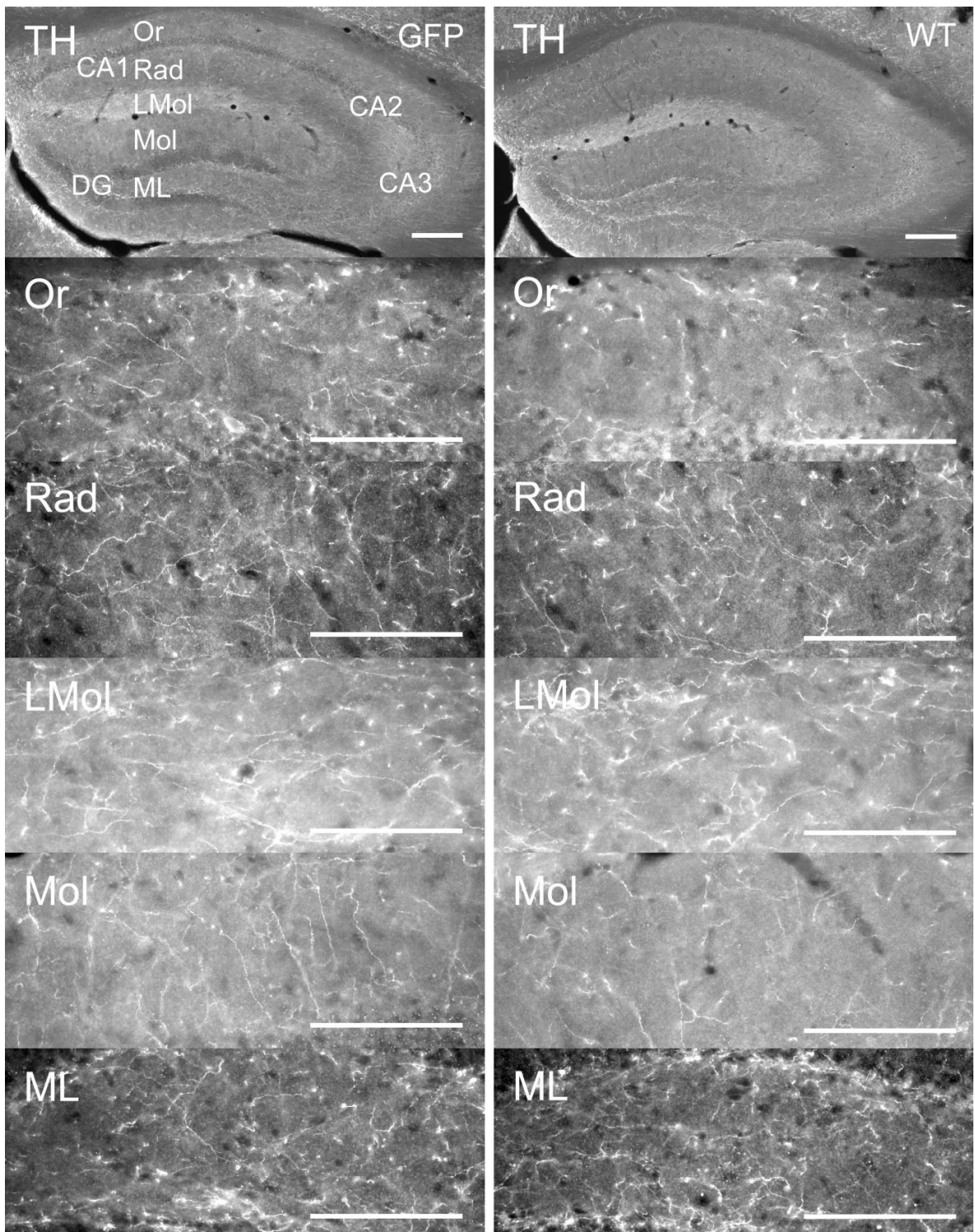


Abb. 20: Aufnahmen der TH-IR Fasern des dorsalen Hippokampus von GFP- und WT-Mäusen

Das jeweils oberste Foto zeigt eine Übersicht der Hippokampusformation der TH-IR Hirnschnitte einer GFP- (linke Säule) und einer WT-Maus (rechte Säule). Die darunterliegenden Fotos zeigen die Schichten der CA1-Region (Or, Rad, LMol) sowie des dorsalen DG (Mol, ML). Abkürzungen: siehe Abb. 17. Die Fotos stammen jeweils von der gleichen Maus. Skalierungsbalken: 100 μ m.

3 Ergebnisse

3.4.4. Serotonerge Marker

3.4.4.1. 5-HT-IR Neurone der Raphekerne

Von den Raphekernen wurden der DR, MnR sowie der PMnR jeweils separat untersucht (siehe Abb. 21 + 22). Für die Zellzahl ergab die zweifaktorielle ANOVA mit Messwertwiederholung (Innersubjektfaktor REGION; Zwischensubjektfaktor GENOTYP) keine signifikanten Interaktionen der Faktoren REGION x GENOTYP und keine Haupteffekte für den Zwischensubjektfaktor GENOTYP (n.s., siehe Tab. 28). Auch die Untersuchungen der Volumina sowie der Dichte ergaben keine signifikanten Interaktionen von REGION x GENOTYP und keinen signifikanten Haupteffekt für den Zwischensubjektfaktor GENOTYP (n.s., siehe Tab. 28). Somit wiesen die untersuchten serotonergen Parameter keine signifikanten Unterschiede zwischen GFP und WT auf (siehe Abb. 29).

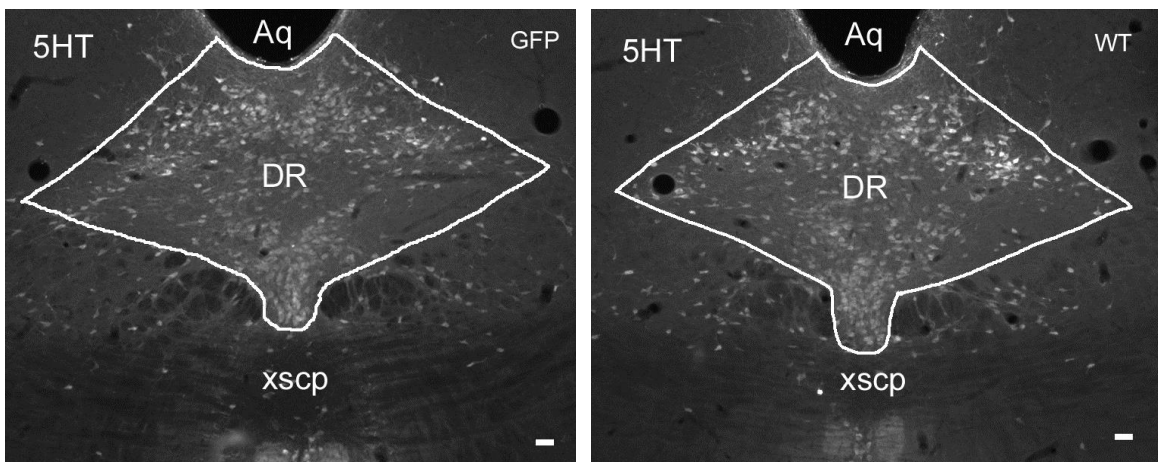


Abb. 21: Aufnahmen der 5-HT-IR Neurone im DR von GFP- und WT-Mäusen

Die Abgrenzungen des DR sind mit weißen Linien dargestellt. Abkürzungen: Aq, Aquädukt; DR, Nucleus raphe dorsalis; xscp, Decussatio des Pedunculus cerebellaris superior. Skalierungsbalken: 100µm.

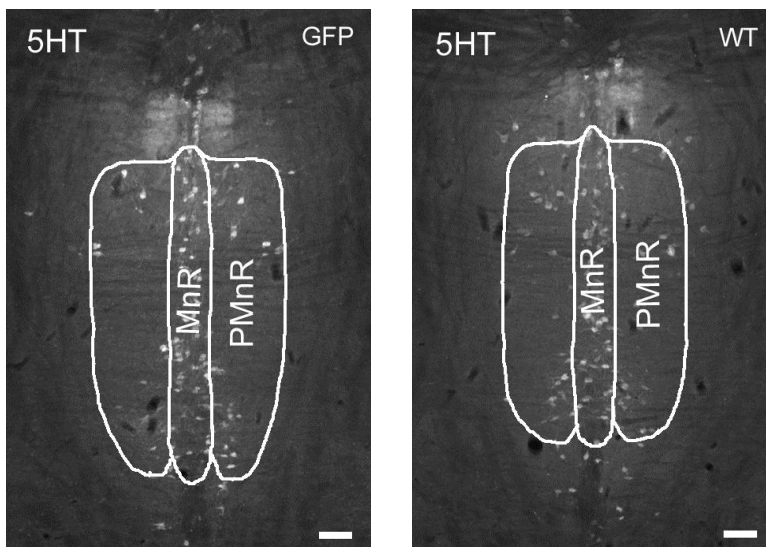


Abb. 22: Aufnahmen der 5-HT-IR Neurone im MnR und PMnR von GFP-Mäusen und WT

Die Abgrenzungen von MnR und PMnR sind mit weißen Linien dargestellt. Abkürzungen: MnR, Nucleus raphe medianus; PMnR, Nucleus raphe paramedianus. Skalierungsbalken: 100µm.

3 Ergebnisse

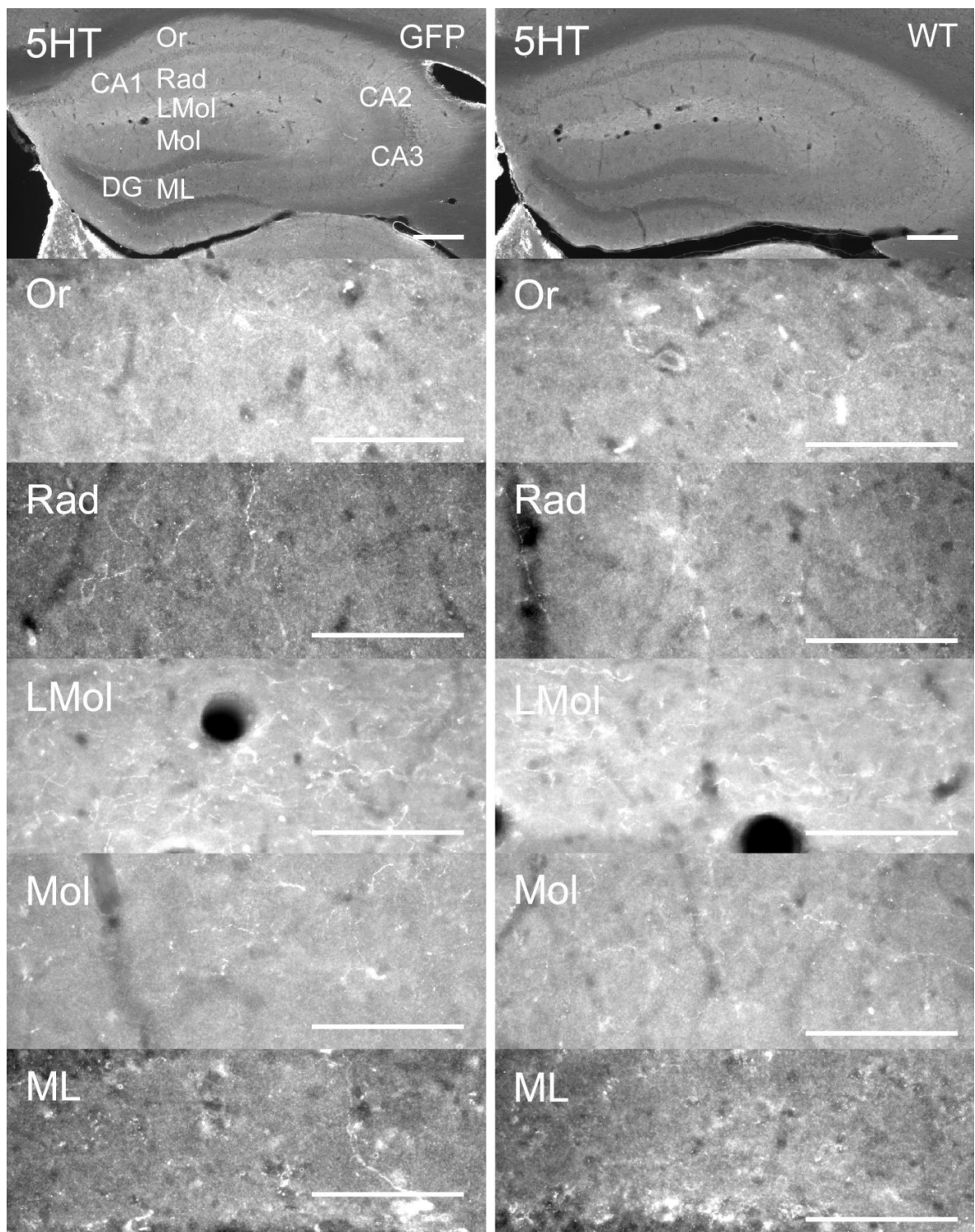


Abb. 23: Aufnahmen der 5-HT-IR Fasern des dorsalen Hippokampus von GFP- und WT-Mäusen

Das jeweils oberste Foto zeigt eine Übersicht der Hippokampusformation der 5-HT-IR Hirnschnitte einer GFP- (linke Säule) und einer WT-Maus (rechte Säule). Die darunterliegenden Fotos zeigen die Schichten der CA1-Region (Or, Rad, LMol) sowie des dorsalen DG (Mol, ML). Abkürzungen: siehe Abb. 17. Die Fotos stammen jeweils von der gleichen Maus. Skalierungsbalken: 100µm

3 Ergebnisse

3.4.4.2. 5-HT-immunoreaktive Fasern in Hippokampus und Amygdala

Zur Bestimmung der Dichte serotonerger Fasern wurden die CA1 und CA3 des dorsalen Hippokampus mit ihren Unterschichten Or, Rad und LMol sowie der DG mit seinen Unterschichten Mol und ML analysiert (siehe Abb. 23). In der CA1-Region des dorsalen Hippokampus konnte die zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Innersubjektfaktor SCHICHT; Zwischensubjektfaktor GENOTYP) keine signifikanten Interaktionen der Faktoren SCHICHT x GENOTYP ($F(1,191; 11,903)=3,251$; n.s.) und ebenso keinen Haupteffekt für GENOTYP zeigen ($F(1; 10)=2,55$; n.s.). Für die dorsale CA3-Region konnten eine signifikante Interaktion von SCHICHT x GENOTYP ($F(1,332; 13,332)=4,340$; $p<0,05$), jedoch kein Haupteffekt ($F(1; 10)=0,11$; n.s.) nachgewiesen werden. Auch in der Analyse des DG zeigten sich keine signifikanten Interaktionen oder Haupteffekte (n.s., siehe Tab. 31). Ebenso zeigte die Auswertung des ventralen Hippokampus sowie des ventralen DG keine signifikanten Interaktionen von SCHICHT x GENOTYP und keine Haupteffekte (n.s., siehe Tab. 31). Für die vier Unterregionen der Amygdala zeigte die zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Innersubjektfaktor REGION; Zwischensubjektfaktor GENOTYP) keine signifikanten Interaktionen für REGION x GENOTYP und keine Haupteffekte (n.s., siehe Tab. 31). Somit konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen GFP-Tieren und WT aufgezeigt werden (siehe Abb. 30).

4. Diskussion

4.1. Einleitung der Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwieweit sich die GAD67-GFP(Δ neo)-Maus (Tamamaki et al., 2003) als ein Tiermodell der Schizophrenie eignet. Durch den Knock-in in einem unter Kontrolle des GAD67-Promotors stehenden Gens der Glutamat-Decarboxylase (GAD) 67 kommt es bei diesem Genotyp zum Verlust eines GAD67-Allels. Dadurch tritt ein ähnliches GABA-Defizit auf, wie es bei schizophrenen Patienten bekannt ist (Wang et al., 2009). Aus diesem Grund wurde die Vermutung aufgestellt, dass die GAD67-GFP(Δ neo)-Maus als Tiermodell der Schizophrenie dienen kann. Für die Interpretation der Ergebnisse ist das Einbeziehen der „Two-hit-Hypothese“ wichtig, welche besagt, dass einem „First hit“ (hier: GAD67-Knock-in mit resultierendem GABA-Mangel) ein „Second hit“ (hier: soziale Isolation) folgt. Somit wird ein durch zunächst ausreichende Kompensationsmechanismen erhaltenes psychisches Gleichgewicht massiv gestört oder gar aufgehoben (Bayer et al., 1999). Im Fokus der vorliegenden Untersuchungen standen dabei die Auswirkungen auf in der Schizophrenie veränderte nachgeschaltete Neurotransmittersysteme. Im Einzelnen wurden das acetylcholinerge, dopaminerge und serotonerge System untersucht. Anhand von Verhaltensversuchen im Offenfeld sollten Veränderungen des Sozialverhaltens, der motorischen Aktivität sowie des Angstverhaltens gezeigt werden. Eine gestörte sensorimotorische Filterfunktion ist bei Patienten mit Schizophrenie bekannt und kann bei Mäusen experimentell durch eine veränderte Präpulsinhibition nachgewiesen werden. Daher fanden entsprechende Versuche ebenfalls statt. Zudem wurden die Tiere auf ihr Verhalten in auswegloser Situation hin im Rahmen des Forced Swim Test untersucht. Anschließend wurden die Hirne bezüglich morphologischer Korrelate analysiert. Die Gesamtbetrachtung der Ergebnisse aller Teilversuche soll nun im Rahmen der Diskussion dieser Arbeit aufzeigen, welchen Stellenwert die GAD67-GFP(Δ neo)-Maus in der heutigen Schizophrenieforschung hat.

4.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

(1.) Im Open Field wurden Tiere beider Genotyps auf Unterschiede im Sozialverhalten, in der motorischen Aktivität sowie im Angstverhalten untersucht. Die GFP-Tiere zeigten dabei ein geringer ausgeprägtes Sozialverhalten als WT. So war die in sozialem Kontakt verbrachte Zeit kürzer und der mittlere Abstand größer. Ebenfalls wurden Geschlechtsunterschiede untersucht. Männliche GFP-Tiere wiesen dabei eine kürzere in freundlichem Kontakt verbrachte Zeit auf als männliche WT. Weibliche Tiere zeigten einen größeren

4 Diskussion

mittleren Abstand zueinander als männliche, zudem selteneres Folgeverhalten oder Beschnüffeln. Bei isolierten Tieren konnten eine höhere passive soziale Interaktion und längere Kontaktzeit sowie durch Beschnüffeln ein größeres Interesse am Versuchspartner beobachtet werden, als bei nicht-isolierten Tieren. Außerdem verbrachten sie mehr Zeit im freundlichen Kontakt, wobei allerdings die Anzahl der aggressiven Kontakte größer war. Weibliche GFP-Tiere zeigten eine niedrigere aktive soziale Interaktion. Im Gegensatz zu nicht-isolierten Weibchen zeigten isolierte weibliche Tiere eine häufigere Kontaktanzahl und eine niedrigere Latenz bis zum ersten Kontakt. Des Weiteren wurde längere Zeit in freundlichem Kontakt zugebracht. Isolierte GFP-Weibchen zeigten jedoch eine höhere Latenz bis zum ersten Kontakt verglichen mit isolierten weiblichen WT. Isolierte Männchen interagierten häufiger miteinander, was sich in vermehrtem Schnüffeln und häufigeren Kontakten zeigte, jedoch auch durch häufigere Aggressivität. Isolierte GFP-Männchen zeigten eine geringere passive soziale Interaktion als isolierte männliche WT. Männliche isolierte GFP-Mäuse wiesen durch eine längere Laufstrecke eine vermehrte motorische Aktivität auf. Weibliche Tiere zeigten ein offenbar stärker ausgeprägtes Angstverhalten durch häufigeren Randaufenthalt. Dieses Verhalten zeigten ebenfalls isolierte im Gegensatz zu nicht-isolierten Weibchen.

(2.) Die Experimente zur Startle-Reaktion bei einem Interpulsintervall von 100ms ergaben weder Unterschiede im Genotyp, noch in der Behandlung. Es zeigten sich allerdings höhere ASR-Werte für männliche Tiere, welche ebenfalls eine höhere PPI als weibliche Tiere aufwiesen. Bei einem Interpulsintervall von 400ms zeigten GFP-Tiere eine niedrigere ASR als WT, sowie männliche eine höhere ASR als weibliche Tiere. Die Haltung in Isolation erbrachte keine Unterschiede. In der PPI konnten ebenfalls keine Unterschiede nachgewiesen werden.

(3.) Der Forced Swim Test zeigte für isolierte und auch nicht-isolierte GFP-Mäuse eine längere Zeit in Immobilität im Vergleich zu WT. In Isolation gehaltene Tiere zeigten eine höhere Latenz bis zum Auftreten von Immobilität.

(4.) Die immunhistochemischen Untersuchungen der ChAT-IR Neurone sowie Faserdichten ergaben keinerlei Unterschiede zwischen GFP- und WT-Mäusen. Ebenso fanden sich keine Unterschiede in der Anzahl TH-IR Neurone beider Genotypen. Lediglich höhere Dichten dopaminerger Fasern im Stratum oriens, radiatum und lacunosum-moleculare der CA1-Region des dorsalen Hippokampus von GFP-Mäusen waren zu beobachten. Die Untersuchung der serotonergen Marker zeigte hingegen keine Unterschiede.

4.3. Versuchstierzahlen

Im Allgemeinen ist bei Verhaltensversuchen mit einer höheren Varianz der Ergebnisse zu rechnen. Dies bedingt die aus verschiedensten Verhaltensstudien bekannten erhöhten Tierzahlen. Mithilfe sogenannter Powertests und aufgrund von Erfahrungen aus vorangegangenen Untersuchungen am Institut für Anatomie zeigte sich, dass die hier für die einzelnen Versuche verwendeten Tierzahlen notwendig waren, um statistisch robuste Ergebnisse zu generieren. So ergaben beispielsweise Powertests für die Untersuchung der PPI unter der Annahme der Berechnung von Varianzanalysen mit messwiederholtem Design (Within-Between Design, acht Gruppen, drei Messungen, Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%, angenommene mittlere Effektstärke von $f=0,2$) bei einer Power von 80% eine notwendige Gesamtstichprobenzahl von $n=88$ und bei einer Power von 95% $n=120$ (G*Power 3.1, Franz Faul, Universität Kiel, Deutschland). Somit sind die Gesamtstichprobenzahlen von insgesamt $n=128$ in den Verhaltensversuchen (PPI: $n=125$) und in den Versuchen zur Morphologie ($n=14$) als notwendig anzusehen.

4.4. Soziale Interaktion im Offenfeld

Mit dem Versuch zur sozialen Interaktion im Offenfeld lassen sich eine von der Norm abweichende lokomotorische Aktivität, sowie ein verändertes Sozial- und angstassoziiertes Verhalten evaluieren (Mohn et al., 1999).

4.4.1. Sozialverhalten im Offenfeld

Das wichtigste Ergebnis des Versuchs ist die signifikant kürzere Kontaktzeit von GFP-Tieren gegenüber WT, was einer geringer ausgeprägten sozialen Interaktion der GFP-Tiere im Vergleich zu WT entspricht. In methodisch abgewandelter Form konnten diese Unterschiede in der sozialen Interaktion auch durch Sandhu und Kollegen gezeigt werden, welche ebenfalls männliche GAD67-GFP(Δ neo)-Mäuse im Vergleich zu Geschwistertieren testeten (Sandhu et al., 2014). Weiterhin wurde in Offenfeldversuchen von Zhang und Mitarbeitern (Zhang et al., 2014) ein herabgesetztes soziales Interesse der GFP-Mäuse gezeigt, zudem eine reduzierte soziale Präferenz zwischen anderen Versuchspartnern und unbekanntem Objekten. Dabei wurde ferner die Vermutung geäußert, dass striatale GABAerge Signalwege eine wichtige Rolle in der Modulation von diesen Verhaltensweisen spielen könnten. Es ist davon auszugehen, dass auch die Dysfunktion GABAerger Interneurone anderer Hirnregionen Einfluss auf das Verhalten hat. Weiterhin interessant ist die Tatsache, dass in dem vorliegenden Versuch die zuvor isolierten Tiere eine stärkere soziale Interaktion zeigten als die nicht-isolierten. Betrachtet man dies vor dem Hintergrund

4 Diskussion

der „Two-hit-Hypothese“, wäre wohl eher ein stärkerer sozialer Rückzug nach der als „Second hit“ zu wertenden Isolation zu erwarten gewesen. Allerdings ist zu bedenken, dass im Offenfeld nicht nur das Interesse bzw. Desinteresse am Versuchspartner das Verhalten beeinflussen, sondern ebenso Neugier, Angst und Furcht vor der neuen, hell erleuchteten Umgebung. Diese Angst lässt möglicherweise soziale Bezüge zum neuen, unbekanntem Versuchspartner unwichtiger werden.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieses Versuchs und anderer Studien die Schlussfolgerung zu, dass GFP-Tiere und WT ein unterschiedliches Sozialverhalten aufweisen. Ein GAD67-Defizit scheint dabei ein reduziertes Sozialverhalten hervorzurufen.

4.4.2. Lokomotorische Aktivität im Offenfeld

Die Untersuchung von GFP-Mäusen und WT zeigte keine signifikanten reinen Genotypenunterschiede in der Lokomotion. Einzig bei männlichen isolierten GFP-Tieren war im Vergleich zu männlichen isolierten WT eine größere Laufstrecke nachweisbar. Somit scheint es durch die soziale Isolation einen Genotypeneffekt bei männlichen Versuchstieren zu geben. Die Isolation als „Second hit“ könnte zur Dekompensation bei bereits vorbestehendem First hit (GAD67-Defizit) führen, was letztlich eine höhere motorische Aktivität bedingt. Die männlichen isolierten GFP-Tiere zeigten auch im Vergleich zu allen anderen untersuchten Gruppen die größte Laufstrecke. Es ist bekannt, dass isolierte Tiere eine allgemein erhöhte motorische Aktivität im Vergleich zu nicht-isolierten Tieren aufweisen (Voikar et al., 2005). Somit wird angenommen, dass eine soziale Isolation als Stressfaktor die höhere motorische Aktivität bedingt. Stress kann bekanntermaßen als „Second hit“ wirken und könnte somit bei männlichen isolierten GFP-Tieren zu einer Verstärkung des Verhaltens auf Basis des „First hits“ führen. Bei weiblichen isolierten GFP-Mäusen und WT war ein derartiger Unterschied in der Lokomotion nicht nachweisbar.

Zusammenfassend zeigte sich in diesem Teilaspekt des Versuchs zur sozialen Interaktion lediglich ein Einfluss des Geschlechts und des „Second hits“ bei vorbestehendem „First hit“.

4.4.3. Angstassoziiertes Verhalten im Offenfeld

Im vorliegenden Versuch konnten vergleichbare Rand- und Zentrumsaufenthalte von GFP-Tieren und WT gezeigt werden, jedoch fanden sich Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren. Weibchen hielten sich häufiger am Rand auf als Männchen, ebenso war dieses Verhalten häufiger bei isolierten als bei nicht-isolierten Weibchen zu beobachten. Isolierte Weibchen scheinen somit ein stärker ausgeprägtes Angstverhalten zu haben als Männchen und nicht-isolierte Weibchen. Crawley stellte fest, dass ein vermehrter Zentrums-

4 Diskussion

aufenthalt ein Indikator für verminderte Angst sei (Crowley, 1999). Logue und Kollegen erklärten eine verminderte Defäkation im Offenfeld ebenfalls mit reduziertem Angstempfinden (Logue et al., 1997). Auch bei schizophrenen Patienten wird bereits vor Ausbruch der Erkrankung eine vermehrte Ängstlichkeit in sozialen Situationen nachgewiesen (Done et al., 1994; Jones et al., 1994). Das GAD67-Defizit hat offenbar jedoch keine Auswirkungen auf die Angst der Tiere. Wie allerdings der Versuch des Forced Swim Test in der vorliegenden Arbeit zeigte, hat das GAD67-Defizit Auswirkungen auf das Verhalten in ausweglosen Situationen (siehe Kap. 4.6.). Die Offenfeldversuche von Heldt und Mitarbeitern, die allerdings Mäuse mit einem lokalen GAD67-Defizit in der Amygdala untersuchten, konnten keine Auswirkungen auf das Angstverhalten der Tiere nachweisen (Heldt et al., 2012). Vermehrtes angstassoziiertes Verhalten als Resultat einer sozialen Isolation wiesen auch Hellemans und Mitarbeiter in ihren Versuchen mit isolierten männlichen Long-Evans-Ratten (WT) nach (Hellemans et al., 2004).

An dieser Stelle zeigte sich zusammenfassend, dass es keinen Genotypenunterschied im Angstverhalten zwischen GFP-Tieren und WT gibt, jedoch das weibliche Geschlecht oder eine vorherige soziale Isolation angstassoziiertes Verhalten fördern.

4.5. Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion

Es ist bekannt, dass an Schizophrenie erkrankte Patienten eine verminderte PPI aufweisen (Koch, 1999; Kohl et al., 2013). Zudem konnte in Post-mortem-Untersuchungen an Hirnen schizophrener Patienten eine verminderte GABA-Konzentration nachgewiesen werden (Guidotti et al., 2000; Duncan et al., 2010; Bakhshi und Chance, 2015). Mit den Versuchen zur PPI wurden GAD67-GFP-Mäuse im Vergleich zu WT im Hinblick auf eine gestörte „sensorimotorische Filterfunktion“ untersucht. Ein PPI-Defizit spricht dabei für eine gestörte Fähigkeit, situationsrelevante Stimuli aus der Umwelt zu filtern und wurde neben der Schizophrenie auch bei Patienten mit anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen nachgewiesen (Braff et. al, 2001; Basta-Kaim et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurden GFP-Mäuse und WT auf Unterschiede in der ASR und PPI bei zwei verschiedenen Interpulsintervallen (IPI) zwischen Präpuls und Schreckreiz untersucht. Dabei zeigte die Untersuchung der ASR und PPI bei einem kurzen IPI von 100ms keinen Genotypenunterschied. Es konnte aber nachgewiesen werden, dass männliche Tiere beider Genotypen im Gegensatz zu weiblichen höhere Werte in der Schreckreaktion (ASR) sowie der PPI haben. Bei einem längeren IPI von 400ms stellte sich heraus, dass GFP-Tiere eine niedrigere ASR als WT haben, jedoch keinen Unterschied in der PPI. Hier zeigten

4 Diskussion

ebenfalls die männlichen Tiere eine höhere ASR als weibliche Tiere. Eine vorherige Isolation der Tiere beeinflusste weder die PPI, noch die ASR.

Das optimale IPI zur Inhibition der Schreckreaktion liegt bei 100-150ms (Blumenthal, 1999). Die Verarbeitung des Präpulses soll dabei die ASR inhibieren, wenn der Präpuls in einem Zeitfenster von 30-500ms vor dem Schreckreiz präsentiert wird. Kürzere (<30ms) und längere (>500ms) IPI führen jedoch zu einer Faszilitierung der Schreckreaktion, damit zu einer höheren ASR (Quednow, 2008) und zu einer Verringerung der PPI (Plappert et al., 2003). Aus Studien an Nagern ist weiterhin bekannt, dass Veränderungen in verschiedenen Transmittersystemen und an Transmitterrezeptoren die PPI beeinflussen können (Jones et al., 2000; Tueting et al., 2006 + 2008). In Abhängigkeit vom beeinflussten Transmittersystem können somit genetische Veränderungen oder pharmakologische Substanzen die PPI bei einem bestimmten IPI beeinflussen (Valsamis und Schmid, 2011). Beispielsweise zeigte sich bei Ratten, dass Scopolamin (ein mAChR-Antagonist) die PPI bei einem IPI von 100-300ms verringert, nicht jedoch bei einem niedrigeren (30ms) oder höheren (1000ms) IPI. Im Gegensatz dazu verringert Apomorphin (ein D₂-Agonist) die PPI bei allen IPI (Jones et al., 2000). Der selektive GABA_B-Antagonist Phaclofen reduziert die PPI nur bei langen IPI (100-500ms), ähnlich wie Scopolamin (Yeomans et al., 2010). Die Wirkungen beider Stoffe addieren sich sogar bei gemeinsamer Applikation, weshalb davon ausgegangen wird, dass der mACh- und der GABA_B-Rezeptor im System unabhängige Wirkungen haben (Yeomans et al., 2010). Phencyclidin (PCP) als NMDA-Rezeptor-Antagonist wiederum erniedrigt die PPI bei einem IPI zwischen 30-300ms (Jones et al., 2000). Da somit cholinerge, dopaminerge, GABAerge und glutamaterge Transmittersysteme die PPI in Abhängigkeit von der Dauer des IPI beeinflussen können, empfahl es sich, die PPI ebenfalls bei unterschiedlichen IPI (100ms und 400ms) zu untersuchen. Weiterhin konnten Vollenweider und Kollegen zeigen, dass die Höhe der PPI abhängig vom IPI über 5-HT-Rezeptoren moduliert werden kann. Psilocybin, ein 5-HT_{1A/2}-Rezeptoragonist, reduziert die PPI bei kurzen (30ms) IPI, hat keinen Effekt bei mittleren (60ms) IPI und erhöht die PPI bei langen (120 und 240ms) IPI (Vollenweider et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich lediglich eine erhöhte PPI männlicher Tiere bei einem IPI von 100ms, jedoch keine PPI-Unterschiede zwischen GFP-Mäusen und WT. Dieses Ergebnis wird teilweise dadurch unterstützt, dass in der vorliegenden Arbeit keine morphologischen Genotypenunterschiede im serotonergen System gefunden wurden.

Der Einfluss des Geschlechts auf die PPI bei einer GABAergen Hypofunktion konnte ebenfalls in anderen Studien gezeigt werden. So untersuchte die Arbeitsgruppe um Basta-Kaim den Effekt einer chronischen pränatalen Lipopolysaccharid (LPS)-Gabe auf immuno-

4 Diskussion

histochemische Veränderungen GAD67-exprimierender Neurone im medialen präfrontalen Kortex und Hippokampus von Ratten (Basta-Kaim et al., 2015). Man fand heraus, dass eine LPS-Gabe in den letzten zwei Schwangerschaftswochen schizophrenieähnliches Verhalten beim Nachwuchs induziert, darunter auch ein PPI-Defizit sowie Beeinträchtigungen in der sozialen Interaktion. Bei weiblichen Tieren wurde dabei eine im Gegensatz zu unbehandelten Tieren herabgesetzte Anzahl GABAerger Neurone im medialen präfrontalen Kortex gefunden. Bei mit LPS behandelten männlichen Tieren konnte dies im Gegensatz zu unbehandelten Tieren im Hippokampus gezeigt werden. Es ließ sich somit auch hier ein Geschlechtsunterschied beobachten. Letztlich führen die GABAergen Defizite allerdings bei beiden Geschlechtern zum PPI-Defizit, sind jedoch auf unterschiedliche Regionen zurückzuführen (Basta-Kaim et al., 2015). Weiterhin untersuchten Heldt und Kollegen Mäuse mit einem Defizit der 65kDa-Isoform der GAD und stellten ebenfalls fest, dass männliche Tiere eine höhere ASR zeigen, wenn auch nur bei höheren Schreckreizintensitäten (Heldt et al., 2004).

Allgemeine Geschlechtsunterschiede in der PPI konnten auch in Studien weiterer Tiermodelle nachgewiesen werden. So findet sich bei normalen männlichen Ratten im Vergleich zu weiblichen Ratten sowohl eine höhere ASR als auch eine höhere PPI (Faraday und Grunberg, 2000; Lehmann et al., 1999). Ebenfalls konnten Logue und Mitarbeiter bei Untersuchungen an Mäusen eine höhere ASR männlicher Tiere gegenüber weiblichen Tieren nachweisen (Logue et al., 1997). Diese Studien zeigen, dass das Ergebnis des vorliegenden Experiments offenbar die physiologischen Geschlechtsunterschiede widerspiegelt.

Die heterozygote Reeler-Maus (HRM; Tueting et al., 1999) weist neben einem Reelin-Defizit ebenfalls einen GAD67-Mangel auf und ist daher zum Teil mit der GAD67-GFP-Maus vergleichbar. Reelin ist ein für die kortikale und hippokampale Neurogenese essentielles Protein, welches in Subpopulationen GABAerger Interneurone synthetisiert wird. Tueting und Kollegen demonstrierten ein PPI-Defizit bei HRM im Vergleich zu WT (Tueting et al., 1999). Andere Arbeitsgruppen zeigten jedoch abweichende Ergebnisse. So fanden Salinger und Kollegen (Salinger et al., 2003) sowie Podhorna und Didriksen (Podhorna und Didriksen, 2004) weder signifikante Unterschiede in der ASR, noch in der PPI zwischen HRM und WT. Diese unterschiedlichen Ergebnisse wurden auf verschiedene Haltungsbedingungen (Isolation bzw. Gruppenhaltung) zurückgeführt (Tueting et al., 2006 + 2008). So konnten Kutiyawalla und Mitarbeiter bei einem IPI von 100ms für männliche, nicht-isolierte HRM eine niedrigere PPI als für WT zeigen (Kutiyawalla et al., 2012). Die Beurteilung der HRM als vergleichbares Tiermodell einer GABAergen Hypofunktion ist

4 Diskussion

daher schwierig, da neben dem zusätzlichen Reelin-Defizit die abweichenden Untersuchungsergebnisse auf unterschiedliche Versuchsdesigns zurückzuführen sind (Tueting et al., 2008).

Eine weitere bedeutende Erkenntnis für den Effekt einer GABAergen Hypofunktion in der Schizophrenie ist die Abhängigkeit der GAD67-Expression von der Methylierung der entsprechenden Promotorregion. Eine Überexpression des verantwortlichen Enzyms DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1) in GABAergen Interneuronen kann somit eine Hypermethylierung und folglich herabgesetzte Expression der GAD67 bedingen. Diese reduzierte Expression wurde bereits für Reelin nachgewiesen und konnte bei Menschen und HRM gleichermaßen gezeigt werden (Tremolizzo et al., 2002; Chen et al., 2002). In GAD67-GFP-Mäusen wurden u.a. erhöhte Konzentrationen von DNMT1 in GABAergen Neuronen des frontalen Kortex sowie Hippokampus gefunden, was dort zur Herabregulierung der GAD67-Synthese führt (Matrisciano et al., 2013). Niedrige GAD67-Konzentrationen in diesen Hirnregionen wurden ebenfalls in Post-mortem-Studien psychiatrischer Patienten beschrieben (Akbarian et al., 1995; Impagnatiello et al., 1998; Guidotti et al., 2000; Duncan et al., 2010). Denselben Methylierungseffekt hat auch die chronische Gabe von L-Methionin, welches über eine Hypermethylierung zur verminderten GAD67-Expression führt (Tremolizzo et al., 2002; Chen et al., 2002). Hierbei konnte bei Wildtyp-Mäusen ein PPI-Defizit nachgewiesen werden, wenngleich dies nur bei Versuchen mit langen Interpulsintervallen von 420ms gelang (Tremolizzo et al., 2002). Eine Korrektur dieser Hypermethylierung am Promotor kann durch die Gabe von Valproat, einem Histon-Deacetylase-Inhibitor, sowie Clozapin, einem atypischen Neuroleptikum mit DNA-Demethylierungsaktivität, erreicht werden (Tremolizzo et al., 2002 + 2005; Dong et al., 2005, Guidotti et al., 2009). Dieser Effekt könnte die Wirkung der genannten Medikamente bei neuropsychiatrischen Erkrankungen erklären.

Weiterhin konnten Matrisciano und Mitarbeiter nachweisen, dass pränataler Stress im Sinne eines „Second hit“ bei Swiss-albino-ND4-Mäusen eine Hypermethylierung begünstigen und so schizophrenieähnliches Verhalten fördern kann (Matrisciano et al., 2013). Bei diesen Mäusen beobachteten sie zudem Defizite in der sozialen Interaktion und der Präpulsinhibition, welche ebenfalls durch die Gabe von Valproat oder Clozapin ausgeglichen werden konnten (Matrisciano et al., 2013). Daraus lässt sich schließen, dass dem schizophrenieähnlichen Verhalten teilweise eine Hypermethylierung zugrunde liegt, da diese durch Valproat und Clozapin aufgehoben wird.

4 Diskussion

In Studien wurde nachgewiesen, dass soziale Isolation während der postnatalen Entwicklung bei Ratten ein PPI-Defizit auslösen kann (Samsom und Wong, 2015). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit weder für GFP-Mäuse, noch für WT gezeigt werden.

Durch diese Ergebnisse zeigt sich, dass sowohl epigenetische Faktoren, medikamentöse Mechanismen und andere Umwelteffekte Einfluss auf die Synthese und Funktion der GAD67 haben. Im weiteren Sinne können diese daher auch die Genese schizophrenie-typischen Verhaltens fördern. Allerdings bleibt aufgrund der vielseitigen Einflüsse und Versuchsdesigns ein Vergleich der Studien untereinander schwierig. Ein Einfluss der GAD67-Expression auf die Entwicklung schizophrenieähnlichen Verhaltens scheint aber sicher (Lewis et al., 2005). Die Bewertung des GAD67-GFP-Genotyps fällt jedoch aufgrund der mangelnden Studienlage zu GAD67-GFP-Mäusen und der eingeschränkten Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Studien schwer. Daher soll das Ergebnis der vorliegenden Arbeit als Ausgangspunkt für weitere Versuche dienen. Eine vorherige soziale Isolation hatte keinen Effekt auf die Versuchsergebnisse, der Genotyp und das Geschlecht lediglich in Teilen.

Zusammenfassend lassen die in diesen Experimenten gewonnenen Teilergebnisse zur Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion jedoch keinen eindeutigen Schluss zu, die GAD67-GFP-Maus als Modell zur Untersuchung des sensorimotorischen Gatings in der Schizophrenie etablieren zu können. Weitere Studien sind hier nötig.

4.6. Forced Swim Test

Als Erstbeschreiber dieses Tests gilt Porsolt, der ihn als Test zur Untersuchung neuer Antidepressiva etablierte (Porsolt et al., 1977). Der Test wurde ferner dazu weiterentwickelt, um Tiermodelle der Depression zu untersuchen. Entscheidend dafür sind die Antriebshemmung sowie der verminderte Lebenswille depressiver Patienten (siehe Kap. 1.2.2). Im Versuch zeigten sowohl isolierte als auch nicht-isolierte GFP-Tiere eine längere in Immobilität verbrachte Zeit verglichen mit WT. Somit scheint dieser Genotypenunterschied unabhängig von einer vorherigen sozialen Isolation zu sein. Interessanterweise war bei isolierten GFP-Mäusen und WT eine höhere Latenz bis zum Auftreten der ersten Immobilitätsphase zu beobachten. Das Ergebnis lässt somit die Schlussfolgerung zu, dass ein GABAerges Defizit depressives Verhalten modulieren könnte. Dies wurde auch von Lappalainen und Kollegen beschrieben, die Mutationen des GAD67-Enzyms analysierten (Lappalainen et al., 2004). Sie schlussfolgerten allerdings, dass das GAD67-Gen kein Hauptlocus für eine Prädisposition zur Erkrankung an Depression ist. Vorherige Studien konnten zeigen, dass die Gabe von GABA-Agonisten depressivem Verhalten vorbeugen

4 Diskussion

kann, ebenso konnte die Behandlung mit GABA-Antagonisten depressives Verhalten hervorrufen (Sherman und Petty, 1980; Petty und Sherman, 1981). Wenngleich im vorliegenden Versuch eine vorherige soziale Isolation der Tiere keinen Einfluss auf das Verhalten im Forced Swim Test hatte, ist doch aus der Schizophrenieforschung bekannt, dass soziale Isolation mit der Entstehung von depressivem Verhalten bei Patienten mit Schizophrenie assoziiert ist (Samson et al., 2015). So zeigte auch der Versuch zur sozialen Interaktion in der vorliegenden Arbeit, dass isolierte männliche GFP-Tiere eine signifikant geringere passive soziale Interaktion hatten als isolierte männliche WT. Isolierte weibliche GFP-Tiere wiesen eine höhere Latenz bis zum ersten Kontakt im Vergleich zu isolierten weiblichen WT auf. Geht man nun von einer eher depressiven Tendenz der GAD67-GFP-Mäuse aus, stützen sich diese Ergebnisse und die von Samson und Kollegen gegenseitig. Verschiedene Klassen von Antidepressiva vermindern die Zeit in Immobilität während eines Forced Swim Tests. So ist bekannt, dass Medikamente, welche die noradrenerge Neurotransmission beeinflussen (z.B. Imipramin), die Zeit des Kletterns am Rand des Becherglases erhöhen. Medikamente, die hingegen die serotonerge Neurotransmission beeinflussen (z.B. Fluoxetin, Sertralin, Paroxetin, Citalopram), erhöhen die in Mobilität verbrachte Zeit (Abelaira et al., 2013; Castagne et al., 2011) und die Latenz bis zur ersten Immobilitätsphase der Tiere (Castagne et al., 2011). Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Tiere, die frühzeitig von der Mutter getrennt wurden (maternale Separation), im FST eine erhöhte Immobilität aufwiesen (Reus et al., 2011).

Zusammenfassend zeigten GFP-Tiere im Vergleich zu WT ein stärkeres depressives Verhalten, welches unabhängig von einer vorherigen Isolation oder dem Geschlecht war. Somit bedingt das zugrundeliegende GABAerge Defizit offenbar ein depressives Verhalten. Dennoch ist der Einfluss anderer Neurotransmitter wie des Serotonins nicht zu vernachlässigen (Castagne et al., 2011). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die GAD67-GFP-Maus eher einem Depressionsmodell, als einem generellen Modell der Schizophrenie, dienen könnte. Gewiss sind jedoch weitere Tests nötig, um diese Schlussfolgerung zu untermauern.

4.7. Neuromorphologie

4.7.1. Synapsen auf GABAergen Neuronen im Hippokampus

Im Anschluss an die Verhaltensversuche wurden die Hirne von GFP-Tieren und WT hinsichtlich morphologischer Unterschiede untersucht. Durch die zunächst durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen konnte auf morphologischer Ebene gezeigt werden, dass sowohl cholinerge, dopaminerge als auch serotonerge Nervenfasern Synapsen auf GABAergen Neuronen im dorsalen Hippokampus haben. Dies zeigte den Einfluss der drei

4 Diskussion

Transmittersysteme auf das GABAerge System, wie er in der Erforschung der Schizophrenie postuliert wird (Raedler et al., 2007). Einschränkend muss jedoch angemerkt werden, dass damit lediglich der Einfluss in eine Richtung, nämlich auf das GABAerge System, gezeigt werden konnte, nicht jedoch vom GABAergen System ausgehend auf andere nachgeschaltete Transmittersysteme. Immerhin sind Synapsen an GABAergen Neuronen im dorsalen Hippokampus als Afferenzen dieser Neurone zu werten. Efferenzen in Form von GABAergen Axonen wurden in diesem Versuch jedoch nicht direkt untersucht.

4.7.2. ChAT-IR Neurone und Nervenfasern

Die Analysen cholinergischer Ursprungsregionen und Nervenfasern ergaben keinerlei Unterschiede. Post-mortem-Untersuchungen am menschlichen Gehirn konnten bereits einen Einfluss muskarinergischer ACh-Rezeptoren bei der Genese der Schizophrenie zeigen (Carruthers et al., 2015). So wurde ein Defizit der M1- und M4-Subtypen unter anderem im Hippokampus schizophrener Patienten nachgewiesen (Crook et al., 2000; Scarr et al., 2007). Ferner konnte in Versuchen gezeigt werden, dass beim Gesunden durch die Gabe von Muskarin-Antagonisten schizophrenieähnliche Effekte ausgelöst werden können (Clarke et al., 2004). Ein Absetzen dieser bzw. die Gabe von Acetylcholinesterase-Inhibitoren führte hingegen zum Sistieren der Symptomatik (Göpel et al., 2002). Ebenso konnte post-mortem eine verminderte Expression des nikotinergen $\alpha 7$ -ACh-Rezeptors im Hippokampus schizophrener Patienten nachgewiesen werden (Martin-Ruiz et al., 2003; Marutle et al., 2001). Eine Bewertung der GAD67-GFP(Δ neo)-Maus als Tiermodell der Schizophrenie unter dem Aspekt des Neurotransmitters Acetylcholin bleibt mit den hier gewonnenen Daten jedoch weiterhin schwierig, da ein Vergleich mit ähnlichen Studien aufgrund der Datenlage derzeit nicht möglich scheint. Andere Studien konzentrieren sich auf funktionelle Untersuchungen, wohingegen diese Arbeit sich auf die Morphologie beschränkt.

Insgesamt konnten bei den hier durchgeführten Untersuchungen keine schizophrenietypischen morphologischen Veränderungen des cholinergen Systems bei GAD67-GFP-Mäusen nachgewiesen werden. Andererseits wurden Bereiche mit einer hohen cholinergen Innervation wie der präfrontale Kortex (PFC), in dem beim Menschen deutliche Veränderungen gefunden wurden (Dean et al., 2002; Gibbons et al., 2013), nicht untersucht. Hier wären weitere Studien notwendig, um diese Areale auszuwerten.

4.7.3. Tyrosinhydroxylase-IR Neurone und Nervenfasern

Die dopaminergen Ursprungsregionen der nigrostriatalen und mesolimbischen Signalwege in der Substantia nigra und VTA wiesen keine signifikanten Unterschiede in Neuronenzahl,

4 Diskussion

Volumen und Neuronendichte auf. Unterschiede ergaben sich allerdings im für die Gedächtnisbildung wichtigen dorsalen Hippokampus, wonach GFP-Mäuse höhere TH-IR Faserdichten im Stratum oriens, radiatum und lacunosum-moleculare der CA1-Region aufwiesen. Die Faserdichten im ventralen Hippokampus und in der Amygdala unterschieden sich hingegen nicht.

Das hier zum Nachweis von dopaminergen Neuronen verwendete Enzym Tyrosinhydroxylase (TH) ist das Schlüsselenzym der Katecholaminsynthese und somit auch in noradrenergen (NA) Neuronen des sympathischen Nervensystems nachweisbar. NA wird durch die Dopamin- β -Hydroxylase (DBH) aus Dopamin synthetisiert. Daher ist eine Differenzierung von dopaminergen und noradrenergen Neuronen ohne Kenntnis ihrer Lokalisation nicht möglich. Für Fasern gilt dies jedoch nicht, da TH in Studien fast ausschließlich in Axonen dopaminergener Neurone anfärbbar ist (Pickel et al., 1975; Hökfelt et al., 1977), wohingegen mit DBH markierte Fasern nur selten oder gar nicht doppelt mit TH angefärbt werden (Lewis et al., 1987; Asan, 1993). Thoenen und Mitarbeiter konnten zudem einen sehr schnellen axonalen Transport von TH in sympathischen Fasern zeigen (Thoenen et al., 1973), weshalb die TH-Konzentration in dopaminergen Fortsätzen 10fach höher ist als in noradrenergen (Schmidt und Bhatnagar, 1979). Diese Erkenntnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei TH-IR markierten Fasern mit hoher Wahrscheinlichkeit um Fasern dopaminergen Ursprungs handelt. Die höhere dopaminerge Faserdichte in der CA1-Region des dorsalen Hippokampus bei GFP-Mäusen dieser Arbeit lässt Parallelen zum Modell von Lisman und Otmakhova zu (Lisman und Otmakhova, 2001), welches postuliert, dass für die Symptomatik der Schizophrenie neben einem NMDA-Rezeptor-Defizit auch ein hyperdopaminerges Status der CA1-Region des Hippokampus verantwortlich sei. Dabei führe die dopaminerge Hyperaktivität zur Inhibition der hippokampalen Afferenzen aus dem Tractus perforans zur CA1-Region, was wiederum die Funktion der CA1-Region behindern würde. Der CA1-Region wird in diesem Modell zugeschrieben, Neues wahrzunehmen, die CA3-Region hingegen speichere Informationen dauerhaft und erhalte sie zusammen mit dem DG als Puffer in einer aktiven Form. Ist nun die CA1-Region in ihrer Funktion behindert, werden vermehrt alte Gedächtnisinhalte über die CA3/DG-Region präsentiert. Zugleich gibt es aber aktuelle sensorische Reize von außen, welche zur Ausbildung falscher Gedankeninhalte und schließlich zu Illusionen und Halluzinationen führen können (Lisman und Otmakhova, 2001). Auch die Dopamin-Hypothese zur Entstehung der Schizophrenie (siehe Kap. 1.3.1.2.) postuliert eine dopaminerge Hyperaktivität im mesolimbischen System, welche eine Positivsymptomatik zur Folge hat (Jentsch und Roth, 1999). Dass Dopamin in der Genese der Schizophrenie eine wichtige

4 Diskussion

Rolle einzunehmen scheint, zeigen ebenfalls Erkenntnisse aus der pharmakologischen Therapie der Erkrankung beim Menschen. Viele antipsychotische Medikamente binden am D₂-Rezeptor und blockieren ihn somit (Miyamoto et al., 2005). Indirekte DA-Agonisten hingegen, beispielsweise Amphetamin, können beim Gesunden Psychosen induzieren, wobei Patienten mit Schizophrenie sensitiver für DA-freisetzende Effekte des Amphetamins sind (Laruelle und Abi-Dargham, 1999; Abi-Dargham, 2004). Es wird angenommen, dass eine hyperdopaminerge Stoffwechsellage vor allem in der CA1-Region Verhaltensänderungen und kognitive Einschränkungen, wie sie bei an Schizophrenie erkrankten Patienten gefunden wurden, verursacht (Lisman und Otmakhova, 2001).

Zusammenfassend zeigten GFP-Mäuse eine höhere dopaminerge Faserdichte in der CA1 des dorsalen Hippokampus, was mit dem Knock-in im GAD67-Gen und einer damit verbundenen GABAergen Dysfunktion einhergeht. Jedoch bleibt dabei unklar, ob das GABA-Defizit direkt eine dopaminerge Hyperaktivität verursacht, diese somit als Anpassung entsteht, oder ob auch Veränderungen im dopaminergen System sekundär auf die Funktion GABAerger Neurone einwirken können. Daher werden an dieser Stelle noch weitere Studien nötig sein, um einen genaueren Bezug zum GABAergen Defizit herstellen zu können.

4.7.4. 5-HT-IR Neurone und Nervenfasern

In der Literatur werden Störungen im serotonergen System im Zusammenhang mit einer erhöhten Vulnerabilität zur Entstehung psychiatrischer Erkrankungen gesehen (Roth et al., 2009). Die morphologischen Studien der vorliegenden Arbeit konnten jedoch keinerlei signifikante Unterschiede zwischen GFP-Tieren und WT nachweisen.

Dass das serotonerge System eine große Bedeutung bei der Genese psychiatrischer Erkrankungen hat, zeigte auch die über Serotoninrezeptoren vermittelte antipsychotische Wirkung atypischer Neuroleptika (Hoyer, 1988; Meltzer et al., 1989). Zudem ist Serotonin ein wichtiger trophischer Faktor. So führt ein Mangel in der Perinatalzeit zu einer unzureichenden Proliferation von Neuronen sowie einer herabgesetzten Dichte dendritischer Spines (Azmitia und Whitaker-Azmitia, 1995). Im adulten Gehirn ist Serotonin ebenfalls essentiell für die Erhaltung einer normalen Hirnfunktion. Es beeinflusst die Formierung und Degradation von Synapsen und Axonterminalen (Sodhi und Sanders-Bush, 2004). Yasuno und Kollegen konnten bei PET (Positronen-Emissions-Tomographie)-Untersuchungen am menschlichen Gehirn nachweisen, dass in der Amygdala von Patienten mit Schizophrenie eine signifikant niedrigere Konzentration des Serotonin-Rezeptors (5-HT-1_A-Rezeptor) vorherrscht (Yasuno et al., 2004). Sie erklärten mit dieser Erkenntnis die affektiven Komponenten der Schizophrenie mit ihrer Negativsymptomatik bzw. damit einhergehender

4 Diskussion

Angst und Depression. Jedoch ist zu bedenken, dass die dort untersuchten Patienten teilweise auf antipsychotische Medikamente eingestellt waren, was bisher nicht vollständig bekannte Veränderungen der Neurotransmitter-Homöostase im Gehirn bewirken kann. Die Mäuse in der vorliegenden Arbeit hingegen waren keiner Medikation ausgesetzt. Zudem ist ein Vergleich von Ergebnissen, die aus einer PET-Untersuchung resultieren und solchen, die mit einem immunhistochemischen Nachweis gewonnen wurden, nicht uneingeschränkt möglich. Außerdem ist es sehr schwierig, Rückschlüsse von 5-HT-positiven Fasern auf 5-HT-Rezeptoren und umgekehrt zu ziehen, zumal unterschiedliche Rezeptordichten auch durch unterschiedliche Innervation reaktiv bedingt sein könnten.

Zusammenfassend konnten hier keinerlei morphologische Unterschiede im serotonergen System von GFP-Mäusen und WT nachgewiesen werden. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit vorherigen Studien ist schwierig, da die Studienlage zu GAD67-GFP(Δ neo)-Mäusen derzeit noch rar ist, was die Beurteilung als Tiermodell bezüglich serotonerger Veränderungen deutlich erschwert.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersucht die GAD67-GFP(Δ neo)-Maus im Vergleich zu Kontrolltieren (WT) im Hinblick auf ihre Eignung als Tiermodell der Schizophrenie. Hierzu wurden Verhaltensversuche sowie morphologische Untersuchungen durchgeführt.

Es zeigte sich eine geringere soziale Interaktion von GFP-Tieren gegenüber WT im Offenfeld. Zuvor isolierte Tiere hatten eine stärkere soziale Interaktion als nicht-isolierte. Männliche isolierte GFP-Tiere waren motorisch aktiver als andere Versuchstiergruppen. So bedingen sowohl der Genotyp, als auch das Geschlecht und die Behandlung Unterschiede im lokomotorischen Verhalten. Jedoch war kein Genotypenunterschied im Angstverhalten zwischen GFP-Mäusen und WT nachzuweisen. Allerdings zeigten isolierte Weibchen ein stärker ausgeprägtes Angstverhalten als nicht-isolierte Weibchen und als Männchen. Bei einem kurzen IPI von 100ms zeigten männliche Tiere im Gegensatz zu weiblichen höhere Werte in der ASR sowie der PPI. Bei einem längeren IPI von 400ms stellte sich heraus, dass GFP-Mäuse eine niedrigere ASR als WT und männliche eine höhere ASR als weibliche Tiere aufwiesen. Im FST zeigten GFP-Tiere ein stärkeres depressives Verhalten im Vergleich zu WT, welches unabhängig von einer vorherigen Isolation war. Es konnte gezeigt werden, dass cholinerge, dopaminerge und serotonerge Transmittersysteme Einfluss auf das GABAerge System haben. Im Gegensatz zu WT hatten GFP-Mäuse höhere dopaminerge Faserdichten im Stratum oriens, radiatum und lacunosum-moleculare der CA1-Region des dorsalen Hippokampus. In den anderen untersuchten dopaminergen Regionen fanden sich keine Unterschiede zwischen GFP-Mäusen und WT. Im cholinergen und serotonergen System waren ebenfalls keinerlei Unterschiede zwischen GFP-Mäusen und WT nachweisbar.

Zusammenfassend ließen die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen kaum Verbindungen zur Schizophrenie zu. Die Verhaltensversuche wiesen allerdings durchaus Parallelen zum Verhalten schizophrener Patienten auf. So konnten eine geringere soziale Interaktion und ein stärkeres depressives Verhalten der GFP-Tiere gezeigt werden. Beides wird unter Negativsymptomatik im Rahmen einer Schizophrenie beschrieben. Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass die GAD67-GFP(Δ neo)-Maus kein uneingeschränktes Modell der Schizophrenie ist. Jedoch lässt sich aus den hier erbrachten Ergebnissen der Wert der Maus als Tiermodell für depressive Verstimmung als Negativsymptom der Schizophrenie oder als Modell für Depression ableiten. Hierzu sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig. Die Maus dient jedoch sicher als ein Grundlagenmodell zur Untersuchung des GABAergen Systems.

6. Anhang

6.1. Literaturverzeichnis

- (1) Abdolmaleky, HM; Nohesara, S; Ghadirivasfi, M; Lambert, AW; Ahmadkhaniha, H; Ozturk, S et al.: DNA hypermethylation of serotonin transporter gene promoter in drug naïve patients with schizophrenia. *Schizophr. Res.* 152. 373–380 (2014).
- (2) Abelaira, HM; Réus, GZ; Quevedo, J: Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev Bras Psiquiatr* 35 Suppl 2. 112-20 (2013).
- (3) Abercrombie, M: Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.* 94. 239–247 (1946).
- (4) Abi-Dargham, A; Laruelle, M; Aghajanian, GK; Charney, D; Krystal, J: The role of serotonin in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9. 1–17 (1997).
- (5) Abi-Dargham, A: Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *Int J Neuropsychopharmacol* 7 Suppl 1. 1-5 (2004).
- (6) Adell, A; Myers, RD: Selective destruction of midbrain raphe nuclei by 5,7-DHT: is brain 5-HT involved in alcohol drinking in Sprague-Dawley rats? *Brain Res.* 693. 70–79 (1995).
- (7) Akbarian, S; Kim, JJ; Potkin, SG; Hagman, JO; Tafazzoli, A; Bunney, WE; Jones, EG: Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch. Gen. Psychiatry* 52. 258–266 (1995).
- (8) Aleman, A; Kahn, RS: Strange feelings: do amygdala abnormalities dysregulate the emotional brain in schizophrenia? *Prog. Neurobiol.* 77. 283–298 (2005).
- (9) Amaral, DG; Insausti, R: Retrograde transport of D-[3H]-aspartate injected into the monkey amygdaloid complex. *Exp Brain Res* 88. 375–388 (1992).
- (10) Amaral, DG; Witter, MP: The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience* 31. 571–591 (1989).
- (11) Amaral, DG; Scharfman, HE; Lavenex, P: The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog. Brain Res.* 163. 3–22 (2007).
- (12) Andersen, P; Bliss, TV; Lomo, T; Olsen, LI; Skrede, KK: Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol. Scand.* 76. 4A-5A (1969).
- (13) Andreasen, NC: The diagnosis of schizophrenia. *Schizophr Bull* 13. 9–22 (1987).
- (14) Andreasen, NC; Flaum, M; Schultz, S; Duzyurek, S; Miller, D: Diagnosis, methodology and subtypes of schizophrenia. *Neuropsychobiology* 35. 61–63 (1997).
- (15) Andressen, C; Blümcke, I; Celio, MR: Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res.* 271. 181–208 (1993).

6 Anhang

- (16) Asan, E: Comparative single and double immunolabelling with antisera against catecholamine biosynthetic enzymes: criteria for the identification of dopaminergic, noradrenergic and adrenergic structures in selected rat brain areas. *Histochemistry* 99. 427–442 (1993).
- (17) Azmitia, EC; Whitaker-Azmitia, PM: Anatomy. Cell Biology and Maturation of the Serotonergic System: Neuropsychopharmacological Implications for the Actions of Psychotropic Drugs. In: Bloom, FE; Kupfer, DJ (Hrsg.): *Psychopharmacology – The fourth generation of progress*. Raven Press Ltd., New York. 443-449 (1995).
- (18) Azmitia, EC; Segal, M: An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 179. 641–667 (1978).
- (19) Bakhshi, K; Chance, SA: The neuropathology of schizophrenia: A selective review of past studies and emerging themes in brain structure and cytoarchitecture. *Neuroscience* 303. 82–102 (2015).
- (20) Basta-Kaim, A; Fijał, K; Ślusarczyk, J; Trojan, E; Głombik, K; Budziszewska, B et al.: Prenatal administration of lipopolysaccharide induces sex-dependent changes in glutamic acid decarboxylase and parvalbumin in the adult rat brain. *Neuroscience* 287. 78–92 (2015).
- (21) Bayer, TA; Falkai, P; Maier, W: Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: the basis of the "two hit hypothesis". *J Psychiatr Res* 33. 543–548 (1999).
- (22) Benes, FM; Berretta, S: GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 25. 1–27 (2001).
- (23) Benes, FM; Kwok, EW; Vincent, SL; Todtenkopf, MS: A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic depressives. *Biol. Psychiatry* 44. 88–97 (1998).
- (24) Benes, FM: Amygdalocortical circuitry in schizophrenia: from circuits to molecules. *Neuropsychopharmacology* 35. 239–257 (2010).
- (25) Berger, M; Hecht, H; Al-Shajlawi, A: *Psychische Erkrankungen. Klinik und Therapie; unter systematischer Berücksichtigung von Übersichtsarbeiten der Cochrane-Collaboration und des Centre for Reviews and Dissemination; mit 296 Tabellen.* 2., vollst. neu bearb. und erw. Aufl. Elsevier Urban & Fischer. München (2004).
- (26) Bitanhirwe, B K Y; Lim, MP; Kelley, JF; Kaneko, T; Woo, T U W: Glutamatergic deficits and parvalbumin-containing inhibitory neurons in the prefrontal cortex in schizophrenia. *BMC Psychiatry* 9. 71 (2009).
- (27) Björklund, A; Dunnett, SB: Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30. 194–202 (2007).
- (28) Bleuler, E: *Dementia praecox oder die Gruppe der Schizophrenien.* Handbuch der Psychiatrie Spezieller Teil. Deuticke. Leipzig (1911).

6 Anhang

- (29) Blumenthal, TD. Short Lead Interval Startle Modification. In ME Dawson, AM Schell & AH Bçhmelt (Eds.), *Startle Modification. Implications for Neuroscience, Cognitive Sciences, and Clinical Science*. Cambridge: Cambridge University Press. 51-71 (1999).
- (30) Bogerts, B: Neurobiologie Psychischer Störungen: Schizophrene Störungen. In: Holsboer, F; Gründer, G; Benkert, O (Hrsg.): *Handbuch der Psychopharmakotherapie*, Springer Verl. 260-273 (2008).
- (31) Bogerts, B: The neuropathology of schizophrenic diseases: historical aspects and present knowledge. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249 Suppl 4. 2–13 (1999).
- (32) Bormann, J: The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 21. 16–19 (2000).
- (33) Braff, DL; Geyer, MA; Swerdlow, NR: Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl.)* 156. 234–258 (2001).
- (34) Braus, DF; Brassens, S (Hg.): *Schizophrenie. Bildgebung - Neurobiologie - Pharmakotherapie; mit 39 Tabellen* (2005).
- (35) Brown, AS: The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog. Neurobiol.* 93. 23–58 (2011).
- (36) Burnet, PW; Eastwood, SL; Harrison, PJ: [3H]WAY-100635 for 5-HT1A receptor autoradiography in human brain: a comparison with [3H]8-OH-DPAT and demonstration of increased binding in the frontal cortex in schizophrenia. *Neurochem. Int.* 30. 565–574 (1997).
- (37) Cantor-Graae, E: The contribution of social factors to the development of schizophrenia: a review of recent findings. *Can J Psychiatry* 52. 277–286 (2007).
- (38) Carlsson, A; Waters, N; Carlsson, ML: Neurotransmitter interactions in schizophrenia--therapeutic implications. *Biol. Psychiatry* 46. 1388–1395 (1999).
- (39) Carlsson, A; Waters, N; Holm-Waters, S; Tedroff, J; Nilsson, M; Carlsson, ML: Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41. 237–260 (2001).
- (40) Carruthers, SP; Gurvich, CT; Rossell, SL: The muscarinic system, cognition and schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 55. 393–402 (2015).
- (41) Castagné, V; Moser, P; Roux, S; Porsolt, RD: Rodent models of depression: forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci Chapter 8. Unit 8.10A* (2011).
- (42) Chen, Y; Sharma, RP; Costa, RH; Costa, E; Grayson, DR: On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. *Nucleic Acids Res.* 30. 2930–2939 (2002).
- (43) Chouinard, G; Annable, L; Mercier, P; Turnier, L: Long-term effects of L-dopa and procyclidine on neuroleptic-induced extrapyramidal and schizophrenic symptoms. *Psychopharmacol Bull* 23. 221–226 (1987).

6 Anhang

- (44) Clarke, LA; Cassidy, CW; Catalano, G; Catalano, MC; Carroll, KM: Psychosis induced by smoking cessation clinic administered anticholinergic overload. *Ann Clin Psychiatry* 16. 171–175 (2004).
- (45) Cobb, SR; Bulters, DO; Suchak, S; Riedel, G; Morris, RG; Davies, CH: Activation of nicotinic acetylcholine receptors patterns network activity in the rodent hippocampus. *J Physiol (Lond)* 518. 131–140 (1999).
- (46) Comery, TA; Shah, R; Greenough, WT: Differential Rearing Alters Spine Density on Medium-Sized Spiny Neurons in the Rat Corpus Striatum: Evidence for Association of Morphological Plasticity with Early Response Gene Expression. *Neurobiology of Learning and Memory* 63. 217–219 (1995).
- (47) Comery, TA; Stamoudis, CX; Irwin, SA; Greenough, WT: Increased Density of Multiple-Head Dendritic Spines on Medium-Sized Spiny Neurons of the Striatum in Rats Reared in a Complex Environment. *Neurobiology of Learning and Memory* 66. 93–96 (1996).
- (48) Cooper, JR; Bloom, FE; Roth, RH: *The biochemical basis of neuropharmacology*. 7. ed. Oxford Univ. Press. New York (1996).
- (49) Crawley, JN: Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res.* 835. 18–26 (1999).
- (50) Crook, JM; Dean, B; Pavey, G; Copolov, D: The binding of [3H]AF-DX 384 is reduced in the caudate-putamen of subjects with schizophrenia. *Life Sci.* 64. 1761–1771 (1999).
- (51) Crook, JM; Tomaskovic-Crook, E; Copolov, DL; Dean, B: Decreased muscarinic receptor binding in subjects with schizophrenia: a study of the human hippocampal formation. *Biol. Psychiatry* 48. 381–388 (2000).
- (52) Crook, JM; Tomaskovic-Crook, E; Copolov, DL; Dean, B: Low muscarinic receptor binding in prefrontal cortex from subjects with schizophrenia: a study of Brodmann's areas 8, 9, 10, and 46 and the effects of neuroleptic drug treatment. *Am J Psychiatry* 158. 918–925 (2001).
- (53) Crow, TJ: Positive and negative schizophrenic symptoms and the role of dopamine. *Br J Psychiatry* 137. 383–386 (1980).
- (54) Davis, M: The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu. Rev. Neurosci.* 15. 353–375 (1992).
- (55) Dean, B; Crook, JM; Opeskin, K; Hill, C; Keks, N; Copolov, DL: The density of muscarinic M1 receptors is decreased in the caudate-putamen of subjects with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 1. 54–58 (1996).
- (56) Dean, B; McLeod, M; Keriakous, D; McKenzie, J; Scarr, E: Decreased muscarinic receptors in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 7. 1083–1091 (2002).
- (57) Deng, C; Huang, X: Decreased density of muscarinic receptors in the superior temporal gyrus in schizophrenia. *J. Neurosci. Res.* 81. 883–890 (2005).

6 Anhang

- (58) Done, DJ; Crow, TJ; Johnstone, EC; Sacker, A: Childhood antecedents of schizophrenia and affective illness: social adjustment at ages 7 and 11. *BMJ* 309. 699–703 (1994).
- (59) Dong, E; Agis-Balboa, RC; Simonini, MV; Grayson, DR; Costa, E; Guidotti, A: Reelin and glutamic acid decarboxylase67 promoter remodeling in an epigenetic methionine-induced mouse model of schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102. 12578–12583 (2005).
- (60) Duncan, CE; Webster, MJ; Rothmond, DA; Bahn, S; Elashoff, M; Shannon Weickert, C: Prefrontal GABA(A) receptor alpha-subunit expression in normal postnatal human development and schizophrenia. *J Psychiatr Res* 44. 673–681 (2010).
- (61) Ellenbroek, BA; Cools, AR: Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. *Behav Pharmacol* 11. 223–233 (2000).
- (62) Ellis, JR; Ellis, KA; Bartholomeusz, CF; Harrison, BJ; Wesnes, KA; Erskine, FF et al.: Muscarinic and nicotinic receptors synergistically modulate working memory and attention in humans. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 9. 175–189 (2006).
- (63) Enna, SJ; McCarson, KE: Characterization of GABA Receptors. *Curr Protoc Pharmacol* 63. 1.7.1-1.7.20 (2013).
- (64) Everitt, BJ; Morris, KA; O'Brien, A; Robbins, TW: The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience* 42. 1–18 (1991).
- (65) Fanselow, MS; Dong, H: Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65. 7–19 (2010).
- (66) Faraday, MM; Grunberg, NE: The importance of acclimation in acoustic startle amplitude and pre-pulse inhibition testing of male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66. 375–381 (2000).
- (67) Farber, NB; Jiang, X; Dikranian, K; Nemmers, B: Muscimol prevents NMDA antagonist neurotoxicity by activating GABAA receptors in several brain regions. *Brain Res.* 993. 90–100 (2003).
- (68) Fernando, Anushka B P; Murray, JE; Milton, AL: The amygdala: securing pleasure and avoiding pain. *Front Behav Neurosci* 7. 190 (2013).
- (69) File, SE; Hyde, JR: Can social interaction be used to measure anxiety? *Br. J. Pharmacol.* 62. 19–24 (1978).
- (70) File, SE; Seth, P: A review of 25 years of the social interaction test. *Eur. J. Pharmacol.* 463. 35–53 (2003).
- (71) Fone, Kevin C F; Porkess, MV: Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 32. 1087–1102 (2008).
- (72) Freund, TF; Buzsáki, G: Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6. 347–470 (1996).

6 Anhang

- (73) Freund, TF; Gulyás, AI; Acsády, L; Görcs, T; Tóth, K: Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87. 8501–8505 (1990).
- (74) Frotscher, M: Mossy fiber synapses on glutamate decarboxylase-immunoreactive neurons: evidence for feed-forward inhibition in the CA3 region of the hippocampus. *Exp Brain Res* 75. 441–445 (1989).
- (75) Frotscher, M; Léránth, C: Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 239. 237–246 (1985).
- (76) Frotscher, M; Schlander, M; Léránth, C: Cholinergic neurons in the hippocampus. A combined light- and electron-microscopic immunocytochemical study in the rat. *Cell Tissue Res* 246. 293–301 (1986).
- (77) Garey, L: When cortical development goes wrong: schizophrenia as a neurodevelopmental disease of microcircuits. *J. Anat.* 217. 324–333 (2010).
- (78) Gelders, YG; Heylen, SL; Vanden Bussche, G; Reyntjens, AJ; Janssen, PA: Pilot clinical investigation of risperidone in the treatment of psychotic patients. *Pharmacopsychiatry* 23. 206–211 (1990).
- (79) Geyer, MA; Moghaddam, B: Animal models relevant to schizophrenia disorders. In: Davis, KL; Charney, D; Coyle, JT; Nemeroff, C (Hrsg.): *Neuropsychopharmacology - The fifth generation of progress.* pp. American College of Neuropsychopharmacology. 689-701 (2002).
- (80) Gibbons, AS; Scarr, E; Boer, S; Money, T; Jeon, W; Felder, C; Dean, B: Widespread decreases in cortical muscarinic receptors in a subset of people with schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 16. 37–46 (2013).
- (81) Göpel, C; Laufer, C; Marcus, A: Three cases of angel's trumpet tea-induced psychosis in adolescent substance abusers. *Nord J Psychiatry* 56. 49–52 (2002).
- (82) Gottesman, II; Gould, TD: The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry* 160. 636–645 (2003).
- (83) Grace, AA: Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41. 1–24 (1991).
- (84) Greene, R: Circuit analysis of NMDAR hypofunction in the hippocampus, in vitro, and psychosis of schizophrenia. *Hippocampus* 11. 569–577 (2001).
- (85) Griguoli, M; Cherubini, E: Regulation of hippocampal inhibitory circuits by nicotinic acetylcholine receptors. *J Physiol (Lond)* 590. 655–666 (2012).
- (86) Guidotti, A; Auta, J; Davis, JM; Di-Giorgi-Gerevini, V; Dwivedi, Y; Grayson, DR et al.: Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch. Gen. Psychiatry* 57. 1061–1069 (2000).

6 Anhang

- (87) Guidotti, A; Dong, E; Kundakovic, M; Satta, R; Grayson, DR; Costa, E: Characterization of the action of antipsychotic subtypes on valproate-induced chromatin remodeling. *Trends Pharmacol. Sci.* 30. 55–60 (2009).
- (88) Guillin, O; Abi-Dargham, A; Laruelle, M: Neurobiology of dopamine in schizophrenia. *Int. Rev. Neurobiol.* 78. 1–39 (2007).
- (89) Haber, SN; Fudge, JL: The interface between dopamine neurons and the amygdala: implications for schizophrenia. *Schizophr Bull* 23. 471–482 (1997).
- (90) Haber, SN: The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *J. Chem. Neuroanat.* 26. 317–330 (2003).
- (91) Haeffner, H; Maurer, K; Löffler, W; Bustamante, S; an der Heiden, W; Riecher-Rössler, A; Nowotny, B: Onset and early course of schizophrenia. In: Häffner, H; Gattaz, WF (Hrsg.): *Search for the causes of schizophrenia. Vol. III.* Springer Verlag, Berlin/Heidelberg. 43-66 (1995).
- (92) Halasy, K; Miettinen, R; Szabat, E; Freund, TF: GABAergic Interneurons are the Major Postsynaptic Targets of Median Raphe Afferents in the Rat Dentate Gyrus. *Eur J Neurosci* 4. 144–153 (1992).
- (93) Halberstadt, AL; Geyer, MA: Serotonergic hallucinogens as translational models relevant to schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 16. 2165–2180 (2013).
- (94) Harrison, PJ: Neurochemical alterations in schizophrenia affecting the putative receptor targets of atypical antipsychotics. Focus on dopamine (D1, D3, D4) and 5-HT_{2a} receptors. *Br J Psychiatry Suppl.* 12–22 (1999).
- (95) Harrison, PJ: The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122 (Pt 4). 593–624 (1999).
- (96) Hashimoto, T; Nishino, N; Nakai, H; Tanaka, C: Increase in serotonin 5-HT_{1A} receptors in prefrontal and temporal cortices of brains from patients with chronic schizophrenia. *Life Sci.* 48. 355–363 (1991).
- (97) Hawken, ER; Beninger, RJ: The amphetamine sensitization model of schizophrenia symptoms and its effect on schedule-induced polydipsia in the rat. *Psychopharmacology, Berl.* (2013).
- (98) Heckers, S; Konradi, C: GABAergic mechanisms of hippocampal hyperactivity in schizophrenia. *Schizophr Res* 167. 4–11 (2015).
- (99) Heimberg, C; Gur, RE; Erwin, RJ; Shtasel, DL; Gur, RC: Facial emotion discrimination: III. Behavioral findings in schizophrenia. *Psychiatry Res* 42. 253–265 (1992).
- (100) Heldt, SA; Mou, L; Ressler, KJ: In vivo knockdown of GAD67 in the amygdala disrupts fear extinction and the anxiolytic-like effect of diazepam in mice. *Transl Psychiatry* 2. 181 (2012).
- (101) Heldt, SA; Green, A; Ressler, KJ: Prepulse Inhibition Deficits in GAD65 Knockout Mice and the Effect of Antipsychotic Treatment. *Neuropsychopharmacology* 29. 1610–1619 (2004).

6 Anhang

- (102) Hellemans, Kim G C; Benge, LC; Olmstead, MC: Adolescent enrichment partially reverses the social isolation syndrome. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 150. 103–115 (2004).
- (103) Hökfelt, T; Johansson, O; Fuxe, K; Goldstein, M; Park, D: Immunohistochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron systems in the rat brain II. Tyrosine hydroxylase in the telencephalon. *Med Biol* 55. 21–40 (1977).
- (104) Holt, DJ; Herman, MM; Hyde, TM; Kleinman, JE; Sinton, CM; German, DC et al.: Evidence for a deficit in cholinergic interneurons in the striatum in schizophrenia. *Neuroscience* 94. 21–31 (1999).
- (105) Holt, DJ; Bachus, SE; Hyde, TM; Wittie, M; Herman, MM; Vangel, M et al.: Reduced density of cholinergic interneurons in the ventral striatum in schizophrenia: an in situ hybridization study. *Biol. Psychiatry* 58. 408–416 (2005).
- (106) Hooks, MS; Kalivas, PW: The role of mesoaccumbens--pallidal circuitry in novelty-induced behavioral activation. *Neuroscience* 64. 587–597 (1995).
- (107) Hoyer, D: Functional correlates of serotonin 5-HT1 recognition sites. *J Recept Res* 8. 59–81 (1988).
- (108) Iafrati, J; Orejarena, MJ; Lassalle, O; Bouamrane, L; Chavis, P: Reelin, an extracellular matrix protein linked to early onset psychiatric diseases, drives postnatal development of the prefrontal cortex via GluN2B-NMDARs and the mTOR pathway. *Mol. Psychiatry* (2013).
- (109) Ide, M; Lewis, DA: Altered cortical CDC42 signaling pathways in schizophrenia: implications for dendritic spine deficits. *Biol. Psychiatry* 68. 25–32 (2010).
- (110) Impagnatiello, F; Guidotti, AR; Pesold, C; Dwivedi, Y; Caruncho, H; Pisu, MG et al.: A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95. 15718–15723 (1998).
- (111) Jablensky, A: Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 250. 274–285 (2000).
- (112) Jacobs, BL; Azmitia, EC: Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.* 72. 165–229 (1992).
- (113) Javitt, DC; Zukin, SR: Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148. 1301–1308 (1991).
- (114) Jentsch, JD; Roth, RH: The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20. 201–225 (1999).
- (115) Joel, D; Weiner, I: The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience* 96. 451–474 (2000).
- (116) Johnstone, EC; Crow, TJ; Ferrier, IN; Frith, CD; Owens, DG; Bourne, RC; Gamble, SJ: Adverse effects of anticholinergic medication on positive schizophrenic symptoms. *Psychol Med* 13. 513–527 (1983).

6 Anhang

- (117) Jones, CK; Shannon, HE: Effects of scopolamine in comparison with apomorphine and phencyclidine on prepulse inhibition in rats. *Eur J Pharmacol* 391. 105–112 (2000).
- (118) Jones, P; Rodgers, B; Murray, R; Marmot, M: Child development risk factors for adult schizophrenia in the British 1946 birth cohort. *Lancet* 344. 1398–1402 (1994).
- (119) Kapur, S; Remington, G: Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am J Psychiatry* 153. 466–476 (1996).
- (120) Kawasaki, Y; Suzuki, M; Maeda, Y; Urata, K; Yamaguchi, N; Matsuda, H et al.: Regional cerebral blood flow in patients with schizophrenia. A preliminary report. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 241. 195–200 (1992).
- (121) Kay, SR; Fiszbein, A; Opler, LA: The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull* 13. 261–276 (1987).
- (122) Kegeles, LS; Abi-Dargham, A; Zea-Ponce, Y; Rodenhiser-Hill, J; Mann, JJ; Van Heertum, R L et al.: Modulation of amphetamine-induced striatal dopamine release by ketamine in humans: implications for schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 48. 627–640 (2000).
- (123) Kerwin, RW; Patel, S; Meldrum, BS; Czudek, C; Reynolds, GP: Asymmetrical loss of glutamate receptor subtype in left hippocampus in schizophrenia. *Lancet* 1. 583–584 (1988).
- (124) Kessels, HW; Malinow, R: Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron* 61. 340–350 (2009).
- (125) Knable, MB; Barci, BM; Webster, MJ; Meador-Woodruff, J; Torrey, EF: Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. *Mol. Psychiatry* 9. 609–20, 544 (2004).
- (126) Koch, M: The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.* 59. 107–128 (1999).
- (127) Koch, M; Klarner, A; Schnitzler, HU: Lesions of the rat piriform cortex prevent long-lasting sensorimotor gating deficits induced by stimulation of the ventral hippocampus. *Neurosci Lett* 275. 195–198 (1999).
- (128) Koch, M: Clinical relevance of animal models of schizophrenia. *Suppl Clin Neurophysiol* 62. 113–120 (2013).
- (129) Kohl, S; Heekeren, K; Klosterkötter, J; Kuhn, J: Prepulse inhibition in psychiatric disorders--apart from schizophrenia. *J Psychiatr Res* 47. 445–452 (2013).
- (130) Kornhuber, J; Mack-Burkhardt, F; Riederer, P; Hebenstreit, GF; Reynolds, GP; Andrews, HB; Beckmann, H: [3H]MK-801 binding sites in postmortem brain regions of schizophrenic patients. *J. Neural Transm.* 77. 231–236 (1989).
- (131) Kosaka, H; Omori, M; Murata, T; Iidaka, T; Yamada, H; Okada, T et al.: Differential amygdala response during facial recognition in patients with schizophrenia: an fMRI study. *Schizophr. Res.* 57. 87–95 (2002).

6 Anhang

- (132) Kosofsky, BE; Molliver, ME: The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* 1. 153–168 (1987).
- (133) Kozak, R; Bruno, JP; Sarter, M: Augmented prefrontal acetylcholine release during challenged attentional performance. *Cereb. Cortex* 16. 9–17 (2006).
- (134) Kraepelin, E: *Psychiatrie. Ein kurzes Lehrbuch für Studierende und Aerzte.* 4., vollst. umgearb. Aufl. Abel. Leipzig (1893).
- (135) Kurumaji, A; Ishimaru, M; Toru, M: Alpha-[3H]amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid binding to human cerebral cortical membranes: minimal changes in postmortem brains of chronic schizophrenics. *J. Neurochem.* 59. 829–837 (1992).
- (136) Kutiyawalla, A; Promsote, W; Terry, A; Pillai, A: Cysteamine treatment ameliorates alterations in GAD67 expression and spatial memory in heterozygous reeler mice. *Int. J. Neuropsychopharm.* 15. 1073–1086 (2012).
- (137) Lappalainen, J; Sanacora, G; Kranzler, HR; Malison, R; Hibbard, ES; Price, LH et al.: Mutation screen of the glutamate decarboxylase-67 gene and haplotype association to unipolar depression. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 124B. 81–86 (2004).
- (138) Laruelle, M; Abi-Dargham, A: Dopamine as the wind of the psychotic fire: new evidence from brain imaging studies. *J Psychopharmacol (Oxford)* 13. 358–371 (1999).
- (139) Law, AJ; Deakin, JF: Asymmetrical reductions of hippocampal NMDAR1 glutamate receptor mRNA in the psychoses. *Neuroreport* 12. 2971–2974 (2001).
- (140) Lehmann, J; Pryce, CR; Feldon, J: Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats. *Behav. Brain Res.* 104. 113–117 (1999).
- (141) Levitt, JJ; Bobrow, L; Lucia, D; Srinivasan, P: A selective review of volumetric and morphometric imaging in schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci* 4. 243–281 (2010).
- (142) Lewis, DA; Campbell, MJ; Foote, SL; Goldstein, M; Morrison, JH: The distribution of tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibers in primate neocortex is widespread but regionally specific. *J. Neurosci.* 7. 279–290 (1987).
- (143) Lewis, DA; Lieberman, JA: Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28. 325–334 (2000).
- (144) Lewis, DA; Hashimoto, T; Volk, DW: Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat. Rev. Neurosci.* 6. 312–324 (2005).
- (145) Lewis, DA; Levitt, P: Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu. Rev. Neurosci.* 25. 409–432 (2002).
- (146) Li, H; Chan, Raymond C K; McAlonan, GM; Gong, Q: Facial emotion processing in schizophrenia: a meta-analysis of functional neuroimaging data. *Schizophr Bull* 36. 1029–1039 (2010).

6 Anhang

- (147) Light, GA; Braff, DL: Human and animal studies of schizophrenia-related gating deficits. *Curr Psychiatry Rep* 1. 31–40 (1999).
- (148) Lisman, JE; Otmakhova, NA: Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. *Hippocampus* 11. 551–568 (2001).
- (149) Lisman, JE; Grace, AA: The Hippocampal-VTA Loop: Controlling the Entry of Information into Long-Term Memory. *Neuron* 46. 703–713 (2005).
- (150) Logue, SF; Owen, EH; Rasmussen, DL; Wehner, JM: Assessment of locomotor activity, acoustic and tactile startle, and prepulse inhibition of startle in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience* 80. 1075–1086 (1997).
- (151) López-Figueroa, AL; Norton, CS; López-Figueroa, MO; Armellini-Dodel, D; Burke, S; Akil, H et al.: Serotonin 5-HT1A, 5-HT1B, and 5-HT2A receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 55. 225–233 (2004).
- (152) Ludewig, K; Ludewig, S; Seitz, A; Obrist, M; Geyer, MA; Vollenweider, FX: The acoustic startle reflex and its modulation: effects of age and gender in humans. *Biol Psychol* 63. 311–323 (2003).
- (153) Malenka, RC; Nicoll, RA: Long-term potentiation—a decade of progress? *Science* 285. 1870–1874 (1999).
- (154) Mällo, T; Altooa, A; Kõiv, K; Tõnissaar, M; Eller, M; Harro, J: Rats with persistently low or high exploratory activity: behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. *Behav. Brain Res.* 177. 269–281 (2007).
- (155) Martin-Ruiz, CM; Haroutunian, VH; Long, P; Young, AH; Davis, KL; Perry, EK; Court, JA: Dementia rating and nicotinic receptor expression in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 54. 1222–1233 (2003).
- (156) Marutle, A; Zhang, X; Court, J; Piggott, M; Johnson, M; Perry, R et al.: Laminar distribution of nicotinic receptor subtypes in cortical regions in schizophrenia. *J Chem Neuroanat* 22. 115–126 (2001).
- (157) Matrisciano, F; Tueting, P; Dalal, I; Kadriu, B; Grayson, DR; Davis, JM et al.: Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice. *Neuropharmacology* 68. 184–194 (2013).
- (158) Matsumoto, I; Inoue, Y; Iwazaki, T; Pavey, G; Dean, B: 5-HT2A and muscarinic receptors in schizophrenia: a postmortem study. *Neurosci. Lett.* 379. 164–168 (2005).
- (159) McGrath, J; Saha, S; Chant, D; Welham, J: Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality. *Epidemiol Rev* 30. 67–76 (2008).
- (160) McQuade, R; Sharp, T: Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. *J. Neurochem.* 69. 791–796 (1997).

6 Anhang

- (161) Meincke, U; Gouzoulis-Mayfrank, E; Sass, H: Der Startle-Reflex in der Schizophrenieforschung. *Nervenarzt* 72. 844–852 (2001).
- (162) Meincke, U; Light, GA; Geyer, MA; Braff, DL; Gouzoulis-Mayfrank, E: Sensitization and habituation of the acoustic startle reflex in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res* 126. 51–61 (2004).
- (163) Meltzer, HY; Matsubara, S; Lee, JC: Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi values. *J Pharmacol Exp Ther* 251. 238–246 (1989).
- (164) Meltzer, HY; Stahl, SM: The dopamine hypothesis of schizophrenia: a review. *Schizophr Bull* 2. 19–76 (1976).
- (165) Mendrek, A; Mancini-Marie, A: Sex/gender differences in the brain and cognition in schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* (2015).
- (166) Mesulam, MM; Mufson, EJ; Levey, AI; Wainer, BH: Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 214. 170–197 (1983).
- (167) Mesulam, MM: The cholinergic innervation of the human cerebral cortex. *Prog. Brain Res.* 145. 67–78 (2004).
- (168) Michaelis, EK: Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging. *Prog. Neurobiol.* 54. 369–415 (1998).
- (169) Miyamoto, S; Duncan, GE; Marx, CE; Lieberman, JA: Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry* 10. 79–104 (2005).
- (170) Mogenson, GJ; Jones, DL; Yim, CY: From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog. Neurobiol.* 14. 69–97 (1980).
- (171) Mohn, AR; Gainetdinov, RR; Caron, MG; Koller, BH: Mice with Reduced NMDA Receptor Expression Display Behaviors Related to Schizophrenia. *Cell* 98. 427–436 (1999).
- (172) Mokler, DJ; Lariviere, D; Johnson, DW; Theriault, NL; Bronzino, JD; Dixon, M; Morgane, PJ: Serotonin neuronal release from dorsal hippocampus following electrical stimulation of the dorsal and median raphe nuclei in conscious rats. *Hippocampus* 8. 262–273 (1998).
- (173) Möller, H; Laux, G; Deister, A; Braun-Scharm, H: *Psychiatrie und Psychotherapie. 241 Tabellen; [mit Patientengesprächen auf Video-CD-ROM]. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. mit Video-CD-ROM. Duale Reihe.* Thieme. Stuttgart (2009).
- (174) Moore, RY; Halaris, AE: Hippocampal innervation by serotonin neurons of the midbrain raphe in the rat. *J. Comp. Neurol.* 164. 171–183 (1975).

6 Anhang

- (175) Murakami, G; Hunter, RG; Fontaine, C; Ribeiro, A; Pfaff, D: Relationships among estrogen receptor, oxytocin and vasopressin gene expression and social interaction in male mice. *Eur. J. Neurosci.* 34. 469–477 (2011).
- (176) Nakayama, H; Hashimoto, K; Miyazaki, T; Yanagawa, Y; Obata, K; Watanabe, M; Kano, M: Strength of GABAergic transmission influences climbing fiber synapse elimination during cerebellar development. *Neuroscience Research.* 58. 52 (2007).
- (177) Nakazawa, K; McHugh, TJ; Wilson, MA; Tonegawa, S: NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 5. 361–372 (2004).
- (178) Olmos, J de; Heimer, L: Double and triple labeling of neurons with fluorescent substances; the study of collateral pathways in the ascending raphe system. *Neurosci. Lett.* 19. 7–12 (1980).
- (179) Olney, JW; Farber, NB: NMDA antagonists as neurotherapeutic drugs, psychotogens, neurotoxins, and research tools for studying schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13. 335–345 (1995).
- (180) O'Tuathaigh, Colm M P; Babovic, D; O'Meara, G; Clifford, JJ; Croke, DT; Waddington, JL: Susceptibility genes for schizophrenia: characterisation of mutant mouse models at the level of phenotypic behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 31. 60–78 (2007).
- (181) Pang, Kevin C H; Jiao, X; Sinha, S; Beck, KD; Servatius, RJ: Damage of GABAergic neurons in the medial septum impairs spatial working memory and extinction of active avoidance: effects on proactive interference. *Hippocampus* 21. 835–846 (2011).
- (182) Pascual, R; Zamora-León, SP; Valero-Cabré, A: Effects of postweaning social isolation and re-socialization on the expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) and dendritic development in the medial prefrontal cortex of the rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 66. 7–14 (2006).
- (183) Paxinos, G; Franklin, Keith B. J.: *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* 2. ed. Acad. Press. San Diego, Calif (2004).
- (184) Penington, NJ; Fox, AP: Effects of LSD on Ca⁺⁺ currents in central 5-HT-containing neurons: 5-HT_{1A} receptors may play a role in hallucinogenesis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269. 1160–1165 (1994).
- (185) Perry, E; Walker, M; Grace, J; Perry, R: Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci.* 22. 273–280 (1999).
- (186) Perry, EK; Perry, RH: Acetylcholine and hallucinations: disease-related compared to drug-induced alterations in human consciousness. *Brain Cogn* 28. 240–258 (1995).
- (187) Petty, F; Sherman, AD: GABAergic modulation of learned helplessness. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15. 567–570 (1981).
- (188) Pickel, VM; Joh, TH; Field, PM; Becker, CG; Reis, DJ: Cellular localization of tyrosine hydroxylase by immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 23. 1–12 (1975).

6 Anhang

- (189) Pitkänen, A; Savander, V; LeDoux, JE: Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci.* 20. 517–523 (1997).
- (190) Pješčić, KD; Nenadović, MM; Jašović-Gašić, M; Trajković, G; Kostić, M; Ristić-Dimitrijević, R: Influence of psycho-social factors on the emergence of depression and suicidal risk in patients with schizophrenia. *Psychiatr Danub* 26. 226–230 (2014).
- (191) Plappert, CF; Pilz, PK; Schnitzler, H: Factors governing prepulse inhibition and prepulse facilitation of the acoustic startle response in mice. *Behav. Brain Res.* 152. 403–412 (2004).
- (192) Podhorna, J; Didriksen, M: The heterozygous reeler mouse: behavioural phenotype. *Behav. Brain Res.* 153. 43–54 (2004).
- (193) Porsolt, RD; Le Pichon, M; Jalfre, M: Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266. 730–732 (1977).
- (194) Porter, RH; Eastwood, SL; Harrison, PJ: Distribution of kainate receptor subunit mRNAs in human hippocampus, neocortex and cerebellum, and bilateral reduction of hippocampal GluR6 and KA2 transcripts in schizophrenia. *Brain Res.* 751. 217–231 (1997).
- (195) Prensa, L; Giménez-Amaya, JM; Parent, A; Bernácer, J; Cebrián, C: The nigrostriatal pathway: axonal collateralization and compartmental specificity. *J. Neural Transm. Suppl.* 49–58 (2009).
- (196) Pritchett, D; Wulff, K; Oliver, PL; Bannerman, DM; Davies, KE; Harrison, PJ et al.: Evaluating the links between schizophrenia and sleep and circadian rhythm disruption. *J Neural Transm* 119. 1061–1075 (2012).
- (197) Quednow, BB: Defizite der sensomotorischen Filterleistung bei psychiatrischen Erkrankungen. *Zeitschrift für Neuropsychologie* 19. 139–163 (2008).
- (198) Raedler, TJ; Bymaster, FP; Tandon, R; Copolov, D; Dean, B: Towards a muscarinic hypothesis of schizophrenia. *Mol. Psychiatry* 12. 232–246 (2007).
- (199) Réus, GZ; Stringari, RB; Ribeiro, KF; Cipriano, AL; Panizzutti, BS; Stertz, L et al.: Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin levels in the rat brain. *Neurochem. Res.* 36. 460–466 (2011).
- (200) Reynolds, GP; Zhang, ZJ; Beasley, CL: Neurochemical correlates of cortical GABAergic deficits in schizophrenia: selective losses of calcium binding protein immunoreactivity. *Brain Res. Bull.* 55. 579–584 (2001).
- (201) Riecher-Rössler, A; Löffler, W; Munk-Jørgensen, P: What do we really know about late-onset schizophrenia? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 247. 195–208 (1997).
- (202) Risold, PY; Swanson, LW: Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 24. 115–195 (1997).

6 Anhang

- (203) Romano, E; Angelis, F de; Ulbrich, L; Jaco, A de; Fuso, A; Laviola, G: Nicotine exposure during adolescence: cognitive performance and brain gene expression in adult heterozygous reeler mice. *Psychopharmacology (Berl)* 231. 1775–1787 (2014).
- (204) Roth, BL; Meltzer, HY: The Role of Serotonin in Schizophrenia. In: Bloom, FE; Kupfer, DJ (Hrsg.): *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. American College of Neuropsychopharmacology, Nashville, TN. 1215-1228 (2000).
- (205) Roth, TL; Lubin, FD; Sodhi, M; Kleinman, JE: Epigenetic mechanisms in schizophrenia. *Biochim Biophys Acta* 1790. 869–877 (2009).
- (206) Russ, JC; Dehoff, RT: Classical stereological measures: Three Dimensional Microstructures: Line Length and the Area Point Count. In: Russ, JC; Dehoff, RT (Hrsg.): *Practical Stereology*. 2. Plenum Press, New York. 63-70 (1999).
- (207) Salinger, WL; Ladrow, P; Wheeler, C: Behavioral phenotype of the reeler mutant mouse: effects of RELN gene dosage and social isolation. *Behav. Neurosci.* 117. 1257–1275 (2003).
- (208) Sams-Dodd, F: Phencyclidine in the social interaction test: an animal model of schizophrenia with face and predictive validity. *Rev Neurosci* 10. 59–90 (1999).
- (209) Sams-Dodd, F; Lipska, BK; Weinberger, DR: Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology (Berl.)* 132. 303–310 (1997).
- (210) Samsom, JN; Wong, Albert H. C.: Schizophrenia and Depression Co-Morbidity: What We have Learned from Animal Models. *Front. Psychiatry* 6 (2015).
- (211) Sandhu, KV; Lang, D; Müller, B; Nullmeier, S; Yanagawa, Y; Schwegler, H; Stork, O: Glutamic acid decarboxylase 67 haploinsufficiency impairs social behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior* 13. 439–450 (2014).
- (212) Scarr, E; Sundram, S; Keriakous, D; Dean, B: Altered hippocampal muscarinic M4, but not M1, receptor expression from subjects with schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 61. 1161–1170 (2007).
- (213) Schlossberg, K; Massler, A; Zalsman, G: Environmental risk factors for psychopathology. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 47. 139–143 (2010).
- (214) Schmidt, RH; Bhatnagar, RK: Regional development of norepinephrine, dopamine-beta-hydroxylase and tyrosine hydroxylase in the rat brain subsequent to neonatal treatment with subcutaneous 6-hydroxydopamine. *Brain Res* 166. 293–308 (1979).
- (215) Schwaller, B: The use of transgenic mouse models to reveal the functions of Ca²⁺ buffer proteins in excitable cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1820. 1294–1303 (2012).
- (216) Seeman, MV: Interaction of sex, age, and neuroleptic dose. *Compr Psychiatry* 24. 125–128 (1983).
- (217) Seeman, MV; Lang, M: The role of estrogens in schizophrenia gender differences. *Schizophr Bull* 16. 185–194 (1990).

6 Anhang

- (218) Seeman, P; Lee, T; Chau-Wong, M; Wong, K: Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 261. 717–719 (1976).
- (219) Sherman, AD; Petty, F: Neurochemical basis of the action of antidepressants on learned helplessness. *Behav. Neural Biol.* 30. 119–134 (1980).
- (220) Silva-Gómez, AB; Rojas, D; Juárez, I; Flores, G: Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. *Brain Res* 983. 128–136 (2003).
- (221) Singh, MM; Kay, SR; Opler, LA: Anticholinergic-neuroleptic antagonism in terms of positive and negative symptoms of schizophrenia: implications for psychobiological subtyping. *Psychol Med* 17. 39–48 (1987).
- (222) Sodhi, Monsheel S K; Sanders-Bush, E: Serotonin and brain development. *Int Rev Neurobiol* 59. 111–174 (2004).
- (223) Staats, J: Standardized nomenclature for inbred strains of mice: seventh listing for the International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice. *Cancer Res.* 40. 2083–2128 (1980).
- (224) Stephenson, FA: Structure and trafficking of NMDA and GABAA receptors. *Biochem. Soc. Trans.* 34. 877–881 (2006).
- (225) Stone, DJ; Walsh, J; Benes, FM: Localization of cells preferentially expressing GAD(67) with negligible GAD(65) transcripts in the rat hippocampus. A double in situ hybridization study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 71. 201–209 (1999).
- (226) Swanson, LW: The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull* 9. 321–353 (1982).
- (227) Swerdlow, NR; Braff, DL; Geyer, MA: Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, and what we hope to know soon. *Behav Pharmacol* 11. 185–204 (2000).
- (228) Tamamaki, N; Yanagawa, Y; Tomioka, R; Miyazaki, J; Obata, K; Kaneko, T: Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J. Comp. Neurol.* 467. 60–79 (2003).
- (229) Tandon, R: Cholinergic aspects of schizophrenia. *Br J Psychiatry Suppl.* 7–11 (1999).
- (230) Tandon, R; DeQuardo, JR; Goodson, J; Mann, NA; Greden, JF: Effect of anticholinergics on positive and negative symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacol Bull* 28. 297–302 (1992).
- (231) Tandon, R; Shipley, JE; Greden, JF; Mann, NA; Eisner, WH; Goodson, JA: Muscarinic cholinergic hyperactivity in schizophrenia. Relationship to positive and negative symptoms. *Schizophr. Res.* 4. 23–30 (1991).
- (232) Thoenen, H; Otten, U; Oesch, F: Axoplasmic transport of enzymes involved in the synthesis of noradrenaline: relationship between the rate of transport and subcellular distribution. *Brain Res* 62. 471–475 (1973).

6 Anhang

- (233) Thomas, H; Fink, H; Sohr, TR; Voits, M: Lesion of the median raphe nucleus: a combined behavioral and microdialysis study in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 65. 15–21 (2000).
- (234) Tremolizzo, L; Carboni, G; Ruzicka, WB; Mitchell, CP; Sugaya, I; Tueting, P et al.: An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99. 17095–17100 (2002).
- (235) Tremolizzo, L; Doueiri, M; Dong, E; Grayson, DR; Davis, J; Pinna, G et al.: Valproate corrects the schizophrenia-like epigenetic behavioral modifications induced by methionine in mice. *Biol. Psychiatry* 57. 500–509 (2005).
- (236) Tueting, P; Pinna, G; Costa, E: Homozygous and Heterozygous Reeler Mouse Mutants. In: Fatemi, SH (Hrsg.): *Reelin Glycoprotein*. Springer, New York. 291–309 (2008).
- (237) Tueting, P; Costa, E; Dwivedi, Y; Guidotti, A; Impagnatiello, F; Manev, R; Pesold, C: The phenotypic characteristics of heterozygous reeler mouse. *Neuroreport* 10. 1329–1334 (1999).
- (238) Tueting, P; Doueiri, M; Guidotti, A; Davis, J; Costa, E: Reelin down-regulation in mice and psychosis endophenotypes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 30. 1065–1077 (2006).
- (239) Uchida, T; Oki, Y; Yanagawa, Y; Fukuda, A: A heterozygous deletion in the glutamate decarboxylase 67 gene enhances maternal and fetal stress vulnerability. *Neurosci. Res.* 69. 276–282 (2011).
- (240) Valsamis, B; Schmid, S: Habituation and Prepulse Inhibition of Acoustic Startle in Rodents. *JoVE* (2011).
- (241) van Rossum, J M: The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 160. 492–494 (1966).
- (242) Võikar, V; Polus, A; Vasar, E; Rauvala, H: Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes Brain Behav.* 4. 240–252 (2005).
- (243) Vollenweider, FX; Csomor, PA; Knappe, B; Geyer, MA; Quednow, BB: The effects of the preferential 5-HT_{2A} agonist psilocybin on prepulse inhibition of startle in healthy human volunteers depend on interstimulus interval. *Neuropsychopharmacology* 32. 1876–1887 (2007).
- (244) Vreugdenhil, M; Jefferys, John G R; Celio, MR; Schwaller, B: Parvalbumin-deficiency facilitates repetitive IPSCs and gamma oscillations in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* 89. 1414–1422 (2003).
- (245) Wang, Y, Takayanagi, Y & Onaka, T: Effects of medial amygdale lesions upon social behavior in mice. In Yamaguchi, Y (ed), *Advances in Cognitive Neurodynamics*, Vol. 3. Proceedings of the Third International Conference on Cognitive Neurodynamics, Springer Verlag, Heidelberg. 753–757 (2013).

6 Anhang

- (246) Wang, Y; Kakizaki, T; Sakagami, H; Saito, K; Ebihara, S; Kato, M et al.: Fluorescent labeling of both GABAergic and glycinergic neurons in vesicular GABA transporter (VGAT)-venus transgenic mouse. *Neuroscience* 164. 1031–1043 (2009).
- (247) Waselus, M; Valentino, RJ; Van Bockstaele, Elisabeth J: Collateralized dorsal raphe nucleus projections: a mechanism for the integration of diverse functions during stress. *J. Chem. Neuroanat.* 41. 266–280 (2011).
- (248) Wen, J; Xue, L; Wang, R; Chen, Z; Shi, Y; Zhao, H: Involvement of the dopaminergic system in the consolidation of fear conditioning in hippocampal CA3 subregion. *Behav. Brain Res.* 278. 527–534 (2015).
- (249) Wolf, R: [Pharmacological influence on behavioural parameters in genetically and lesion induced animal models of schizophrenia]. In: Hippus, H (Hrsg.): *Universitätskolloquien zur Schizophrenie, Band 2.* Steinkopff Verlag, Darmstadt. 460-467 (2004).
- (250) Wong, Albert Hung Choy; Van Tol, Hubert H M: Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neurosci Biobehav Rev* 27. 269–306 (2003).
- (251) Yakel, JL: Cholinergic receptors: functional role of nicotinic ACh receptors in brain circuits and disease. *Pflugers Arch.* 465. 441–450 (2013).
- (252) Yasuno, F; Suhara, T; Ichimiya, T; Takano, A; Ando, T; Okubo, Y: Decreased 5-HT_{1A} receptor binding in amygdala of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 55. 439–444 (2004).
- (253) Yeomans, JS; Bosch, D; Alves, N; Daros, A; Ure, RJ; Schmid, S: GABA receptors and prepulse inhibition of acoustic startle in mice and rats. *European Journal of Neuroscience* 31. 2053–2061 (2010).
- (254) Young, JW; Geyer, MA: Evaluating the role of the alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Biochem Pharmacol* 86. 1122–1132 (2013).
- (255) Zemishlany, Z; Aizenberg, D; Weiner, Z; Weizman, A: Trihexyphenidyl (Artane) abuse in schizophrenic patients. *Int Clin Psychopharmacol* 11. 199–202 (1996).
- (256) Zhang, K; Hill, K; Labak, S; Blatt, GJ; Soghomonian, J: Loss of glutamic acid decarboxylase (Gad67) in Gpr88-expressing neurons induces learning and social behavior deficits in mice. *Neuroscience* 275. 238–247 (2014).

6.2. Danksagung

An erster Stelle danke ich *meiner Familie*, ohne die nicht einmal das Medizinstudium, die Voraussetzung dieser Arbeit, möglich gewesen wäre. Ihr habt mich in jeder noch so schwierigen Situation unterstützt und standet mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Dafür bin ich euch sehr dankbar. Ihr habt mir immer wieder zu neuer Kraft verholfen und mich somit fortwährend ermutigt, dieses Projekt zu vollenden.

Besonderer Dank gilt...

...meinem Doktorvater *Herrn Prof. Dr. rer. nat. Herbert Schwegler*, der mich im Rahmen dieser Arbeit noch weit über den Präpkurs der Vorklinik hinaus sehr geduldig und gewissenhaft betreut und unterstützt hat. Vielen Dank für die Überlassung der Versuchsapparaturen sowie anderer Arbeitsmaterialien, sowie für die vielen Diskussionen und Anmerkungen zu dieser Arbeit.

...*Herrn Dr. med. Sven Nullmeier* für die ausgezeichnete Betreuung und uneingeschränkte Unterstützung bei der Umsetzung des Gesamtprojektes. Vielen Dank für die Anleitung während der Versuche, die Hilfe bei der statistischen Auswertung und die vielen Anreize und Korrekturen der Niederschrift dieser Arbeit. Außerdem bedanke ich mich für die Umsetzung der Veröffentlichung in einem wissenschaftlichen Journal.

...*Herrn Prof. Dr. rer. nat. Oliver Stork* für die anfängliche Erarbeitung des Themas und die Bereitstellung der Versuchstiere.

...*Herrn Prof. Dr. med. Hermann-Josef Rothkötter* für die Bereitstellung der Labortechnik.

...*Frau Dr. med. Patricia Panther* für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten, für die Mitarbeit bei der Veröffentlichung in einem wissenschaftlichen Journal und für das Korrekturlesen.

...*Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang D'Hanis* für die Unterstützung bei der Veröffentlichung in einem wissenschaftlichen Journal.

...*Frau Andrea Kröber* für die professionelle technische Unterstützung sowie die Geduld und Anleitung bei den Laborarbeiten.

...meinem guten Freund *Martin Schütze* für so manche moralische Unterstützung und für das Korrekturlesen.

6.3. Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die in der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**Die GAD67-GFP(Δ neo)-Maus als ein Tiermodell der Schizophrenie?
Untersuchungen von Verhalten und Neuromorphologie im Vergleich zu
Kontrolltieren.**

am Institut für Anatomie an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Herbert Schwegler und Herrn Dr. med. Sven Nullmeier

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind die Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Christoph Elmers

Magdeburg, den 03. April 2017

6.4. Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

6 Anhang

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

6.5. Anlagen

6.5.1. Färbeprotokolle

6.5.1.1. Protokoll der Nissl-Färbung

Ansatz Farblösung:

- 0,5g Kresylechtviolett in 100ml Acetatpuffer (pH 3,8 - 4,0) lösen

Ansatz Acetatpuffer:

- 20ml 2,72%iges Natriumacetat und 80ml 1,20%ige Essigsäure zusammengeben

Färbung:

- Nachfixation in Immunfixans (15% gesättigte Pikrinsäure und 4% Paraformaldehyd in 0,2mol Phosphatpuffer, pH 7,4) für 5min
- Spülen in 0,1mol Phosphatpuffer
- Spülen in Aqua dest.
- Inkubation mit gepufferter Farblösung für 2-4min
- Spülen in Acetatpuffer
- Spülen in 100%igem Ethanol (2x)
- Eintauchen in Xylol (2x)
- Eindecken der Objektträger mit Entellan Neu (Merck, Darmstadt, Germany)

6.5.1.2. Protokoll der immunhistochemischen Färbungen

Primäre Antikörperlösung:

- Entnahme der Hirne aus kryoprotektiver Lösung
- dreimaliges Spülen der Hirne für jeweils 10min in 0,1mol Phosphatpuffer (PBS)
- Blockierung unspezifischer Antigene für polyklonale Antikörper (TH, ChAT, 5-HT) durch 30min Inkubation mit 9ml 0,1mol PBS, 1g BSA (bovines Serumalbumin) und 1ml NGS (normales Ziegen Serum bei TH und 5-HT) bzw. NRbs (normales Kaninchenserum bei ChAT), ohne erneutes Spülen
- Inkubation der Hirnschnitte mit entsprechendem primärem Antikörper (siehe Tab. 4) sowie dem Normalserum des Sekundäantikörpers zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 48h bei 4°C auf dem Schüttler:
- 1. TH: polyklonaler Kaninchen-TH-Antikörper (1:1000) in 1% NGS
- 2. ChAT: polyklonaler Ziegen-ChAT-Antikörper (1:100) in 1% NRbs
- 3. 5-HT: polyklonaler Kaninchen-5-HT-Antikörper (1:15000) in 1% NGS

6 Anhang

Primärer Antikörper	Herkunft	Typ	Katalog-Nr./Klon, Hersteller	Verdünnung
Tyrosinhydroxylase Antikörper (Anti-TH)	Kaninchen	polyklonal	ab112, Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Cholinacetyltransferase Antikörper (Anti-ChAT)	Ziege	polyklonal	Cat. # AB144P, Millipore, Billerica, MA, USA	1:100
5-Hydroxytryptamin Antikörper (Anti-5-HT)	Kaninchen	polyklonal	Cat. # 20080, ImmunoStar, Hudson, WI, USA	1:15000

Tab. 4: Primäre Antikörper der immunhistochemischen Färbungen

Markierung durch Sekundärantikörper:

- dreimaliges Spülen der Hirne für jeweils 10min in 0,1mol Phosphatpuffer (PBS)
- Inkubation mit dem sekundären Antikörper (siehe Tab. 5) bei Raumtemperatur für 2h
- 1. TH + 5-HT: biotinyliertes Anti-rabbit-IgG für die polyklonalen Primärantikörper (1:200)
- 2. ChAT: biotinyliertes Anti-goat-IgG für die polyklonalen Primärantikörper (1:200)

Sekundärer Antikörper	Herkunft	Verwendung	Hersteller	Verdünnung
biotinyliertes Anti-rabbit-IgG	Ziege	für Primärantikörper Anti-TH, Anti-5-HT	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	1:200
biotinyliertes Anti-goat-IgG	Kaninchen	für Primärantikörper Anti-ChAT	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA	1:200

Tab. 5: Sekundäre Antikörper der immunhistochemischen Färbungen

Sichtbarmachung mittels Immunfluoreszenz:

- dreimaliges Spülen der Hirne für jeweils 10min in 0,1mol Phosphatpuffer (PBS)
- Inkubation mit Cy3-konjugiertem Avidin (Verdünnung: 1:1000, Code # 003-160-083; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore Pike, PA, USA) für 1h
- dreimaliges Spülen der Hirne für jeweils 10min in 0,1mol Phosphatpuffer (PBS)
- Aufziehen der Hirnschnitte auf Objektträger (Super Frost Plus, Thermo-Scientific) und anschließende Trocknung
- Eindecken der Objektträger mit Mowiol (Hoechst, Frankfurt-Höchst, Deutschland)

6.5.2. Verfahren zur Bestimmung der Faserdichte

Zur Bestimmung der Faserdichte wurde das Programm ImageJ verwendet. Es wurde randomisiert ein quadratisches Gitternetz (Maschenweite: 10µm) über das Bild gelegt (siehe Abb. 24 A). Zur Zählung diente anschließend ein Quadrat auf diesem Gitternetz, welches eine definierte Seitenlänge (L= 80µm) hatte (Russ und Dehoff, 1999).

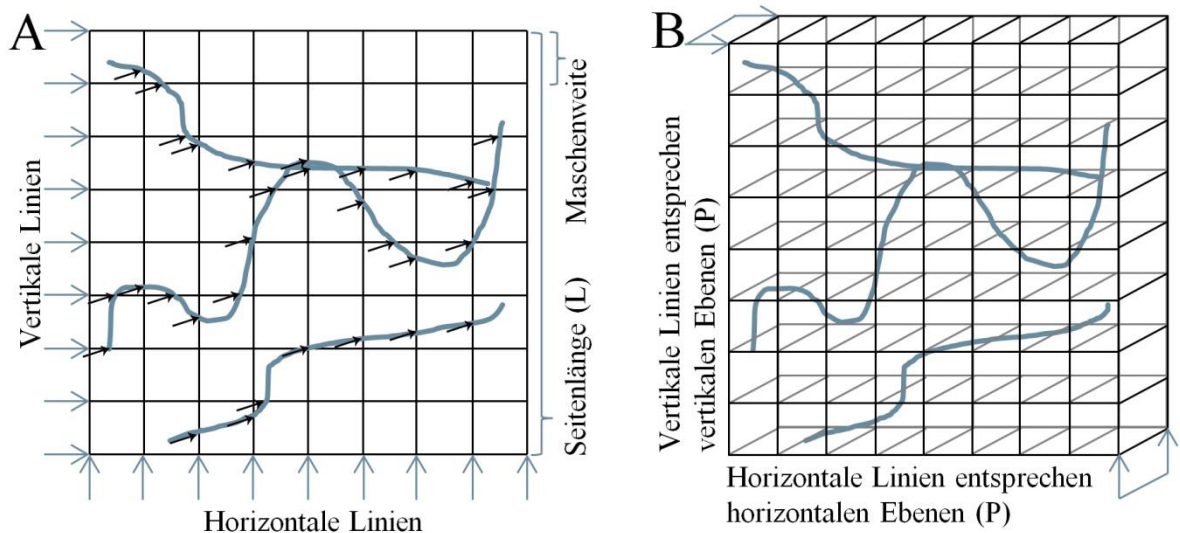


Abb. 24: Zählgitter zur Faserdichtebestimmung

A: Die Pfeile markieren gezählte Schnittpunkte der Fasern mit dem Gitter. B: Dreidimensionales Gitter zur zweidimensionalen Zählung.

Um eine zweidimensionale Zählung in ein dreidimensionales Modell übertragen zu können, entsprachen horizontale/vertikale Linien jeweils horizontalen/vertikalen Ebenen der Region (siehe Abb. 24 B). Diese Linien sowie die Seiten des Quadrates ($n=9$) ergaben die Anzahl der Ebenen (P), die daher zweimal vorhanden waren ($2 \cdot P$). Die Fläche des Gebietes errechnete sich aus folgender Formel:

$$A=L \cdot 2 \cdot P$$

Formel 3: Flächenberechnung zur Faserdichtebestimmung

L, Seitenlänge; P, Ebene; A, Fläche (Russ und Dehoff, 1999).

Somit ergab sich eine Fläche von $1440 \mu\text{m}^2$. Im Rahmen der Zählung von Schnittpunkten war nun zu berücksichtigen, dass es eine Beziehung zwischen der Anzahl von Punkten in einer Einheitsfläche (P_A , Punkte/ μm^2) und der spezifischen Linienlänge in einem Einheitsvolumen (L_V , $\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$) gab. Das beinhaltete folgende Formel:

$$P_A = \frac{1}{2} \cdot L_V = \frac{n}{A}$$

Formel 4: Die Einheitsfläche P_A

A, Fläche; L_V , Linienlänge in einem Einheitsvolumen ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$); n, gezählte Schnittpunkte; P_A , Punkte in einer Einheitsfläche (Punkte/ μm^2 ; Russ und Dehoff, 1999).

6 Anhang

Stellte man diese Formel nun nach L_V um, erhielt man die geschätzte Länge in einem Volumen, welche der Faserdichte entsprach ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$):

$$L_V = 2 * P_A = 2 * \frac{n}{A}$$

Formel 5: Geschätzte Länge in einem Volumen L_V (Faserdichte)

A, Fläche; L_V , Linienlänge in einem Einheitsvolumen ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$); n, gezählte Schnittpunkte; P_A , Punkte in einer Einheitsfläche (Punkte/ μm^2 ; Russ und Dehoff, 1999).

6.5.3. Abbildungen

6.5.3.1. ChAT-IR Neurone und Faserdichten

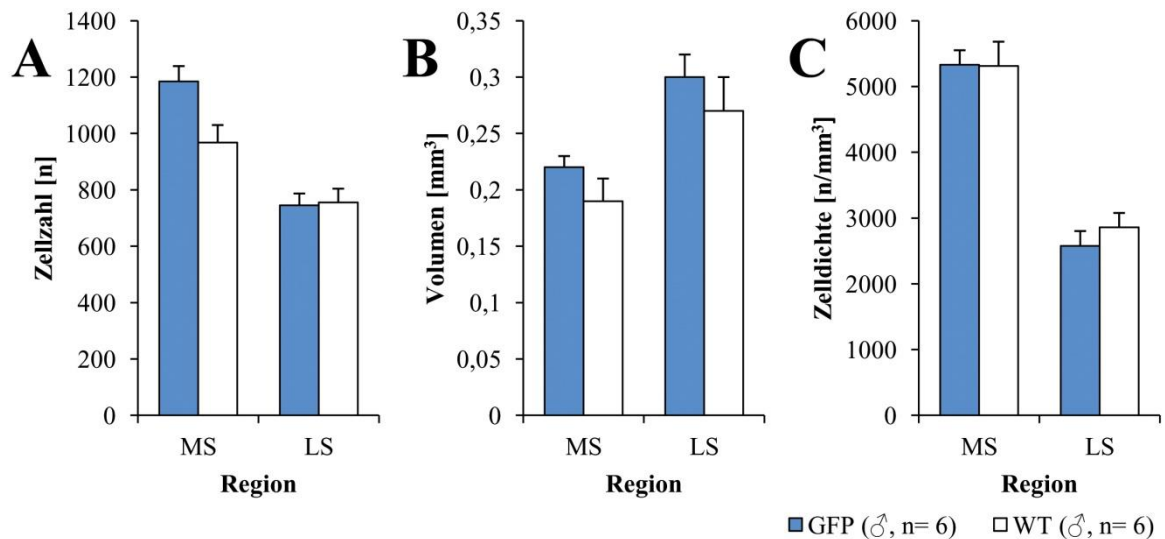


Abb. 25: ChAT-IR Neurone im Septum

Zellzahl [n] (A), Volumen [mm³] (B) und Zelldichte [n/mm³] (C) im medialen (MS) und lateralen Septum (LS) von GFP- und WT-Mäusen. Angaben in MW \pm SEM. Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Zwischensubjektfaktor GENOTYP (zwei Stufen: GFP, WT) und Innersubjektfaktor REGION (zwei Stufen: MS, LS)). Post-hoc-Test: Welch-Tests mit Bonferroni-Holm-Adjustierung.

6 Anhang

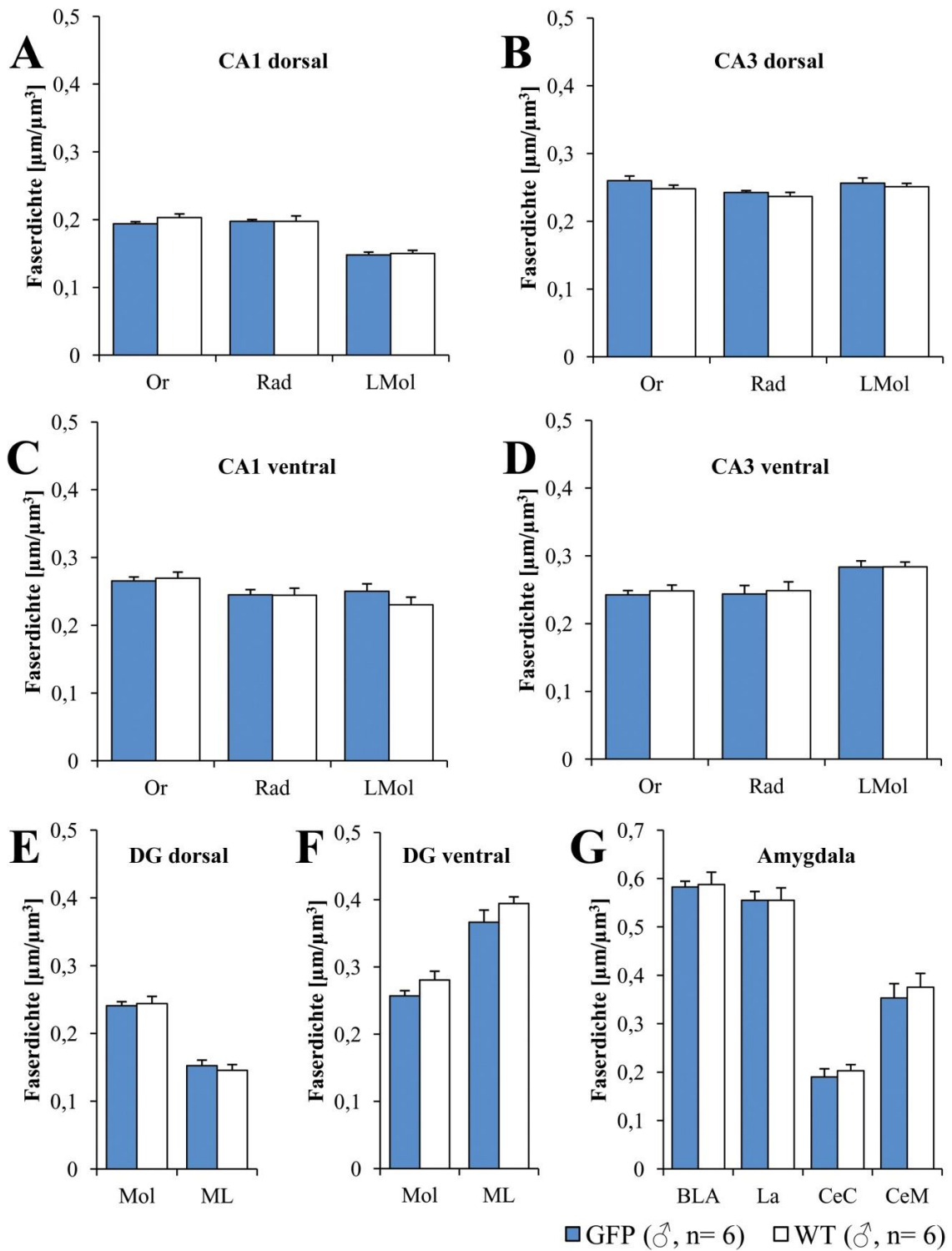


Abb. 26: ChAT-IR Faserdichten in Hippokampus und Amygdala

Dargestellt sind die Faserdichten [$\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$] der Schichten der CA1 (A) und CA3 (B) des dorsalen Hippokampus, der CA1 (C) und CA3 (D) des ventralen Hippokampus, des dorsalen (E) und ventralen (F) Gyrus dentatus sowie der Amygdala (G) von GFP- und WT-Mäusen. Angaben in MW \pm SEM. Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Innersubjektfaktor SCHICHT (Hippokampus: drei Stufen CA1+3 (Or, Rad, LMol), Amygdala: vier Stufen (BLA, La, CeC, CeM) und DG: zwei Stufen (Mol, ML) und Zwischensubjektfaktor GENOTYP (zwei Stufen: GFP, WT)). Post-hoc-Test: Welch-Tests mit Bonferroni-Holm-Adjustierung.

6.5.3.2. TH-IR Neurone und Faserdichten

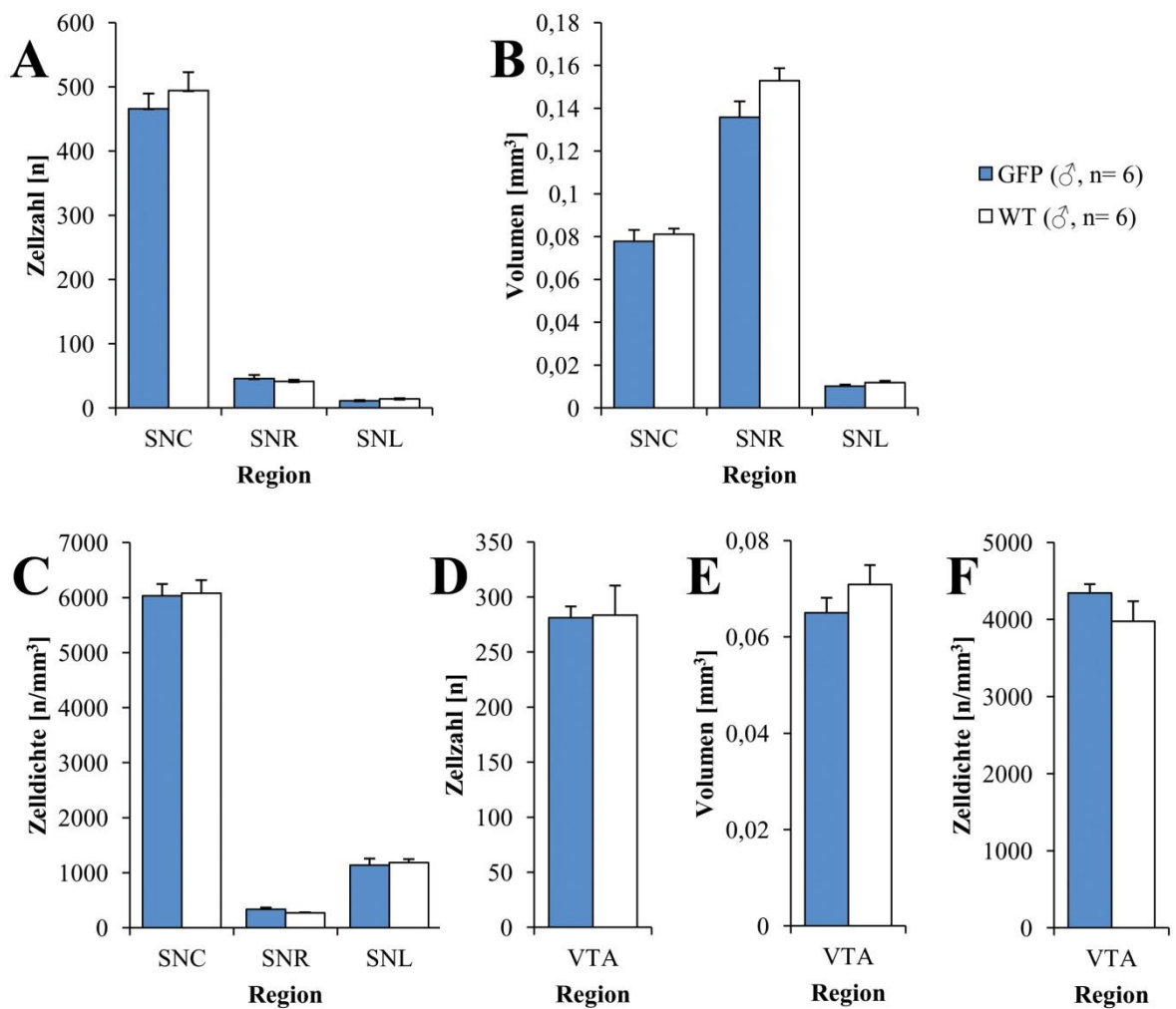


Abb. 27: TH-IR Neurone in Substantia nigra und VTA

Zellzahl [n] (A), Volumen [mm³] (B) und Zelldichte [n/mm³] (C) der Subregionen der Substantia nigra von GFP- und WT-Mäusen. Zellzahl [n] (D), Volumen [mm³] (E) und Zelldichte [n/mm³] (F) der VTA von GFP- und WT-Mäusen. Angaben in MW ± SEM. A-C: Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Innersubjektfaktor REGION (drei Stufen: SNC, SNR, SNL) und Zwischensubjektfaktor GENOTYP (zwei Stufen: GFP, WT)). D-F: T-Tests. Post-hoc-Test: Welch-Test mit Bonferroni-Holm-Adjustierung.

6 Anhang

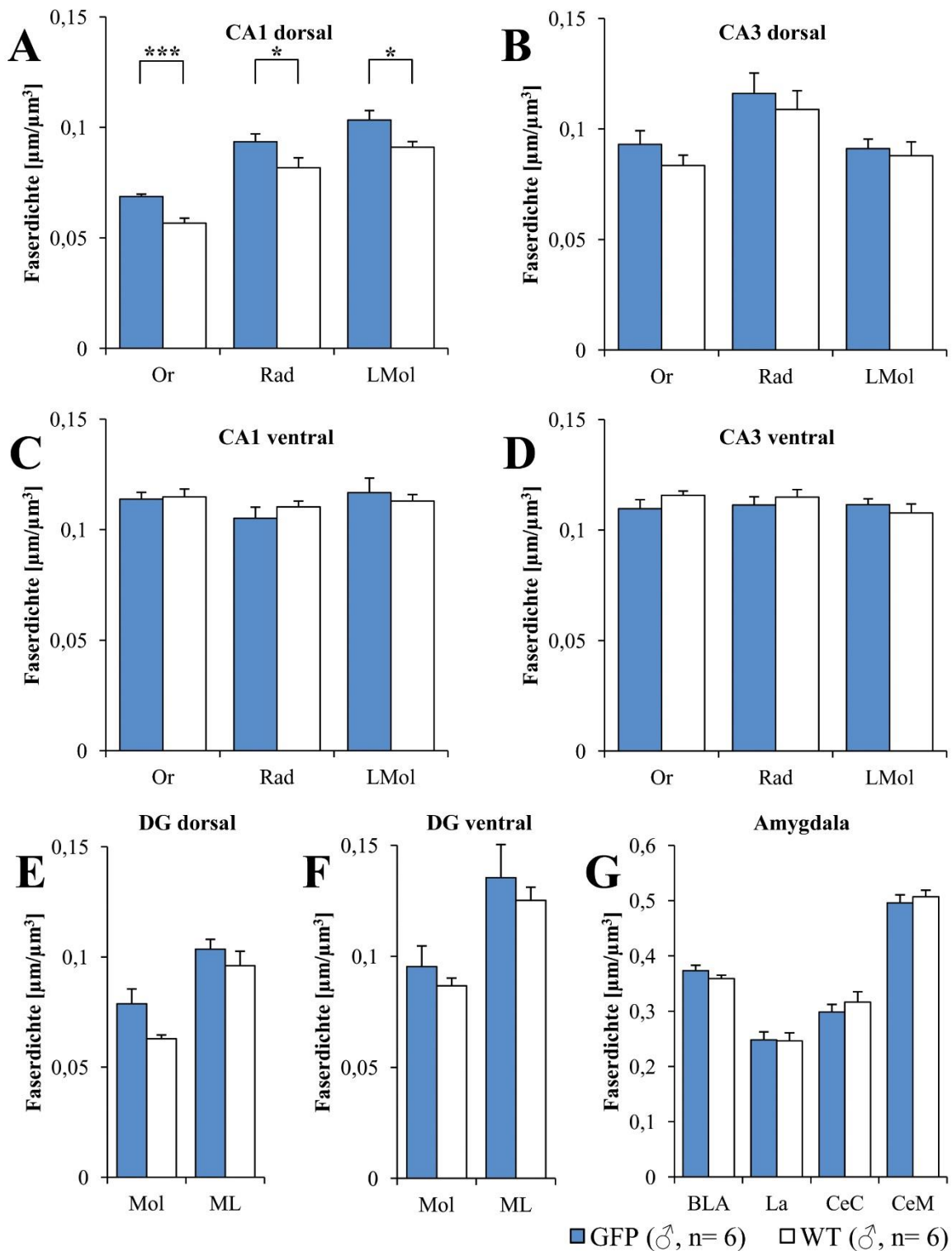


Abb. 28: TH-IR Faserdichten in Hippokampus und Amygdala

Dargestellt sind die Faserdichten [$\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$] der Schichten der CA1 (A) und CA3 (B) des dorsalen Hippokampus, der CA1 (C) und CA3 (D) des ventralen Hippokampus, des dorsalen (E) und ventralen (F) Gyrus dentatus sowie der Amygdala (G) von GFP- und WT-Mäusen. Angaben in MW \pm SEM. Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Innersubjektfaktor SCHICHT (Hippokampus: drei Stufen CA1+3 (Or, Rad, LMol), Amygdala: vier Stufen (BLA, La, CeC, CeM) und DG: zwei Stufen (Mol, ML) und Zwischensubjektfaktor GENOTYP (zwei Stufen: GFP, WT)). Post-hoc-Test: Welch-Tests mit Bonferroni-Holm-Adjustierung. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

6.5.3.3. 5-HT-IR Neurone und Faserdichten

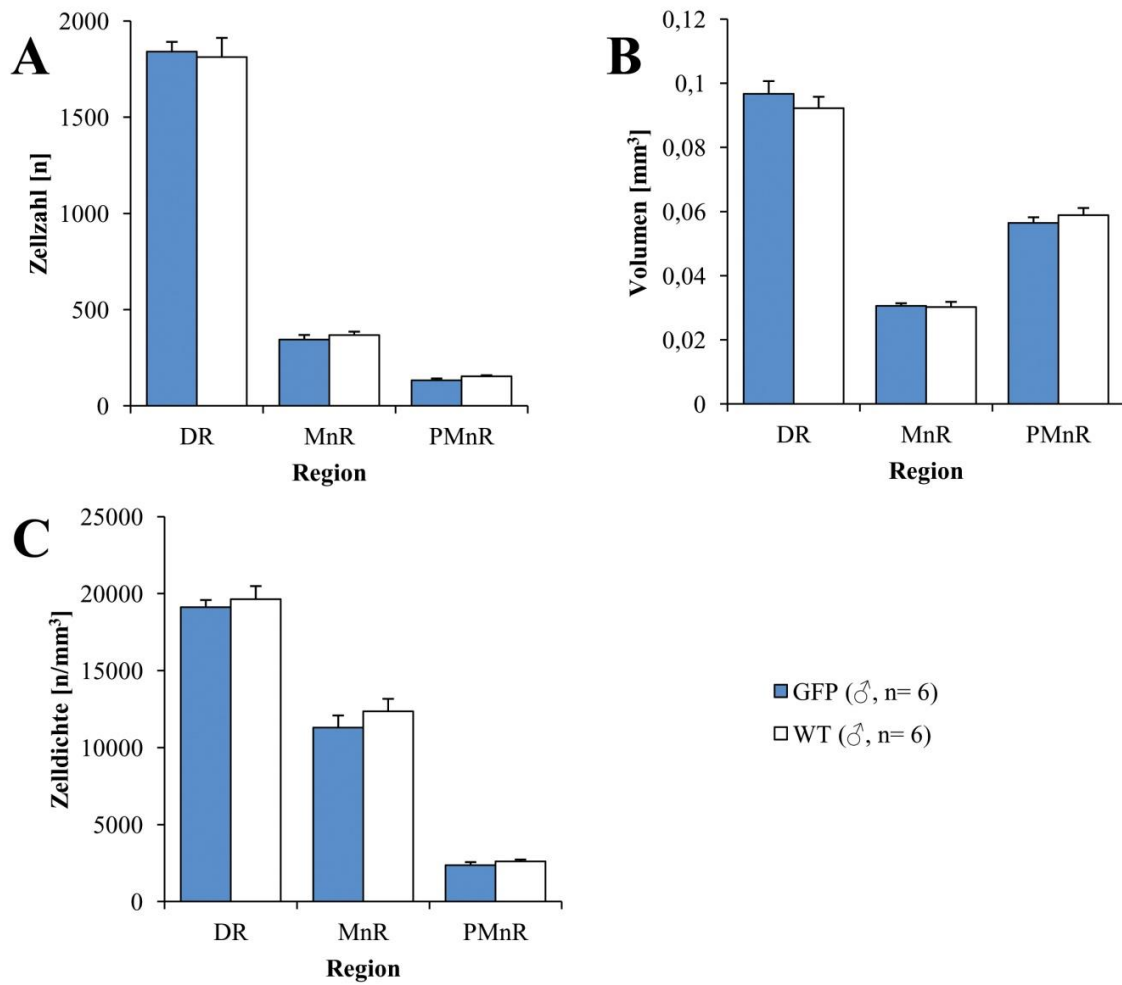


Abb. 29: 5-HT-IR Neurone in den Raphekernen

Zellzahl [n] (A), Volumen [mm³] (B) und Zelldichte [n/mm³] (C) der untersuchten Raphekern von GFP- und WT-Mäusen. Angaben in MW ± SEM. Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Innersubjektfaktor REGION (drei Stufen: DR, MnR, PMnR) und Zwischensubjektfaktor GENOTYP (zwei Stufen: GFP, WT)). Post-hoc-Test: Welch-Tests mit Bonferroni-Holm-Adjustierung.

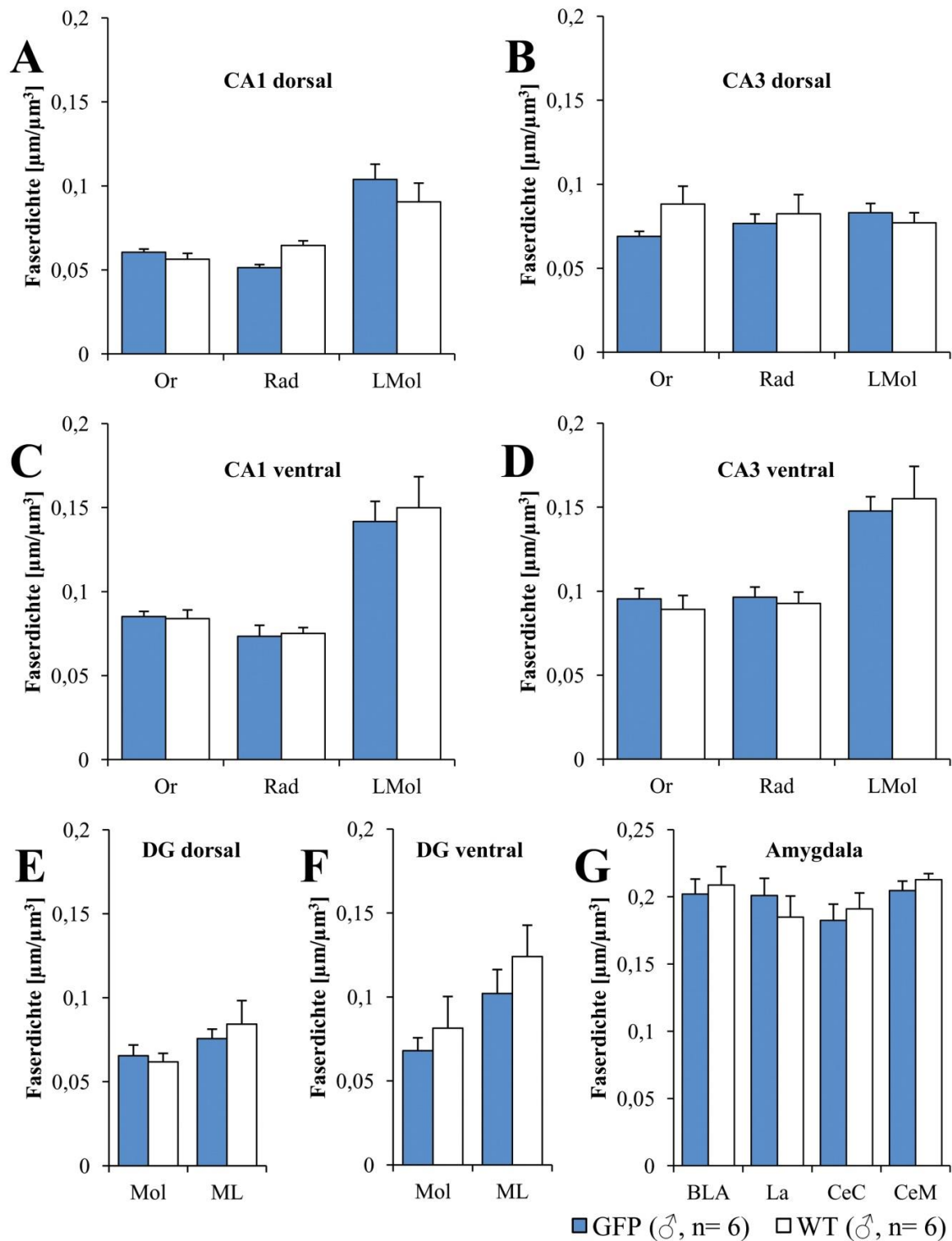


Abb. 30: 5-HT-IR Faserdichten in Hippokampus und Amygdala

Dargestellt sind die Faserdichten [$\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$] der Schichten der CA1 (A) und CA3 (B) des dorsalen Hippokampus, der CA1 (C) und CA3 (D) des ventralen Hippokampus, des dorsalen (E) und ventralen (F) Gyrus dentatus sowie der Amygdala (G) von GFP- und WT-Mäusen. Angaben in MW \pm SEM. Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung (Innersubjektfaktor SCHICHT (Hippokampus: drei Stufen CA1+3 (Or, Rad, LMol), Amygdala: vier Stufen (BLA, La, CeC, CeM) und DG: zwei Stufen (Mol, ML) und Zwischensubjektfaktor GENOTYP (zwei Stufen: GFP, WT)). Post-hoc-Test: Welch-Tests mit Bonferroni-Holm-Adjustierung.

6.5.3.4. Neuronale Verschaltungen der ASR und der PPI

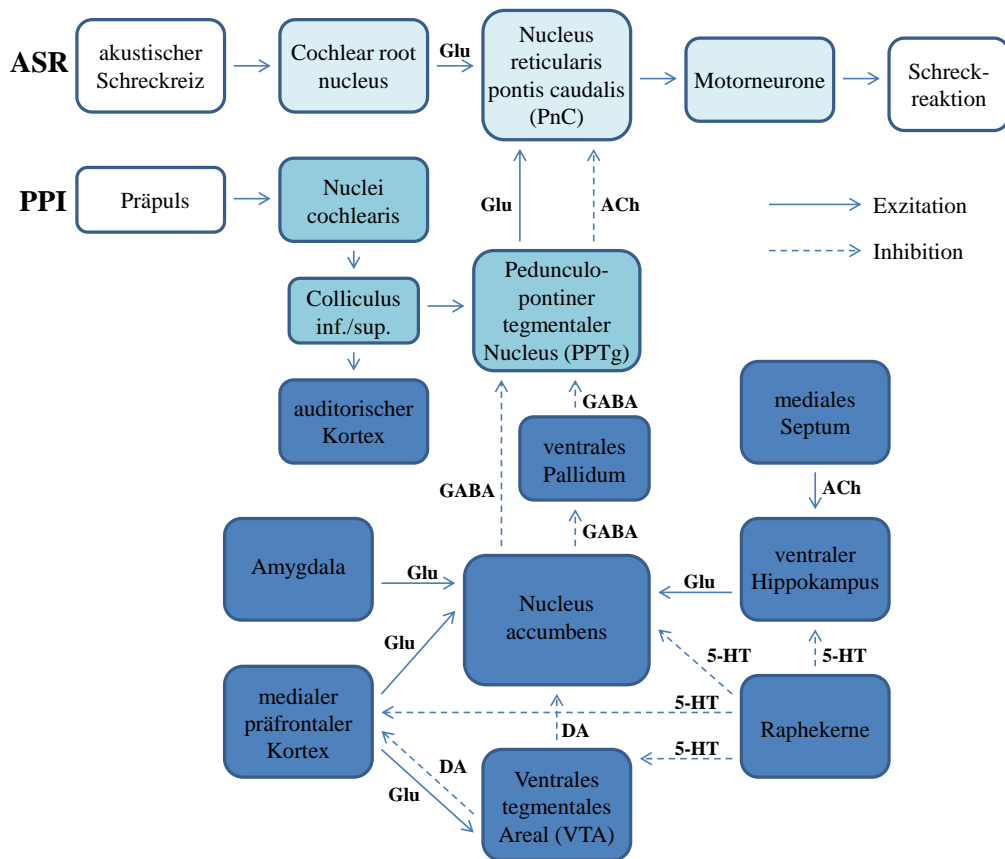


Abb. 31: Neuronale Verschaltungen der akustischen Schreckreaktion und der Präpulsinhibition

Die Grafik zeigt die hypothetische neuronale Verschaltung der akustischen Schreckreaktion (ASR) und der Präpulsinhibition (PPI). **ASR:** Über den Hörnerv wird der sensorische Input zum Cochlear root nucleus weitergeleitet und verläuft anschließend über den Lemniscus lateralis zum Nucleus reticularis pontis caudalis (PnC). Dieser hat Projektionen auf spinale Inter- und Motorneurone und generiert somit eine motorische Antwort. Dabei scheint der PnC als Empfänger für inhibitorische und exzitatorische Afferenzen anderer Hirnstrukturen sehr wichtig zu sein, welche wiederum die ASR modulieren. **PPI:** Die Präpulsinformation gelangt über die Hörbahn mit den Colliculi inferiores und superiores zum pedunculo-pontinen tegmentalen Nucleus (PPTg). Es kommt durch die Ausschüttung von ACh zur herabgesetzten Erregbarkeit der Neurone im PnC, wodurch der Präpuls die Verarbeitung des Schreckreizes unterdrückt (Koch et al., 1999). Im Nucleus accumbens fließen Informationen übergeordneter Hirnregionen zusammen. So erreichen ihn dopaminerge Afferenzen aus der VTA, serotonerge aus den Raphekernen sowie glutamaterge aus der Amygdala, dem medialen präfrontalen Kortex und dem ventralen Hippokampus. Zudem hat der Nucleus accumbens inhibitorische GABAerge Efferenzen zum ventralen Pallidum und zum PPTg. Dunkelblau: PPI-modulierende Hirnregionen; hellblau: Hirnstrukturen des PPI-Schaltkreises; grau: Hirnstrukturen der akustischen Schreckreaktion; weiß: sensorischer Input sowie Resultat. Abkürzungen: 5-HT, Serotonin; ACh, Acetylcholin; DA, Dopamin; GABA, γ -Aminobuttersäure; Glu, Glutamat; inf., inferior; sup., superior (nach Koch et al., 1999).

6 Anhang

6.5.4. Tabellen

Tabellenbeschriftung allgemein

n.s.	nicht signifikant
df	Anzahl der Freiheitsgrade
MW	Mittelwert
SEM	Standardfehler der Mittelwerte

signifikante p-Werte werden fett hervorgehoben (z.B. **p<0,01**)

Legende und Erläuterungen der in den Tabellen verwendeten Abkürzungen

Soziale Interaktion im Offenfeld (Tab. 6-11)

Laufstrecke [cm]	Gesamtlaufstrecke in Zentimetern
Abstand [cm]	mittlerer Abstand der Tiere zueinander in Zentimetern
Kontaktanzahl automat. [n]	Anzahl der automatisch gezählten Kontakte
aktive SI [%]	Dauer der aktiven sozialen Interaktion prozentual zur Versuchszeit
passive SI [%]	Dauer der passiven sozialen Interaktion prozentual zur Versuchszeit
Kontaktzeit [%]	in Kontakt verbrachte Zeit in Prozent der Versuchszeit
Schnüffeln [n]	Anzahl des normalen Beschnüffeln der Versuchspartner
anogenital. Schnüffeln [n]	Anzahl des anogenitalen Beschnüffeln der Versuchspartner
Folgen [n]	Anzahl des Verfolgens des Versuchspartners
Aggressivität [n]	Anzahl aggressiver Kontakte
Faeces-Boli [n]	Anzahl der Defäkationen im Versuch
Kontaktanzahl [n]	Anzahl der Kontakte
Aufstellen Mitte [n]	Anzahl des Aufstellens in der Mitte der Box
Aufstellen Rand [n]	Anzahl des Aufstellens am Rand der Box
Putzen [n]	Anzahl des Putzens
Latenz [sec]	Dauer bis zum ersten Kontakt in Sekunden
freundliche Kontakte [n]	Anzahl freundlicher Kontakte
freundliche Kontakte [%]	in freundlichem Kontakt verbrachte Zeit in Prozent der Versuchszeit
aggressive Kontakte [n]	Anzahl aggressiver Kontakte
aggressive Kontakte [%]	in aggressivem Kontakt verbrachte Zeit in Prozent der Versuchszeit
Aufenthalt Mitte [%]	prozentualer mittlerer Aufenthalt in der Mitte der Box
Aufenthalt Rand [%]	prozentualer mittlerer Aufenthalt am Rand der Box

Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion (Tab. 12-23)

NOSTIM	kein Stimulus, Messung bei Hintergrundrauschen
PREPULSE	alleinige Darbietung des Präpulses bei 10kHz und 75dB SPL
PULSE-ALONE	alleinige Darbietung des Startle-Stimulus
PREPULSE+PULSE	Darbietung des Startle-Stimulus mit vorausgehendem Präpuls
PPI	Präpulsinhibition der akustischen Startle-Reaktion

6 Anhang

Forced Swim Test (Tab. 24-25)

Latenz [sec]	Dauer bis zur ersten Immobilitätsphase in Sekunden
Klettern [sec]	Dauer des Kletterns am Glasrand in Sekunden
aktives Schwimmen [sec]	Dauer des aktiven Schwimmens im Glas in Sekunden
Mobilität [sec]	Dauer von Klettern und Schwimmen in Sekunden
immobiles Treiben [sec]	Dauer des immobilen Treibens auf dem Wasser in Sekunden
Klettern [n]	Anzahl des Kletterns am Glasrand
aktives Schwimmen [n]	Anzahl des aktiven Schwimmens im Glas
immobiles Treiben [n]	Anzahl des immobilen Treibens auf dem Wasser
Faeces-Boli [n]	Anzahl der Defäkationen im Versuch

Immunhistochemische Untersuchungen

Immunhistochemie der septalen Region (Tab. 26)

ChAT	Cholin-Acetyl-Transferase
MS	Mediales Septum
LS	Laterales Septum
NBM	Nucleus basalis magnocellularis

Immunhistochemie der Substantia nigra und der Area tegmentalis ventralis (Tab. 27)

TH	Tyrosinhydroxylase
SNC	Substantia nigra pars compacta
SNR	Substantia nigra pars reticularis
SNL	Substantia nigra pars lateralis
VTA	Area tegmentalis ventralis

Immunhistochemie der Raphekerne (Tab. 28)

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
DR	Nucleus raphe dorsalis
MnR	Nucleus raphe medianus
PMnR	Nucleus raphe paramedianus

Immunhistochemie der Hippokampusformation und der Amygdala (Tab. 29-31)

CA1-3	Cornu amonis Region 1-3
Or	Stratum oriens
Rad	Stratum radiatum
LMol	Stratum lacunosum-moleculare
DG	Gyrus dentatus
DG Mol	Stratum moleculare des Gyrus dentatus
DG ML	Stratum multiforme des Gyrus dentatus (Hilus)
BLA	Basolaterale Amygdala
CeC	Core Region der zentralen Amygdala
CeM	Medialer Teil der zentralen Amygdala
La	Laterale Amygdala

6.5.4.1. Tabellen zu Parametern der sozialen Interaktion

Soziale Interaktion	GFP				WT			
	♀		♂		♀		♂	
	isoliert	nicht-isoliert	isoliert	nicht-isoliert	isoliert	nicht-isoliert	isoliert	nicht-isoliert
freundliche Kontakte [n]	36,83±4,45	39,00±2,57	48,89±3,13	45,78±3,02	39,33±2,20	43,00±4,31	47,13±2,99	44,40±2,55
freundliche Kontakte [%]	17,54±2,20	13,48±1,24	17,27±1,45	15,20±2,08	27,24±7,57	16,05±1,89	22,10±1,95	20,15±2,92
aggressive Kontakte [n]	0,00±0,00	0,40±0,27	5,44±2,89	0,11±0,11	0,00±0,00	0,00±0,00	3,38±1,71	0,10±0,10
aggressive Kontakte [%]	0,00±0,00	0,15±0,12	2,62±2,20	0,05±0,05	0,00±0,00	0,00±0,00	3,40±2,36	0,03±0,03
Abstand [cm]	38,56±0,69	35,54±0,98	34,33±1,91	34,27±1,26	31,98±3,43	35,75±1,04	28,99±1,55	33,40±1,61
aktive SI [%]	25,84±1,34	29,81±1,69	30,25±3,20	32,23±2,08	33,43±3,59	31,70±1,94	35,69±2,47	34,61±3,38
passive SI [%]	1,87±1,87	0,01±0,01	2,23±0,96	1,03±0,70	5,66±4,33	0,30±0,25	6,04±1,37	0,62±0,29
Schnüffeln [n]	20,50±2,45	19,80±1,87	29,78±2,99	17,56±1,09	25,50±2,88	20,00±2,24	30,88±2,37	16,30±0,94
anogenit. Schnüffeln [n]	10,50±1,06	14,50±1,44	25,56±4,33	17,67±1,53	11,50±1,48	14,33±3,04	27,13±4,72	20,40±2,13
Folgen [n]	1,00±0,52	1,30±0,58	6,44±2,68	2,78±0,60	2,50±0,76	1,50±0,43	6,63±2,26	3,80±0,89
Aggressivität [n]	0,00±0,00	0,20±0,20	8,67±7,43	0,11±0,11	0,00±0,00	0,00±0,00	4,00±2,31	0,10±0,10
Faeces-Boli [n]	2,17±0,70	2,80±0,76	3,00±0,82	1,44±0,44	1,33±0,80	2,67±0,84	2,25±0,86	1,70±0,47
Aufstellen Mitte [n]	9,67±2,01	12,10±2,06	6,67±1,88	18,56±2,78	11,50±3,68	7,17±2,01	8,38±1,85	10,40±0,98
Aufstellen Rand [n]	34,50±3,63	51,70±2,65	42,56±5,39	44,11±3,73	34,67±4,90	43,00±5,37	32,75±3,21	41,70±4,20
Putzen [n]	3,50±0,56	5,20±0,87	5,78±1,02	2,67±0,44	4,00±0,37	3,00±0,45	5,75±1,13	3,00±0,45
Latenz [sec]	25,00±6,00	31,70±11,04	30,78±4,62	18,78±4,98	8,00±2,66	41,67±9,63	29,75±4,82	27,30±5,31
Laufstrecke [cm]	4745,53±472,86	5087,38±164,69	5908,99±412,16	5624,08±328,61	5125,05±516,10	5138,75±425,34	4730,71±213,57	5698,02±465,60
Aufenthalt Mitte [%]	8,22±0,82	16,19±1,69	16,25±1,88	17,46±1,67	10,29±2,35	14,61±1,08	19,44±3,06	15,93±1,32
Aufenthalt Rand [%]	91,54±0,85	83,32±1,71	83,25±1,93	82,06±1,65	89,38±2,39	84,99±1,07	80,14±3,09	83,72±1,33

Tab. 6: Mittelwerte der Versuche zur sozialen Interaktion

Statistik: Mittelwert ± SEM.

6 Anhang

Soziale Interaktion Parameter	Dreifaktorielle ANOVA		
	GENOTYP	GESCHLECHT	BEHANDLUNG
freundliche Kontakte [n]	F(1; 56)= 0,14; n.s.	F(1; 56)= 9,69; p<0,01	F(1; 56)= 0,00; n.s.
freundliche Kontakte [%]	F(1; 56)= 7,32; p<0,01	F(1; 56)= 0,00; n.s.	F(1; 56)= 5,58; p<0,05
aggressive Kontakte [n]	F(1; 56)= 0,43; n.s.	F(1; 56)= 5,16; p<0,05	F(1; 56)= 4,67; p<0,05
aggressive Kontakte [%]	F(1; 56)= 0,03; n.s.	F(1; 56)= 2,86; n.s.	F(1; 56)= 2,72; n.s.
Abstand [cm]	F(1; 56)= 6,90; p<0,05	F(1; 56)= 5,10; p<0,05	F(1; 56)= 1,14; n.s.
aktive SI [%]	F(1; 56)= 4,96; p<0,05	F(1; 56)= 2,38; n.s.	F(1; 56)= 0,16; n.s.
passive SI [%]	F(1; 56)= 3,38; n.s.	F(1; 56)= 0,26; n.s.	F(1; 56)= 11,57; p<0,01
Schnüffeln [n]	F(1; 56)= 0,67; n.s.	F(1; 56)= 2,01; n.s.	F(1; 56)= 28,86; p<0,001
anogenit. Schnüffeln [n]	F(1; 56)= 0,38; n.s.	F(1; 56)= 22,79; p<0,001	F(1; 56)= 0,87; n.s.
Folgen [n]	F(1; 56)= 0,47; n.s.	F(1; 56)= 9,92; p<0,01	F(1; 56)= 2,88; n.s.
Aggressivität [n]	F(1; 56)= 0,30; n.s.	F(1; 56)= 2,01; n.s.	F(1; 56)= 1,88; n.s.
Faeces-Boli [n]	F(1; 56)= 0,49; n.s.	F(1; 56)= 0,08; n.s.	F(1; 56)= 0,00; n.s.
Aufstellen Mitte [n]	F(1; 56)= 2,30; n.s.	F(1; 56)= 0,32; n.s.	F(1; 56)= 3,64; n.s.
Aufstellen Rand [n]	F(1; 56)= 2,93; n.s.	F(1; 56)= 0,05; n.s.	F(1; 56)= 8,82; p<0,01
Putzen [n]	F(1; 56)= 0,39; n.s.	F(1; 56)= 0,45; n.s.	F(1; 56)= 5,35; p<0,05
Latenz [sec]	F(1; 56)= 0,00; n.s.	F(1; 56)= 0,00; n.s.	F(1; 56)= 1,62; n.s.
Laufstrecke [cm]	F(1; 56)= 0,38; n.s.	F(1; 56)= 2,88; n.s.	F(1; 56)= 0,89; n.s.
Aufenthalt Mitte [%]	F(1; 56)= 0,15; n.s.	F(1; 56)= 12,99; p<0,01	F(1; 56)= 3,32; n.s.
Aufenthalt Rand [%]	F(1; 56)= 0,12; n.s.	F(1; 56)= 13,02; p<0,01	F(1; 56)= 3,37; n.s.

Tab. 7: Genotypen-, Geschlechts- und Behandlungsunterschiede der sozialen Interaktion (Teil 1)

Die Tabelle zeigt Effekte der Zwischensubjektfaktoren (GENOTYP, GESCHLECHT und BEHANDLUNG) der dreifaktoriellen multivariaten ANOVA.

Soziale Interaktion Parameter	Dreifaktorielle ANOVA			
	GENOTYP x GESCHL.	GENOTYP x BEH.	GESCHL. x BEH.	GENOTYP x GESCHL. x BEH.
freundliche Kontakte [n]	F(1; 56)= 1,15; n.s.	F(1; 56)= 0,04; n.s.	F(1; 56)= 1,68; n.s.	F(1; 56)= 0,02; n.s.
freundliche Kontakte [%]	F(1; 56)= 0,09; n.s.	F(1; 56)= 0,74; n.s.	F(1; 56)= 1,90; n.s.	F(1; 56)= 0,79; n.s.
aggressive Kontakte [n]	F(1; 56)= 0,20; n.s.	F(1; 56)= 0,19; n.s.	F(1; 56)= 5,62; p<0,05	F(1; 56)= 0,42; n.s.
aggressive Kontakte [%]	F(1; 56)= 0,07; n.s.	F(1; 56)= 0,07; n.s.	F(1; 56)= 3,01; n.s.	F(1; 56)= 0,03; n.s.
Abstand [cm]	F(1; 56)= 0,00; n.s.	F(1; 56)= 5,52; p<0,05	F(1; 56)= 0,56; n.s.	F(1; 56)= 0,24; n.s.
aktive SI [%]	F(1; 56)= 0,05; n.s.	F(1; 56)= 1,27; n.s.	F(1; 56)= 0,03; n.s.	F(1; 56)= 0,12; n.s.
passive SI [%]	F(1; 56)= 0,03; n.s.	F(1; 56)= 3,60; n.s.	F(1; 56)= 0,02; n.s.	F(1; 56)= 0,03; n.s.
Schnüffeln [n]	F(1; 56)= 0,76; n.s.	F(1; 56)= 1,36; n.s.	F(1; 56)= 11,25; p<0,01	F(1; 56)= 0,16; n.s.
anogenit. Schnüffeln [n]	F(1; 56)= 0,17; n.s.	F(1; 56)= 0,00; n.s.	F(1; 56)= 6,58; p<0,05	F(1; 56)= 0,08; n.s.
Folgen [n]	F(1; 56)= 0,01; n.s.	F(1; 56)= 0,01; n.s.	F(1; 56)= 1,87; n.s.	F(1; 56)= 0,26; n.s.
Aggressivität [n]	F(1; 56)= 0,25; n.s.	F(1; 56)= 0,25; n.s.	F(1; 56)= 2,00; n.s.	F(1; 56)= 0,30; n.s.
Faeces-Boli [n]	F(1; 56)= 0,05; n.s.	F(1; 56)= 0,67; n.s.	F(1; 56)= 3,84; n.s.	F(1; 56)= 0,02; n.s.
Aufstellen Mitte [n]	F(1; 56)= 0,28; n.s.	F(1; 56)= 6,98; p<0,05	F(1; 56)= 6,31; p<0,05	F(1; 56)= 0,24; n.s.
Aufstellen Rand [n]	F(1; 56)= 0,09; n.s.	F(1; 56)= 0,02; n.s.	F(1; 56)= 1,53; n.s.	F(1; 56)= 1,80; n.s.
Putzen [n]	F(1; 56)= 0,81; n.s.	F(1; 56)= 1,10; n.s.	F(1; 56)= 8,65; p<0,01	F(1; 56)= 1,88; n.s.
Latenz [sec]	F(1; 56)= 0,51; n.s.	F(1; 56)= 3,21; n.s.	F(1; 56)= 7,24; p<0,01	F(1; 56)= 0,73; n.s.
Laufstrecke [cm]	F(1; 56)= 1,95; n.s.	F(1; 56)= 0,71; n.s.	F(1; 56)= 0,09; n.s.	F(1; 56)= 2,07; n.s.
Aufenthalt Mitte [%]	F(1; 56)= 0,05; n.s.	F(1; 56)= 2,32; n.s.	F(1; 56)= 7,08; p<0,05	F(1; 56)= 0,04; n.s.
Aufenthalt Rand [%]	F(1; 56)= 0,03; n.s.	F(1; 56)= 2,39; n.s.	F(1; 56)= 7,29; p<0,01	F(1; 56)= 0,03; n.s.

Tab. 8: Genotypen-, Geschlechts- und Behandlungsunterschiede der sozialen Interaktion (Teil 2)

Die Tabelle zeigt Interaktionen der Zwischensubjekt Faktoren (GENOTYP, GESCHLECHT und BEHANDLUNG) der dreifaktoriellen multivariaten ANOVA. Abkürzungen: GESCHL., GESCHLECHT; BEH., BEHANDLUNG.

6 Anhang

Soziale Interaktion Parameter	Zweifaktorielle ANOVA		
	GENOTYP	BEHANDLUNG	GENOTYP x BEHANDLUNG
freundliche Kontakte [n]	F(1; 24)= 0,89; n.s.	F(1; 24)= 0,72; n.s.	F(1; 24)= 0,05; n.s.
freundliche Kontakte [%]	F(1; 24)= 2,86; n.s.	F(1; 24)= 4,40; p<0,05	F(1; 24)= 0,97; n.s.
aggressive Kontakte [n]	F(1; 24)= 1,00; n.s.	F(1; 24)= 1,00; n.s.	F(1; 24)= 1,00; n.s.
aggressive Kontakte [%]	F(1; 24)= 0,72; n.s.	F(1; 24)= 0,72; n.s.	F(1; 24)= 0,72; n.s.
Abstand [cm]	F(1; 24)= 3,35; n.s.	F(1; 24)= 0,05; n.s.	F(1; 24)= 3,79; n.s.
aktive SI [%]	F(1; 24)= 4,44; p<0,05	F(1; 24)= 0,25; n.s.	F(1; 24)= 0,22; n.s.
passive SI [%]	F(1; 24)= 0,99; n.s.	F(1; 24)= 3,11; n.s.	F(1; 24)= 0,40; n.s.
Schnüffeln [n]	F(1; 24)= 1,21; n.s.	F(1; 24)= 1,72; n.s.	F(1; 24)= 1,03; n.s.
anogenit. Schnüffeln [n]	F(1; 24)= 0,05; n.s.	F(1; 24)= 3,32; n.s.	F(1; 24)= 0,10; n.s.
Folgen [n]	F(1; 24)= 1,89; n.s.	F(1; 24)= 0,32; n.s.	F(1; 24)= 1,11; n.s.
Aggressivität [n]	F(1; 24)= 0,44; n.s.	F(1; 24)= 0,44; n.s.	F(1; 24)= 0,44; n.s.
Faeces-Boli [n]	F(1; 24)= 0,35; n.s.	F(1; 24)= 1,45; n.s.	F(1; 24)= 0,18; n.s.
Aufstellen Mitte [n]	F(1; 24)= 0,37; n.s.	F(1; 24)= 0,14; n.s.	F(1; 24)= 1,78; n.s.
Aufstellen Rand [n]	F(1; 24)= 1,12; n.s.	F(1; 24)= 9,98; n.s.	F(1; 24)= 1,20; n.s.
Putzen [n]	F(1; 24)= 1,33; n.s.	F(1; 24)= 0,23; n.s.	F(1; 24)= 3,35; n.s.
Latenz [sec]	F(1; 24)= 0,13; n.s.	F(1; 24)= 4,34; p<0,05	F(1; 24)= 1,94; n.s.
Laufstrecke [cm]	F(1; 24)= 0,33; n.s.	F(1; 24)= 0,22; n.s.	F(1; 24)= 0,19; n.s.
Aufenthalt Mitte [%]	F(1; 24)= 0,02; n.s.	F(1; 24)= 12,68; p<0,01	F(1; 24)= 1,11; n.s.
Aufenthalt Rand [%]	F(1; 24)= 0,02; n.s.	F(1; 24)= 12,92; p<0,01	F(1; 24)= 1,19; n.s.

Tab. 9: Genotypen- und Behandlungsunterschiede der sozialen Interaktion weiblicher Tiere

Die Tabelle zeigt Effekte und Interaktionen der Faktoren GENOTYP und BEHANDLUNG der zweifaktoriellen multivariaten ANOVA.

Soziale Interaktion Parameter	Zweifaktorielle ANOVA		
	GENOTYP	BEHANDLUNG	GENOTYP x BEHANDLUNG
freundliche Kontakte [n]	F(1; 32)= 0,29; n.s.	F(1; 32)= 0,10; n.s.	F(1; 32)= 0,00; n.s.
freundliche Kontakte [%]	F(1; 32)= 4,74; p<0,05	F(1; 32)= 0,80; n.s.	F(1; 32)= 0,00; n.s.
aggressive Kontakte [n]	F(1; 32)= 0,40; n.s.	F(1; 32)= 6,92; p<0,05	F(1; 32)= 0,40; n.s.
aggressive Kontakte [%]	F(1; 32)= 0,06; n.s.	F(1; 32)= 3,84; n.s.	F(1; 32)= 0,07; n.s.
Abstand [cm]	F(1; 32)= 3,72; n.s.	F(1; 32)= 1,83; n.s.	F(1; 32)= 1,93; n.s.
aktive SI [%]	F(1; 32)= 1,81; n.s.	F(1; 32)= 0,02; n.s.	F(1; 32)= 0,28; n.s.
passive SI [%]	F(1; 32)= 3,86; n.s.	F(1; 32)= 14,61; p<0,01	F(1; 32)= 5,94; p<0,05
Schnüffeln [n]	F(1; 32)= 0,00; n.s.	F(1; 32)= 45,68; p<0,001	F(1; 32)= 0,35; n.s.
anogenit. Schnüffeln [n]	F(1; 32)= 0,42; n.s.	F(1; 32)= 4,81; p<0,05	F(1; 32)= 0,03; n.s.
Folgen [n]	F(1; 32)= 0,12; n.s.	F(1; 32)= 3,35; n.s.	F(1; 32)= 0,06; n.s.
Aggressivität [n]	F(1; 32)= 0,37; n.s.	F(1; 32)= 2,60; n.s.	F(1; 32)= 0,36; n.s.
Faeces-Boli [n]	F(1; 32)= 0,14; n.s.	F(1; 32)= 2,56; n.s.	F(1; 32)= 0,58; n.s.
Aufstellen Mitte [n]	F(1; 32)= 2,73; n.s.	F(1; 32)= 12,70; p<0,01	F(1; 32)= 6,38; p<0,05
Aufstellen Rand [n]	F(1; 32)= 2,03; n.s.	F(1; 32)= 1,50; n.s.	F(1; 32)= 0,74; n.s.
Putzen [n]	F(1; 32)= 0,04; n.s.	F(1; 32)= 13,73; p<0,01	F(1; 32)= 0,05; n.s.
Latenz [sec]	F(1; 32)= 0,56; n.s.	F(1; 32)= 2,09; n.s.	F(1; 32)= 0,91; n.s.
Laufstrecke [cm]	F(1; 32)= 2,07; n.s.	F(1; 32)= 0,79; n.s.	F(1; 32)= 2,67; n.s.
Aufenthalt Mitte [%]	F(1; 32)= 0,17; n.s.	F(1; 32)= 0,33; n.s.	F(1; 32)= 1,40; n.s.
Aufenthalt Rand [%]	F(1; 32)= 0,13; n.s.	F(1; 32)= 0,36; n.s.	F(1; 32)= 1,40; n.s.

Tab. 10: Genotypen- und Behandlungsunterschiede der sozialen Interaktion männlicher Tiere

Die Tabelle zeigt Effekte und Interaktionen der Faktoren GENOTYP und BEHANDLUNG der zweifaktoriellen multivariaten ANOVA.

Soziale Interaktion	t-Test (Welch-Test)												
	♀, isoliert			♂, isoliert			♀, nicht-isoliert			♂, nicht-isoliert			
	Parameter	T	df	Signifikanz	T	df	Signifikanz	T	df	Signifikanz	T	df	Signifikanz
freundliche Kontakte [n]	-0,50	10,00	n.s.	0,41	15,00	n.s.	-0,86	14,00	n.s.	0,35	17,00	n.s.	n.s.
freundliche Kontakte [%]	-1,23	5,84	n.s.	-2,02	15,00	n.s.	-1,19	14,00	n.s.	-1,35	17,00	n.s.	n.s.
aggressive Kontakte [n]	-	-	-	0,60	15,00	n.s.	1,50	9,00	n.s.	0,08	17,00	n.s.	n.s.
aggressive Kontakte [%]	-	-	-	-0,24	15,00	n.s.	0,97	14,00	n.s.	0,40	17,00	n.s.	n.s.
Abstand [cm]	1,88	5,41	n.s.	2,14	15,00	p<0,05	-0,14	14,00	n.s.	0,42	17,00	n.s.	n.s.
aktive SI [%]	-1,98	6,37	n.s.	-1,32	15,00	n.s.	-0,71	14,00	n.s.	-0,58	17,00	n.s.	n.s.
passive SI [%]	-0,80	10,00	n.s.	-2,32	15,00	p<0,05	-1,17	5,02	n.s.	0,56	17,00	n.s.	n.s.
Schnüffeln [n]	-1,32	10,00	n.s.	-0,28	15,00	n.s.	-0,07	14,00	n.s.	0,87	17,00	n.s.	n.s.
anogenit. Schnüffeln [n]	-0,55	10,00	n.s.	-0,25	15,00	n.s.	0,06	14,00	n.s.	-1,02	17,00	n.s.	n.s.
Folgen [n]	-1,63	10,00	n.s.	-0,05	15,00	n.s.	-0,24	14,00	n.s.	-0,93	17,00	n.s.	n.s.
Aggressivität [n]	-	-	-	0,57	15,00	n.s.	0,76	14,00	n.s.	0,08	17,00	n.s.	n.s.
Faeces-Boli [n]	0,78	10,00	n.s.	0,63	15,00	n.s.	0,11	14,00	n.s.	-0,39	17,00	n.s.	n.s.
Aufstellen Mitte [n]	-0,44	10,00	n.s.	-0,65	15,00	n.s.	1,60	14,00	n.s.	2,88	17,00	p<0,01	n.s.
Aufstellen Rand [n]	-0,03	10,00	n.s.	1,51	15,00	n.s.	1,63	14,00	n.s.	0,43	17,00	n.s.	n.s.
Putzen [n]	-0,75	10,00	n.s.	0,02	15,00	n.s.	1,86	14,00	n.s.	0,93	17,00	n.s.	n.s.
Latenz [sec]	2,59	10,00	p<0,05	0,15	15,00	n.s.	-0,62	14,00	n.s.	-1,16	17,00	n.s.	n.s.
Laufstrecke [cm]	-0,54	10,00	n.s.	2,44	15,00	p<0,05	-0,11	6,53	n.s.	-0,13	17,00	n.s.	n.s.
Aufenthalt Mitte [%]	-0,83	10,00	n.s.	-0,91	15,00	n.s.	0,67	14,00	n.s.	0,73	17,00	n.s.	n.s.
Aufenthalt Rand [%]	0,85	10,00	n.s.	0,87	15,00	n.s.	-0,70	14,00	n.s.	-0,79	17,00	n.s.	n.s.

Tab. 11: Genotypen-, Geschlechts- und Behandlungsunterschiede der sozialen Interaktion

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der t-Tests (Welch-Test).

6.5.4.2. Tabellen zur Präpulsinhibition bei einem Interpulsintervall von 100ms

PPI 100ms	GFP				WT			
	♀		♂		♀		♂	
	isoliert	nicht-isoliert	isoliert	nicht-isoliert	isoliert	nicht-isoliert	isoliert	nicht-isoliert
NOSTIM	0,40±0,10	0,46±0,10	0,24±0,03	0,25±0,03	0,34±0,03	0,25±0,02	0,29±0,04	0,21±0,02
PREPULSE	0,53±0,12	0,71±0,19	0,62±0,11	0,74±0,20	0,65±0,15	0,44±0,08	0,74±0,22	0,59±0,15
PULSE ALONE 93	10,48±1,86	9,56±1,59	14,86±1,37	14,65±1,44	11,32±1,85	12,45±1,77	15,87±2,36	20,72±2,46
PULSE ALONE 107	24,61±5,62	14,50±2,10	29,11±2,07	29,84±2,17	20,52±2,65	22,52±4,11	28,12±3,18	36,08±3,30
PULSE ALONE 113	24,39±4,64	18,09±2,52	33,90±1,95	32,67±3,05	23,75±3,00	22,96±4,46	30,83±3,66	40,40±3,61
PREPULSE+PULSE 93	3,05±0,72	2,66±0,51	3,04±0,59	3,51±0,66	3,39±0,94	4,95±1,47	4,08±1,26	6,41±1,52
PREPULSE+PULSE 107	9,73±2,03	6,52±1,21	11,75±1,31	12,33±2,14	9,11±1,92	9,47±2,15	11,42±2,55	17,49±2,54
PREPULSE+PULSE 113	12,68±2,47	6,92±1,14	12,95±1,50	13,63±1,92	10,07±2,03	11,08±2,16	12,00±2,16	15,93±2,15
PPI 93	61,90±11,61	70,75±2,63	80,26±3,21	74,70±5,18	68,72±5,96	64,16±6,75	79,46±4,23	70,96±5,00
PPI 107	53,42±5,98	54,89±4,99	59,61±3,76	59,13±7,11	56,95±7,12	56,77±8,87	61,90±5,15	53,04±3,75
PPI 113	47,10±6,04	57,72±4,23	62,91±3,32	60,11±3,49	57,90±5,94	47,78±7,57	63,75±3,79	60,04±4,19

Tab. 12: Mittelwerte der Versuche zur Präpulsinhibition bei einem IPI von 100ms

Werte in [%], Statistik: Mittelwert ± SEM.

6 Anhang

PPI 100ms	Vierfaktorielle ANOVA ASR	Vierfaktorielle ANOVA PPI
GENOTYP	F(1; 117)= 1,66; n.s.	F(1; 117)= 0,00; n.s.
GESCHLECHT	F(1; 117)= 24,86; p<0,001	F(1; 117)= 5,75; p<0,05
BEHANDLUNG	F(1; 117)= 0,09; n.s.	F(1; 117)= 0,42; n.s.
GENOTYP x GESCHLECHT	F(1; 117)= 0,05; n.s.	F(1; 117)= 0,15; n.s.
GENOTYP x BEHANDLUNG	F(1; 117)= 3,63; n.s.	F(1; 117)= 1,72; n.s.
GESCHLECHT x BEHANDLUNG	F(1; 117)= 2,67; n.s.	F(1; 117)= 0,97; n.s.
GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG	F(1; 117)= 0,02; n.s.	F(1; 117)= 0,42; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP	F(1,69; 197,45)= 0,06; n.s.	F(2; 234)= 0,10; n.s.
INTENSITÄT x GESCHLECHT	F(1,69; 197,45)= 9,48; p<0,001	F(2; 234)= 1,95; n.s.
INTENSITÄT x BEHANDLUNG	F(1,69; 197,45)= 0,27; n.s.	F(2; 234)= 0,03; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP x GESCHLECHT	F(1,69; 197,45)= 0,12; n.s.	F(2; 234)= 0,17; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP x BEHANDLUNG	F(1,69; 197,45)= 2,10; n.s.	F(2; 234)= 0,28; n.s.
INTENSITÄT x GESCHLECHT x BEHANDLUNG	F(1,69; 197,45)= 2,37; n.s.	F(2; 234)= 0,28; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG	F(1,69; 197,45)= 1,47; n.s.	F(2; 234)= 1,50; n.s.

Tab. 13: Genotypen-, Geschlechts-, Behandlungs- und Intensitätsunterschiede der Präpulsinhibition und der akustischen Startle-Reaktion bei einem IPI von 100ms

Die Tabelle zeigt Effekte und Interaktionen der Faktoren (GENOTYP, GESCHLECHT, BEHANDLUNG und INTENSITÄT) der vierfaktoriellen multivariaten ANOVA.

PPI 100ms	Dreifaktorielle ANOVA ASR	
	♀	♂
GENOTYP	F(1; 52)= 0,51; n.s.	F(1; 65)= 1,29; n.s.
BEHANDLUNG	F(1; 52)= 0,81; n.s.	F(1; 65)= 2,09; n.s.
GENOTYP x BEHANDLUNG	F(1; 52)= 1,39; n.s.	F(1; 65)= 2,38; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP	F(1,52; 79,03)= 0,01; n.s.	F(1,77; 114,72)= 0,21; n.s.
INTENSITÄT x BEHANDLUNG	F(1,52; 79,03)= 1,65; n.s.	F(1,77; 114,72)= 0,67; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP x BEHANDLUNG	F(1,52; 79,03)= 2,09; n.s.	F(1,77; 114,72)= 1,12; n.s.

Tab. 14: Genotypen-, Behandlungs- und Intensitätsunterschiede der akustischen Startle-Reaktion bei einem IPI von 100ms

Die Tabelle zeigt Effekte und Interaktionen der Faktoren (GENOTYP, BEHANDLUNG und INTENSITÄT) der dreifaktoriellen multivariaten ANOVA.

PPI 100ms	Dreifaktorielle ANOVA PPI	
	♀	♂
GENOTYP	F(1; 52)= 0,05; n.s.	F(1; 65)= 0,12; n.s.
BEHANDLUNG	F(1; 52)= 0,04; n.s.	F(1; 65)= 1,93; n.s.
GENOTYP x BEHANDLUNG	F(1; 52)= 1,35; n.s.	F(1; 65)= 0,32; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP	F(2; 104)= 0,09; n.s.	F(2; 130)= 0,21; n.s.
INTENSITÄT x BEHANDLUNG	F(2; 104)= 0,04; n.s.	F(2; 130)= 0,37; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP x BEHANDLUNG	F(2; 104)= 1,03; n.s.	F(2; 130)= 0,38; n.s.

Tab. 15: Genotypen-, Behandlungs- und Intensitätsunterschiede der Präpulsinhibition bei einem IPI von 100ms

Die Tabelle zeigt Effekte und Interaktionen der Faktoren (GENOTYP, BEHANDLUNG und INTENSITÄT) der dreifaktoriellen multivariaten ANOVA.

PPI 100ms	Zweifaktorielle ANOVA ASR			
	♀, isoliert	♀, nicht-isoliert	♂, isoliert	♂, nicht-isoliert
GENOTYP	F(1; 22)= 0,09; n.s.	F(1; 30)= 2,20; n.s.	F(1; 33)= 0,10; n.s.	F(1; 32)= 3,06; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP	F(1,55; 34,09)= 0,67; n.s.	F(1,25; 37,54)= 1,66; n.s.	F(1,65; 54,60)= 1,77; n.s.	F(2; 64)= 0,16; n.s.

Tab. 16: Genotypen- und Intensitätsunterschiede der akustischen Startle-Reaktion bei einem IPI von 100ms

Die Tabelle zeigt Effekte und Interaktionen der Faktoren GENOTYP und INTENSITÄT der zweifaktoriellen multivariaten ANOVA.

PPI 100ms	Zweifaktorielle ANOVA PPI			
	♀, isoliert	♀, nicht-isoliert	♂, isoliert	♂, nicht-isoliert
GENOTYP	F(1; 22)= 0,74; n.s.	F(1; 30)= 0,57; n.s.	F(1; 33)= 0,03; n.s.	F(1; 32)= 0,33; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP	F(1,56; 34,32)= 0,21; n.s.	F(2; 60)= 1,14; n.s.	F(2; 66)= 0,14; n.s.	F(2; 64)= 0,41; n.s.

Tab. 17: Genotypen- und Intensitätsunterschiede der Präpulsinhibition bei einem IPI von 100ms

Die Tabelle zeigt Effekte und Interaktionen der Faktoren GENOTYP und INTENSITÄT der zweifaktoriellen multivariaten ANOVA.

6.5.4.3. Tabellen zur Präpulsinhibition bei einem Interpulsintervall von 400ms

PPI 400ms	GFP				WT			
	♀		♂		♀		♂	
	isoliert	nicht-isoliert	isoliert	nicht-isoliert	isoliert	nicht-isoliert	isoliert	nicht-isoliert
NOSTIM	0,22±0,05	0,30±0,04	0,29±0,03	0,29±0,05	0,25±0,07	0,36±0,03	0,30±0,04	0,22±0,03
PREPULSE	0,39±0,06	0,59±0,11	0,60±0,21	0,54±0,12	0,49±0,08	0,93±0,33	0,84±0,21	0,41±0,05
PULSE ALONE 93	8,87±1,58	8,23±0,77	11,54±1,40	13,47±1,44	10,06±1,75	10,50±1,31	15,44±1,73	16,11±1,82
PULSE ALONE 107	14,78±2,42	13,52±2,07	28,40±2,20	26,70±2,91	22,95±4,26	17,21±3,15	27,30±2,64	29,53±2,86
PULSE ALONE 113	18,47±2,41	14,70±2,20	29,92±2,36	27,67±2,66	22,94±3,49	20,30±4,03	28,62±3,04	33,11±3,34
PREPULSE+PULSE 93	2,05±0,64	2,46±0,53	2,75±0,53	4,53±1,03	2,55±0,69	3,53±0,70	3,88±0,98	4,29±0,97
PREPULSE+PULSE 107	6,37±1,36	4,47±0,68	9,82±1,21	11,61±2,22	7,93±1,85	8,68±2,07	10,57±1,74	13,72±1,85
PREPULSE+PULSE 113	6,20±1,00	5,66±0,72	10,82±1,35	11,50±1,16	9,34±1,97	8,94±1,90	15,58±2,37	15,13±1,98
PPI 93	73,01±7,36	68,22±5,99	76,46±2,86	69,85±5,30	73,68±4,92	65,74±5,89	77,93±3,56	74,00±4,45
PPI 107	58,59±5,60	58,78±5,95	64,58±4,15	60,03±5,30	63,26±5,25	48,66±6,54	62,98±3,57	53,87±5,11
PPI 113	61,74±6,65	52,82±5,62	62,10±4,91	54,83±6,06	59,35±5,54	51,20±7,14	46,08±4,96	53,13±5,03

Tab. 18: Mittelwerte der Versuche zur Präpulsinhibition bei einem IPI von 400ms

Werte in [%], Statistik: Mittelwert ± SEM.

6 Anhang

PPI 400ms	Vierfaktorielle ANOVA ASR	Vierfaktorielle ANOVA PPI
GENOTYP	F(1; 10)= 4,01; p<0,05	F(1; 117)= 0,67; n.s.
GESCHLECHT	F(1; 10)= 31,05; p<0,001	F(1; 117)= 0,30; n.s.
BEHANDLUNG	F(1; 10)= 0,19; n.s.	F(1; 117)= 3,24; n.s.
GENOTYP x GESCHLECHT	F(1; 10)= 0,47; n.s.	F(1; 117)= 0,05; n.s.
GENOTYP x BEHANDLUNG	F(1; 10)= 0,14; n.s.	F(1; 117)= 0,02; n.s.
GESCHLECHT x BEHANDLUNG	F(1; 10)= 1,01; n.s.	F(1; 117)= 0,27; n.s.
GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG	F(1; 10)= 0,38; n.s.	F(1; 117)= 0,60; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP	F(1; 193)= 0,27; n.s.	F(2; 234)= 1,44; n.s.
INTENSITÄT x GESCHLECHT	F(1; 193)= 10,22; p<0,001	F(2; 234)= 1,67; n.s.
INTENSITÄT x BEHANDLUNG	F(1; 193)= 1,10; n.s.	F(2; 234)= 0,25; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP x GESCHLECHT	F(1; 193)= 2,37; n.s.	F(2; 234)= 0,95; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP x BEHANDLUNG	F(1; 193)= 1,18; n.s.	F(2; 234)= 2,53; n.s.
INTENSITÄT x GESCHLECHT x BEHANDLUNG	F(1; 193)= 0,50; n.s.	F(2; 234)= 0,67; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP x GESCHLECHT x BEHANDLUNG	F(1; 193)= 1,62; n.s.	F(2; 234)= 0,13; n.s.

Tab. 19: Genotypen-, Geschlechts-, Behandlungs- und Intensitätsunterschiede der Präpulsinhibition und der akustischen Startle-Reaktion bei einem IPI von 400ms

Die Tabelle zeigt Effekte und Interaktionen der Faktoren (GENOTYP, GESCHLECHT, BEHANDLUNG und INTENSITÄT) der vierfaktoriellen multivariaten ANOVA.

PPI 400ms	Dreifaktorielle ANOVA ASR	
	♀	♂
GENOTYP	F(1; 52)= 3,41; n.s.	F(1; 65)= 0,94; n.s.
BEHANDLUNG	F(1; 52)= 0,98; n.s.	F(1; 65)= 0,18; n.s.
GENOTYP x BEHANDLUNG	F(1; 52)= 0,03; n.s.	F(1; 65)= 0,54; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP	F(1,32; 68,80)= 2,48; n.s.	F(1,79; 116,36)= 0,56; n.s.
INTENSITÄT x BEHANDLUNG	F(1,32; 68,80)= 1,80; n.s.	F(1,79; 116,36)= 0,12; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP x BEHANDLUNG	F(1,32; 68,80)= 1,32; n.s.	F(1,79; 116,36)= 1,60; n.s.

Tab. 20: Genotypen-, Behandlungs- und Intensitätsunterschiede der akustischen Startle-Reaktion bei einem IPI von 400ms

Die Tabelle zeigt Effekte und Interaktionen der Faktoren (GENOTYP, BEHANDLUNG und INTENSITÄT) der dreifaktoriellen multivariaten ANOVA.

PPI 400ms	Dreifaktorielle ANOVA PPI	
	♀	♂
GENOTYP	F(1; 52)= 0,12; n.s.	F(1; 65)= 0,81; n.s.
BEHANDLUNG	F(1; 52)= 1,85; n.s.	F(1; 65)= 1,22; n.s.
GENOTYP x BEHANDLUNG	F(1; 52)= 0,28; n.s.	F(1; 65)= 0,32; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP	F(2; 104)= 0,05; n.s.	F(2; 130)= 2,68; n.s.
INTENSITÄT x BEHANDLUNG	F(2; 104)= 0,07; n.s.	F(2; 130)= 0,97; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP x BEHANDLUNG	F(2; 104)= 0,98; n.s.	F(2; 130)= 1,77; n.s.

Tab. 21: Genotypen-, Behandlungs- und Intensitätsunterschiede der Präpulsinhibition bei einem IPI von 400ms

Die Tabelle zeigt Effekte und Interaktionen der Faktoren (GENOTYP, BEHANDLUNG und INTENSITÄT) der dreifaktoriellen multivariaten ANOVA.

PPI 400ms	Zweifaktorielle ANOVA ASR			
	♀, isoliert	♀, nicht-isoliert	♂, isoliert	♂, nicht-isoliert
GENOTYP	F(1; 22)= 1,63; n.s.	F(1; 30)= 1,75; n.s.	F(1; 33)= 0,04; n.s.	F(1; 32)= 1,20; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP	F(1,27; 27,99)= 2,95; n.s.	F(1,22; 36,54)= 0,77; n.s.	F(2; 66)= 1,91; n.s.	F(1,65; 52,76)= 0,42; n.s.

Tab. 22: Genotypen- und Intensitätsunterschiede der Präpulsinhibition bei einem IPI von 400ms

Die Tabelle zeigt Effekte und Interaktionen der Faktoren GENOTYP und INTENSITÄT der zweifaktoriellen multivariaten ANOVA.

PPI 400ms	Zweifaktorielle ANOVA PPI			
	♀, isoliert	♀, nicht-isoliert	♂, isoliert	♂, nicht-isoliert
GENOTYP	F(1; 22)= 0,02; n.s.	F(1; 30)= 0,35; n.s.	F(1; 33)= 1,39; n.s.	F(1; 32)= 0,05; n.s.
INTENSITÄT x GENOTYP	F(2; 44)= 0,31; n.s.	F(1,68; 50,51)= 0,78; n.s.	F(2; 66)= 4,55; p<0,05	F(2; 64)= 0,82; n.s.

Tab. 23: Genotypen- und Intensitätsunterschiede der akustischen Startle-Reaktion bei einem IPI von 400ms

Die Tabelle zeigt Effekte und Interaktionen der Faktoren GENOTYP und INTENSITÄT der zweifaktoriellen multivariaten ANOVA.

6.5.4.4. Tabellen zu Parametern des Forced Swim Test

Forced Swim Test Parameter	GFP (MW±SEM)	WT (MW±SEM)	Zweifaktorielle ANOVA		
			GENOTYP	BEHANDLUNG	GENOTYP x BEHANDLUNG
Latenz [sec]	65,06±3,16	76,85±4,02	F(1; 55)= 6,23; p<0,05	F(1; 55)= 14,04; p<0,001	F(1; 55)= 0,65; n.s.
Klettern [sec]	11,03±1,73	5,42±1,26	F(1; 55)= 7,48; p<0,01	F(1; 55)= 0,09; n.s.	F(1; 55)= 2,41; n.s.
aktives Schwimmen [sec]	100,82±4,79	152,81±4,30	F(1; 55)= 58,61; p<0,001	F(1; 55)= 0,01; n.s.	F(1; 55)= 0,09; n.s.
Mobilität [sec]	111,85±4,48	158,23±4,49	F(1; 55)= 48,07; p<0,001	F(1; 55)= 0,00; n.s.	F(1; 55)= 0,05; n.s.
immobiles Treiben [sec]	128,42±4,49	80,92±4,42	F(1; 55)= 50,67; p<0,001	F(1; 55)= 0,00; n.s.	F(1; 55)= 0,07; n.s.
Klettern [n]	2,55±0,31	1,88±0,37	F(1; 55)= 2,51; n.s.	F(1; 55)= 0,00; n.s.	F(1; 55)= 1,54; n.s.
aktives Schwimmen [n]	16,12±0,51	15,35±0,58	F(1; 55)= 0,86; n.s.	F(1; 55)= 0,04; n.s.	F(1; 55)= 0,05; n.s.
Immobilität [n]	13,61±0,57	12,77±0,63	F(1; 55)= 0,69; n.s.	F(1; 55)= 0,04; n.s.	F(1; 55)= 0,43; n.s.
Faeces-Boli [n]	4,45±0,30	4,46±0,39	F(1; 55)= 0,06; n.s.	F(1; 55)= 6,79; p<0,05	F(1; 55)= 0,90; n.s.

Tab. 24: Genotypen- und Behandlungsunterschiede des Forced Swim Tests I

Statistik: Mittelwert ± SEM. Die Tabelle zeigt Effekte und Interaktionen der Faktoren GENOTYP und BEHANDLUNG der zweifaktoriellen multivariaten ANOVA.

Forced Swim Test Parameter	t-Test (Welch-Test)									
	♂, isoliert					♂, nicht-isoliert				
	GFP (MW±SEM)	WT (MW±SEM)	T	df	Signifikanz	GFP (MW±SEM)	WT (MW±SEM)	T	df	Signifikanz
Latenz [sec]	70,45±2,69	85,8±4,81	-2,79	22,51	p<0,05	56,77±6,36	64,64±5,05	-0,97	21,60	n.s.
Klettern [sec]	9,90±2,25	7,20±1,76	0,95	32,74	n.s.	12,77±2,75	3,00±1,56	3,09	18,65	p<0,01
aktives Schwimmen [sec]	101,45±7,12	151,73±5,48	-5,6	32,64	p<0,001	99,85±5,60	154,27±7,19	-5,98	19,76	p<0,001
Mobilität [sec]	111,35±6,48	158,93±6,33	-5,25	32,45	p<0,001	112,62±5,78	157,27±6,49	-5,14	21,09	p<0,001
immobiles Treiben [sec]	129,10±6,50	80,13±6,25	5,43	32,59	p<0,001	127,38±5,78	82,00±6,41	5,26	21,20	p<0,001
Klettern [n]	2,30±0,36	2,13±0,50	0,27	27,26	n.s.	2,92±0,56	1,55±0,55	1,76	21,91	n.s.
aktives Schwimmen [n]	16,25±0,63	15,33±0,80	0,90	28,63	n.s.	15,92±0,88	15,36±0,86	0,46	21,91	n.s.
immobiles Treiben [n]	13,90±0,80	12,60±0,86	1,11	31,34	n.s.	13,15±0,78	13,00±0,94	0,13	20,33	n.s.
Faeces-Boli [n]	3,80±0,35	4,13±0,55	-0,51	24,75	n.s.	5,46±0,42	4,91±0,53	0,82	19,89	n.s.

Tab. 25: Genotypen- und Behandlungsunterschiede des Forced Swim Tests II

Statistik: Mittelwert ± SEM. Ergebnisse der t-Tests (Welch-Test) sind Bonferroni-Holm adjustiert.

6.5.4.5. Tabellen zur Histologie

Septum	GFP (♂, n= 6) MW±SEM	WT (♂, n= 6) MW±SEM	ANOVA (Messwiederholung)		t-Test (Welch-Test)		
			REGION x GENOTYP	GENOTYP	T	df	Signifikanz
MS Zellzahl [n]	1185,23±54,63	968,16±61,90	F(1; 10)= 9,32; p<0,05	F(1; 10)= 2,57; n.s.	2,63	9,85	n.s.
LS Zellzahl [n]	745,63±42,49	755,67±49,84			-0,15	9,76	n.s.
NBM re. Zellzahl [n]	16,54±0,93	16,36±1,93	-	-	0,09	7,20	n.s.
NBM li. Zellzahl [n]	16,15±1,52	17,95±1,39	-	-	-0,87	9,92	n.s.
MS Volumen [mm ³]	0,22±0,01	0,19±0,02	F(1; 10)= 0,32; n.s.	F(1; 10)= 1,51; n.s.	2,12	7,04	n.s.
LS Volumen [mm ³]	0,30±0,02	0,27±0,03			0,70	9,20	n.s.
MS Zelldichte [n/mm ³]	5331,96±219,38	5312,56±369,73	F(1; 10)= 0,56; n.s.	F(1; 10)= 0,17; n.s.	0,05	8,13	n.s.
LS Zelldichte [n/mm ³]	2576,45±225,76	2857,53±221,14			0,90	10,00	n.s.

Tab. 26: Zellzahl, Volumen und Zelldichte ChAT-IR Neurone im Septum

Statistik: Mittelwert ± SEM. Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung. Ergebnisse der t-Tests (Welch-Test) sind

Bonferroni-Holm adjustiert für jede Region.

114

SN und VTA	GFP (♂, n= 6) MW±SEM	WT (♂, n= 6) MW±SEM	ANOVA (Messwiederholung)		t-Test (Welch-Test)		
			REGION x GENOTYP	GENOTYP	T	df	Signifikanz
SNC Zellzahl [n]	465,96±23,49	494,21±28,55	F(1,04; 10,44)= 0,68; n.s.	F(1; 10)= 0,44; n.s.	-0,76	9,64	n.s.
SNR Zellzahl [n]	45,77±5,74	41,26±2,61			0,72	6,99	n.s.
SNL Zellzahl [n]	11,28±1,08	14,06±1,10			-1,81	10,00	n.s.
SNC Volumen [mm ³]	0,08±0,01	0,08±0,00	F(2; 20)= 2,61; n.s.	F(1; 10)= 2,31; n.s.	-0,56	7,35	n.s.
SNR Volumen [mm ³]	0,14±0,01	0,15±0,01			-1,81	9,48	n.s.
SNL Volumen [mm ³]	0,01±0,00	0,01±0,00			-1,58	10,00	n.s.
SNC Zelldichte [n/mm ³]	6031,82±214,57	6077,67±239,37	F(1,30; 13,03)= 0,12; n.s.	F(1; 10)= 0,01; n.s.	-0,14	9,88	n.s.
SNR Zelldichte [n/mm ³]	334,70±33,74	269,47±11,50			1,83	6,15	n.s.
SNL Zelldichte [n/mm ³]	1137,79±120,15	1185,79±61,12			-0,36	7,43	n.s.
VTA Zellzahl [n]	281,23±10,20	283,46±26,88	-	-	-0,08	6,41	n.s.
VTA Volumen [mm ³]	0,06±0,00	0,07±0,00			-1,16	9,40	n.s.
VTA Zelldichte [n/mm ³]	4344,88±114,01	3977,40±259,93			1,30	6,86	n.s.

Tab. 27: Zellzahl, Volumen und Zelldichte TH-IR Neurone in der Substantia nigra und der VTA

Statistik: Mittelwert ± SEM. Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung. Ergebnisse der t-Tests (Welch-Test) sind

Bonferroni-Holm adjustiert für jede Region.

Raphekerne	GFP (♂, n= 6) MW±SEM	WT (♂, n= 6) MW±SEM	ANOVA (Messwiederholung)		t-Test (Welch-Test)		
			REGION x GENOTYP	GENOTYP	T	df	Signifikanz
DR Zellzahl [n]	1841,95±49,85	1812,13±100,10	F(1,06; 10,60)= 0,20; n.s.	F(1; 10)= 0,01; n.s.	0,27	7,34	n.s.
MnR Zellzahl [n]	344,92±23,38	368,19±17,21			-0,80	9,19	n.s.
PMnR Zellzahl [n]	132,97±9,52	153,17±6,13			-1,78	8,54	n.s.
DR Volumen [mm ³]	0,10±0,00	0,09±0,00	F(2; 20)= 1,70; n.s.	F(1; 10)= 0,08; n.s.	0,84	9,87	n.s.
MnR Volumen [mm ³]	0,03±0,00	0,03±0,00			0,22	7,25	n.s.
PMnR Volumen [mm ³]	0,06±0,00	0,06±0,00			-0,85	9,47	n.s.
DR Zelldichte [n/mm ³]	19120,55±467,40	19643,03±846,27	F(2; 20)= 0,32; n.s.	F(1; 10)= 0,91; n.s.	-0,54	7,79	n.s.
MnR Zelldichte [n/mm ³]	11293,96±791,83	12348,37±819,33			-0,93	9,99	n.s.
PMnR Zelldichte [n/mm ³]	2370,43±197,58	2615,53±118,65			-1,06	8,19	n.s.

Tab. 28: Zellzahl, Volumen und Zelldichte 5-HT-IR Neurone in den Raphekerne

Statistik: Mittelwert ± SEM. Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung. Ergebnisse der t-Tests (Welch-Test) sind

Bonferroni-Holm adjustiert für jede Region.

ChAT Faserlänge [$\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$]	GFP (σ , n= 6) MW \pm SEM	WT (σ , n= 6) MW \pm SEM	ANOVA (Messwiederholung)		t-Test (Welch-Test)		
			SCHICHT x GENOTYP	GENOTYP	T	df	Signifikanz
dorsal CA1 Or	0,19 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01	F(2; 20)= 0,89; n.s.	F(1; 10)= 0,04; n.s.	-0,54	7,78	n.s.
dorsal CA1 Rad	0,20 \pm 0,01	0,19 \pm 0,02			0,44	5,90	n.s.
dorsal CA1 LMol	0,15 \pm 0,01	0,15 \pm 0,01			-0,66	10,00	n.s.
dorsal CA3 Or	0,26 \pm 0,02	0,25 \pm 0,01	F(2; 20)= 0,49; n.s.	F(1; 10)= 1,61; n.s.	1,49	9,58	n.s.
dorsal CA3 Rad	0,24 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01			0,84	6,93	n.s.
dorsal CA3 LMol	0,26 \pm 0,02	0,25 \pm 0,01			0,79	8,40	n.s.
dorsal DG Mol	0,24 \pm 0,01	0,24 \pm 0,03	F(1; 10)= 0,56; n.s.	F(1; 10)= 0,00; n.s.	-0,31	7,85	n.s.
dorsal DG ML	0,15 \pm 0,02	0,15 \pm 0,02			0,33	9,76	n.s.
ventral CA1 Or	0,27 \pm 0,01	0,27 \pm 0,01	F(2; 20)= 1,71; n.s.	F(1; 10)= 0,27; n.s.	-0,36	8,55	n.s.
ventral CA1 Rad	0,24 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01			0,03	9,27	n.s.
ventral CA1 LMol	0,25 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01			1,29	9,99	n.s.
ventral CA3 Or	0,24 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01	F(2; 20)= 0,06; n.s.	F(1; 10)= 0,14; n.s.	-0,56	9,25	n.s.
ventral CA3 Rad	0,24 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01			-0,26	9,97	n.s.
ventral CA3 Lmol	0,28 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01			-0,02	9,50	n.s.
ventral DG Mol	0,26 \pm 0,01	0,28 \pm 0,01	F(1; 10)= 0,03; n.s.	F(1; 10)= 4,12; n.s.	-1,54	8,04	n.s.
ventral DG ML	0,37 \pm 0,02	0,39 \pm 0,01			-1,36	7,78	n.s.
BLA	0,58 \pm 0,12	0,59 \pm 0,26	F(3; 30)= 0,22; n.s.	F(1; 10)= 0,15; n.s.	-0,18	7,10	n.s.
CeC	0,19 \pm 0,02	0,20 \pm 0,01			-0,60	9,25	n.s.
CeM	0,35 \pm 0,03	0,38 \pm 0,03			-0,54	9,99	n.s.
La	0,55 \pm 0,18	0,56 \pm 0,25			-0,01	9,05	n.s.

Tab. 29: Dichte ChAT-IR Fasern in Hippokampus und Amygdala

Statistik: Mittelwert \pm SEM. Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung. Ergebnisse der t-Tests (Welch-Test) sind Bonferroni-Holm adjustiert für jede Schicht (Hippokampus) bzw. Region (Amygdala).

TH Faserlänge [$\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$]	GFP (σ , n= 6) MW \pm SEM	WT (σ , n= 6) MW \pm SEM	ANOVA (Messwiederholung)		t-Test (Welch-Test)		
			SCHICHT x GENOTYP	GENOTYP	T	df	Signifikanz
dorsal CA1 Or	0,07 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	F(2; 20)= 0,02; n.s.	F(1; 10)= 20,85; p<0,01	6,48	8,42	p<0,001
dorsal CA1 Rad	0,09 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01			2,54	9,90	p<0,05
dorsal CA1 LMol	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,00			3,02	5,95	p<0,05
dorsal CA3 Or	0,09 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01	F(2; 20)= 0,30; n.s.	F(1; 10)= 1,35; n.s.	1,51	9,29	n.s.
dorsal CA3 Rad	0,12 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02			0,86	9,86	n.s.
dorsal CA3 LMol	0,09 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01			0,78	9,33	n.s.
dorsal DG Mol	0,08 \pm 0,02	0,06 \pm 0,00	F(1; 10)= 0,27; n.s.	F(1; 10)= 6,29; p<0,05	2,42	5,72	n.s.
dorsal DG ML	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02			1,46	8,65	n.s.
ventral CA1 Or	0,11 \pm 0,00	0,11 \pm 0,00	F(2; 20)= 1,40; n.s.	F(1; 10)= 0,02; n.s.	-1,35	7,23	n.s.
ventral CA1 Rad	0,11 \pm 0,00	0,11 \pm 0,00			-0,71	9,92	n.s.
ventral CA1 LMol	0,12 \pm 0,01	0,11 \pm 0,00			0,79	8,44	n.s.
ventral CA3 Or	0,11 \pm 0,01	0,12 \pm 0,00	F(2; 20)= 1,16; n.s.	F(1; 10)= 0,49; n.s.	0,52	6,93	n.s.
ventral CA3 Rad	0,11 \pm 0,00	0,11 \pm 0,00			-0,91	7,62	n.s.
ventral CA3 LMol	0,11 \pm 0,00	0,11 \pm 0,00			-0,21	9,75	n.s.
ventral DG Mol	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,00	F(1; 10)= 0,02; n.s.	F(1; 10)= 0,56; n.s.	0,87	6,40	n.s.
ventral DG ML	0,14 \pm 0,02	0,13 \pm 0,01			0,58	6,28	n.s.
BLA	0,37 \pm 0,01	0,36 \pm 0,01	F(3; 30)= 0,56; n.s.	F(1; 10)= 0,11; n.s.	1,22	8,27	n.s.
CeC	0,30 \pm 0,01	0,32 \pm 0,02			0,76	9,14	n.s.
CeM	0,50 \pm 0,01	0,51 \pm 0,01			-0,59	9,66	n.s.
La	0,25 \pm 0,01	0,25 \pm 0,01			0,10	10,00	n.s.

Tab. 30: Dichte TH-IR Fasern in Hippokampus und Amygdala

Statistik: Mittelwert \pm SEM. Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung. Ergebnisse der t-Tests (Welch-Test) sind Bonferroni-Holm adjustiert für jede Schicht (Hippokampus) bzw. Region (Amygdala).

5HT Faserlänge [$\mu\text{m}/\mu\text{m}^3$]	GFP (σ , n= 6) MW \pm SEM	WT (σ , n= 6) MW \pm SEM	ANOVA (Messwiederholung)		t-Test (Welch-Test)		
			SCHICHT x GENOTYP	GENOTYP	T	df	Signifikanz
dorsal CA1 Or	0,06 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	F(1,19; 11,90)= 3,25; n.s.	F(1; 10)= 2,55; n.s.	1,73	8,25	n.s.
dorsal CA1 Rad	0,05 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01			-1,70	7,20	n.s.
dorsal CA1 LMol	0,10 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02			1,75	9,92	n.s.
dorsal CA3 Or	0,07 \pm 0,01	0,09 \pm 0,03	F(1,33; 13,33)= 4,34; p<0,05	F(1; 10)= 0,11; n.s.	-1,46	5,72	n.s.
dorsal CA3 Rad	0,08 \pm 0,01	0,08 \pm 0,03			-0,14	7,08	n.s.
dorsal CA3 LMol	0,08 \pm 0,01	0,07 \pm 0,02			0,99	9,41	n.s.
dorsal DG Mol	0,07 \pm 0,02	0,06 \pm 0,01	F(1; 10)= 0,95; n.s.	F(1; 10)= 0,00; n.s.	0,81	9,93	n.s.
dorsal DG ML	0,08 \pm 0,01	0,08 \pm 0,03			-0,47	6,57	n.s.
ventral CA1 Or	0,09 \pm 0,00	0,08 \pm 0,01	F(1,25; 12,53)= 0,18; n.s.	F(1; 10)= 0,08; n.s.	0,21	8,10	n.s.
ventral CA1 Rad	0,07 \pm 0,01	0,08 \pm 0,00			-0,24	7,58	n.s.
ventral CA1 LMol	0,14 \pm 0,01	0,15 \pm 0,02			-0,37	8,61	n.s.
ventral CA3 Or	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	F(1,22; 12,20)= 0,64; n.s.	F(1; 10)= 0,01; n.s.	0,60	9,23	n.s.
ventral CA3 Rad	0,10 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01			0,40	9,91	n.s.
ventral CA3 Lmol	0,15 \pm 0,01	0,16 \pm 0,02			-0,35	6,87	n.s.
ventral DG Mol	0,07 \pm 0,01	0,08 \pm 0,02	F(1; 10)= 0,50; n.s.	F(1; 10)= 0,70; n.s.	-0,66	6,62	n.s.
ventral DG ML	0,10 \pm 0,01	0,12 \pm 0,02			-0,93	9,34	n.s.
BLA	0,20 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	F(3; 30)= 1,26; n.s.	F(1; 10)= 0,02; n.s.	-0,38	9,62	n.s.
CeC	0,18 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01			-0,50	10,00	n.s.
CeM	0,20 \pm 0,01	0,21 \pm 0,00			-0,97	8,60	n.s.
La	0,20 \pm 0,01	0,18 \pm 0,02			0,79	9,64	n.s.

Tab. 31: Dichte 5-HT-IR Fasern in Hippokampus und Amygdala

Statistik: Mittelwert \pm SEM. Zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung. Ergebnisse der t-Tests (Welch-Test) sind Bonferroni-Holm adjustiert für jede Schicht (Hippokampus) bzw. Region (Amygdala).

