

**Die Konsequenzen temporärer Inhibitionen der
Nuclei amygdalae medialis auf das unkonditionierte,
soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis von Mäusen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Diplom-Biologin Julia Noack
geb. am 06.02.1981 in Lauchhammer

Gutachter: Professor Dr. Mario Engelmann
Professor Dr. Gert Lubec

eingereicht am: 14.10.2011

verteidigt am: 31.01.2012

meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Lernen und Gedächtnis	1
1.2 Das soziale Wiedererkennungsgedächtnis	3
1.2.1 Verhaltenstest	3
1.2.2 Das olfaktorische System	5
1.2.3 Grundlagen des sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses	7
1.2.4 Der NAME und das soziale Wiedererkennungsgedächtnis	8
1.3 Experimentelle Werkzeuge	10
1.3.1 Substanzen	10
1.3.1.1 Lidocain	11
1.3.1.2 Muscimol	11
1.3.1.3 Anisomycin	12
1.3.2 c-Fos als Indikator für lernassoziierte, zelluläre Aktivität	12
1.4 Ziel der Arbeit	13
1.4.1 Vorversuche	13
1.4.2 Hauptversuche	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Tiere	16
2.1.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Lösungen	16
2.2 Methoden	16
2.2.1 Soziale Diskriminierung (Verhaltenstest)	16
2.2.2 Stereotaktische Eingriffe	17
2.2.3 Injektion in den NAME	18
2.2.4 Histologie	20
2.2.5 Immunhistochemie	21
2.3 Experimente	22
2.3.1 Vorversuche	22
2.3.1.1 Einfluss des Jungtiergeschlechtes auf die Untersuchungszeit und das Aggressions- und Sexualverhalten	22
2.3.1.2 Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase	22
2.3.1.3 Einfluss der OP auf die soziale Diskriminierung und das Aggressions- und Sexualverhalten	23
2.3.1.4 Soziale Diskriminierung nach Transport	23
2.3.1.5 Konzentration Muscimol	23
2.3.1.6 Diffusion von Muscimol BODIPY TMR-X	24
2.3.1.7 c-Fos-Synthese nach Injektion von Anisomycin <i>versus</i> NaCl-Lösung	24
2.3.2 Hauptversuche	25
2.3.2.1 Injektion von Lidocain <i>versus</i> NaCl-Lösung	25
2.3.2.2 Injektion von Muscimol <i>versus</i> NaCl-Lösung	25
2.3.2.3 Injektion von Anisomycin <i>versus</i> NaCl-Lösung	26
2.3.2.4 c-Fos-Synthese nach Präsentation der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ im VFC	26
2.3.3 Statistische Analyse der Daten	27
2.3.3.1 Analyse der Daten aus den Verhaltensversuchen	27
2.3.3.2 Analyse der Daten der c-Fos-Synthese	29

3	Ergebnisse	31
3.1	Histologie	31
3.2	Vorversuche	31
3.2.1	Einfluss des Jungtiergeschlechtes auf die Untersuchungszeit und das Aggressions- und Sexualverhalten	31
3.2.2	Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase	32
3.2.3	Einfluss der OP auf die soziale Diskriminierung und das Aggressions- und Sexualverhalten	33
3.2.4	Soziale Diskriminierung nach Transport	34
3.2.5	Konzentration Muscimol	35
3.2.6	Diffusion von Muscimol BODIPY TMR-X	36
3.2.7	c-Fos-Synthese nach Injektion von Anisomycin <i>versus</i> NaCl-Lösung	38
3.3	Hauptversuche	40
3.3.1	Injektion von Lidocain <i>versus</i> NaCl-Lösung	40
3.3.1.1	Soziale Diskriminierung	40
3.3.1.2	Aggressions- und Sexualverhalten	43
3.3.2	Injektion von Muscimol <i>versus</i> NaCl-Lösung	45
3.3.2.1	Soziale Diskriminierung	45
3.3.2.2	Aggressions- und Sexualverhalten	47
3.3.3	Injektion von Anisomycin <i>versus</i> NaCl-Lösung	49
3.3.3.1	Soziale Diskriminierung	49
3.3.3.2	Aggressions- und Sexualverhalten	51
3.3.4	c-Fos-Synthese nach Präsentation der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ im VFC	52
4	Diskussion	56
4.1	Vorbetrachtungen	56
4.2	Hauptversuche	67
4.2.1	Lidocain	67
4.2.2	Muscimol	72
4.2.3	Anisomycin	74
4.2.4	c-Fos-Synthese nach Präsentation der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ im VFC	78
4.2.5	Substanzübergreifende Betrachtungen	79
4.2.6	Der <i>Cortex piriformis</i> und das hauptolfaktorische System	83
4.2.7	Beteiligung anderer Hirnareale	85
4.3	Zukünftige experimentelle Ansätze	86
4.3.1	Substanzwahl für Injektionsexperimente	86
4.3.2	Verhaltensstudien	88
5	Zusammenfassung	90
6	Englische Zusammenfassung - Abstract	92
7	Literatur	94
8	Anhang	111
8.1	Materialien	111
8.1.1	Chemikalien	111
8.1.2	Verbrauchsmaterialien, Geräte, Zubehör	113
8.1.3	Computerprogramme	114
8.1.4	Puffer, Lösungen	115
8.2	Statistik	117
8.2.1	Injektion von Lidocain <i>versus</i> NaCl-Lösung	117
8.2.1.1	Randomisierte Block-ANOVA	117
8.2.1.2	Einfaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen	118
8.2.2	Injektion von Muscimol <i>versus</i> NaCl-Lösung	118
8.2.2.1	Randomisierte Block-ANOVA	118
8.2.2.2	Einfaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen	118

8.2.3	Injektion von Anisomycin <i>versus</i> NaCl-Lösung	119
8.2.3.1	Randomisierte Block-ANOVA	119
8.2.3.2	Einfaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen	119
	Danksagung	IX
	Curriculum Vitae	XI
	Publikationen	XII
	Erklärung	XIII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ANI	Anisomycin
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
AOB	akzessorischer olfaktorischer Teil des <i>Bulbus olfactorius</i>
AOS	akzessorisches olfaktorisches System
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APM	<i>Area praeoptica medialis</i>
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
bzw.	beziehungsweise
ca.	<i>circa</i>
CREB	<i>cyclic AMP responsive element binding protein</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	Expositionsintervall
Ent	<i>Cortex entorhinalis</i>
etc.	<i>et cetera</i>
GABA	<i>Gamma-aminobutyric acid</i> (Gamma-Aminobuttersäure)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
Hippo	Hippokampus
HOB	hauptolfaktorischer Teil des <i>Bulbus olfactorius</i>
HOS	hauptolfaktorisches System
Hypo	<i>Hypothalamus</i>
IEG	<i>Immediate-early-gene</i>
J	Jungtier
Lido	Lidocain
m	männliches Jungtier
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MW	Mittelwert
n	Stichprobenumfang
[n]	Anzahl Verhaltensepisoden
NaCl	Natriumchlorid
NACo	<i>Nucleus amygdalae corticalis</i>
NAME	<i>Nucleus amygdalae medialis</i>
NaOH	Natronlauge
NIST	<i>Nucleus interstitialis striae terminalis</i>
NOA	<i>Nucleus olfactorius anterior</i>
NSL	<i>Nucleus septalis lateralis</i>

OP	Operation
opt	<i>Tractus opticus</i>
OTKO	Oxytocin- <i>knock-out</i>
OVN	<i>Organum vomeronasale</i>
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
Pir	<i>Cortex piriformis</i>
RO	<i>Regio olfactoria</i>
RSA	Rinderserumalbumin
S	<i>Sampling</i>
sec	Sekunden
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
Sept	<i>Nuclei septales</i>
Sex	Sexualverhalten
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VFC	<i>volatile fraction cage</i>
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i>
w	weibliches Jungtier
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Ziegennormalserum

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Wichtige afferente und efferente Verbindungen des hauptolfaktorischen und des akzessorischen olfaktorischen Systems.	6
Abb. 2:	Schematische Darstellung der sozialen Diskriminierung.	17
Abb. 3:	Darstellung des Implantates.	18
Abb. 4:	Darstellung des Aufbaus für die intraamygdaloidale Injektion.	20
Abb. 5:	Experimentelles Design zur Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase.	22
Abb. 6:	Zeitpunkte der Injektion von Lidocain und NaCl-Lösung während der sozialen Diskriminierung.	25
Abb. 7:	Zeitpunkte der Injektion von Muscimol, Anisomycin und NaCl-Lösung während der sozialen Diskriminierung.	26
Abb. 8:	VFC (<i>volatile fraction cage</i>).	27
Abb. 9:	Repräsentative Abbildungen zur Darstellung der durch die intraamygdaloidale Injektion entstandenen Läsion.	31
Abb. 10:	Einfluss des Geschlechtes der Jungtiere auf die Untersuchungszeit (A) und die Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens (B).	32
Abb. 11:	Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase.	33
Abb. 12:	Soziale Diskriminierung und Aggressions- und Sexualverhalten vor und sieben Tage nach der OP.	34
Abb. 13:	Soziale Diskriminierung nach Transport.	35
Abb. 14:	Verhalten der Versuchstiere drei Stunden nach Injektion verschiedener Muscimol-Konzentrationen in den NAME.	36
Abb. 15:	Versuch der Darstellung des Diffusionsareals von Muscimol BODIPY TMR-X.	37
Abb. 16:	c-Fos-Synthese nach Injektion von Anisomycin <i>versus</i> NaCl-Lösung in den NAME der Versuchstiere drei Stunden vor einer Jungtierexposition (n = 5).	39
Abb. 17:	Soziale Diskriminierung nach Injektion von Lidocain <i>versus</i> NaCl-Lösung.	42
Abb. 18:	Aggressions- und Sexualverhalten nach Injektion von Lidocain <i>versus</i> NaCl-Lösung.	44
Abb. 19:	Soziale Diskriminierung nach Injektion von Muscimol <i>versus</i> NaCl-Lösung.	46
Abb. 20:	Aggressions- und Sexualverhalten nach Injektion von Muscimol <i>versus</i> NaCl-Lösung.	48
Abb. 21:	Soziale Diskriminierung nach Injektion von Anisomycin <i>versus</i> NaCl-Lösung.	50
Abb. 22:	Aggressions- und Sexualverhalten nach Injektion von Anisomycin <i>versus</i> NaCl-Lösung.	52
Abb. 23:	c-Fos-Synthese nach der Präsentation der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ eines Jungtieres <i>versus</i> Raumluft (Kontrolle) im VFC (n = 5).	54

1 EINLEITUNG

„Gewiß, wenn es sich nur um unsere Herzen handelt, so hat der Dichter recht gehabt, von jenen «geheimnisvollen Fäden» zu sprechen, die das Leben zerreißt. Aber wahrer noch ist, daß es unaufhörlich zwischen den Wesen, zwischen den Ereignissen neue Fäden spinnt und untereinanderwirrt, daß es sie verdoppelt, um das Gewebe zu stärken, so daß zwischen dem geringsten Punkt unserer Vergangenheit und allen anderen ein reiches Netz von Erinnerungen uns nur die Wahl der Verbindungswege läßt.“

Marcel Proust, Auf der Suche nach der verlorenen Zeit, 3, Die wiedergefundene Zeit

Für Lebewesen, die in komplexen sozialen Systemen leben, bildet das Erlernen und Abrufen von Informationen über ein artgleiches Individuum die Grundlage für die Entstehung und Aufrechterhaltung aller sozialen Beziehungen und Bindungen. In Sugetierpopulationen dient das Erkennen des sozialen Status und des Verwandtschaftsverhältnisses der Formierung von Dominanz-Hierarchien und der Verteidigung des Territoriums und, verknüpft mit dem Erkennen genereller Charakteristika wie dem Geschlecht oder dem reproduktiven Status, letztendlich der Erhaltung der Art. Die Untersuchung des sogenannten sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses an Labornagern bietet einen privilegierten Zugang für das Verständnis der Natur höherer Lern- und Gedächtnisprozesse. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da Störungen der dem sozialen Gedächtnis zugrunde liegenden, hirnbioologischen Mechanismen zu psychiatrischen Erkrankungen wie dem „Autismus“ oder der „Schizophrenie“ beitragen können (Daenen *et al.*, 2002; Hammock & Young, 2006; Gras-Vincendon *et al.*, 2008; Marwick & Hall, 2008).

1.1 Lernen und Gedächtnis

Die Akquisition neuer Informationen und damit die Aneignung (Enkodierung) neuen Wissens wird als Lernen bezeichnet und ist der erste geistige Prozess der Gedächtnisbildung. Das Gedächtnis ist die Fähigkeit des Nervensystems, gelernte Informationen zu ordnen und zu modifizieren, zu speichern (Konsolidierung) und im Bedarfsfall wieder abzurufen. Bereits im 19. Jahrhundert klassifizierte Hermann Ebbinghaus (Ebbinghaus, 1885) das Gedächtnis nicht nur anhand der Dauer der Abrufbarkeit des Gedächtnisinhaltes, sondern auch nach der Art des Abrufens, ob bewusst oder unbewusst. Hinsichtlich der Dauer der Informationsspeicherung

werden heutzutage drei Gedächtnistypen unterschieden: das sensorische Gedächtnis (wenige Sekunden), das Kurzzeitgedächtnis (Arbeitsgedächtnis, Sekunden bis Stunden) und das Langzeitgedächtnis (bis zu Jahren). Das Kurzzeitgedächtnis besitzt eine begrenzte Speicherkapazität und ist relativ anfällig für Störungen verursacht beispielsweise durch elektrokonvulsiven Schock, Schleudertrauma oder Anästhesie. Das Langzeitgedächtnis wird, je nach Art des Gedächtnisinhaltes, in das prozedurale und das deklarative Gedächtnis unterteilt. Das prozedurale (implizite) Gedächtnis speichert Fertigkeiten (kognitiv und motorisch), Gewohnheiten und Verhaltensweisen, die auf nichtassoziativen und assoziativen Lernvorgängen oder auch emotionalen Reaktionen beruhen. Das Abrufen der Inhalte des prozeduralen Gedächtnisses erfolgt unbewusst. Das deklarative (explizite) Gedächtnis ist das bewusst abrufbare Gedächtnis für allgemeine Fakten (semantisches Gedächtnis) und autobiographische Fakten und Ereignisse (episodisches Gedächtnis). Informationen aus dem deklarativen Langzeitgedächtnis können auf unterschiedliche Art und Weise wieder abgerufen werden. Man unterscheidet dabei die freie Reproduktion (*Recall*), bei der Gedächtnisinhalte, für die zum Abrufzeitpunkt keine Stimuli vorhanden sind, frei rekonstruiert werden, von der Wiedererkennung (*Recognition*). Für das Wiedererkennen werden Gedächtnisinhalte mit aktuell vorhandenen Stimuli verglichen. Dabei spielen zwei unterschiedliche Mechanismen eine Rolle: die „Erinnerung“ (*Recollection*) und die „Bekanntheit“ (*Familiarity*) (siehe: Yonelinas, 2001; Eichenbaum *et al.*, 2007). Das „Erinnern“ ist ein kontrollierter Prozess bei dem einzelne Stimuli der momentanen Wahrnehmung mit einzelnen Gedächtnisinhalten (Fakten, Kontext) in Verbindung gebracht werden. Im Gegensatz dazu wird „Bekanntheit“ als ein automatischer Prozess verstanden und kann auch als „Wissen“ bezeichnet werden. Auch die im Langzeitgedächtnis gespeicherten Inhalte geraten während des Abrufens in einen labilen Zustand. In diesem Zustand können die Informationen entweder erneut gefestigt (rekonsolidiert) oder durch Umlernen „ausgelöscht“ werden (Extinktion) (siehe: Nader *et al.*, 2000; Nader & Einarsson, 2010). Gedächtnisinhalte können außerdem durch einen passiven Verfall oder Interferenzvorgänge (siehe: Wixted, 2004) vergessen werden.

Laut der derzeit gängigen Hypothese werden lang anhaltende Veränderungen in der synaptischen Übertragung, der Effektivität neuronaler Verbindungen, als zelluläres Korrelat für das Lernen und die Gedächtnisbildung angesehen. Erfahrungen verursachen Änderungen der Aktivität von Neuronen, die dauerhaft zu strukturellen Veränderungen, einschließlich den Modifikationen von Synapsen (synaptische Plastizität), führen können. Daran sind zunächst intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden und Modifikationen existierender synaptischer Proteine beteiligt. Die Konsolidierung in ein stabiles Langzeitgedächtnis erfolgt über die

Expression von Genen (Transkription), die Neusynthese von Proteinen (Translation) und schlussendlich über das Wachstum, die Neuentstehung und Verstärkung synaptischer Verbindungen aber auch die Reduktion anderer und führt dauerhaft zur systemischen Konsolidierung des Gedächtnisses in den entsprechenden Hirnstrukturen (siehe: Martin *et al.*, 2000).

Aufgrund vieler Studien mit Inhibitoren der Proteinbiosynthese wird inzwischen davon ausgegangen, dass die *De-novo*-Proteinbiosynthese die Grundlage für die Ausbildung eines Langzeitgedächtnisses ist (Flood *et al.*, 1973; Squire & Barondes, 1974; Davis & Squire, 1984; Richter *et al.*, 2005; Wanisch *et al.*, 2008; Engelmann, 2009). Jedoch gibt es auch Hinweise darauf, dass die Wirkung dieser Substanzen auf die Gedächtniskonsolidierung nicht (ausschließlich) auf die Inhibition der Proteinbiosynthese zurückzuführen ist, sondern auch Nebeneffekte der Substanzen die Konsolidierungsprozesse beeinflussen können und damit zusätzliche Mechanismen der Langzeitgedächtnisbildung in Betracht gezogen werden müssen (Routtenberg & Rekart, 2005; Gold, 2006; Rudy *et al.*, 2006; Canal *et al.*, 2007; Routtenberg, 2008).

1.2 Das soziale Wiedererkennungsgedächtnis

1.2.1 Verhaltenstest

Um Erkenntnisse über das soziale Wiedererkennungsgedächtnis, als eine Form des deklarativen Gedächtnisses, mit Hilfe von Labornagern zu gewinnen, entwickelten Dantzer und Mitarbeiter (1987) einen auf empirischen Erkenntnissen von Thor und Holloway (1982) basierenden, simplen Verhaltenstest. Dieser Test beruht auf der intrinsischen Motivation von Ratten und Mäusen, neue Individuen intensiv zu untersuchen und ist daher ein Test einer unconditionierten Verhaltensreaktion. Der Test besteht aus zwei Expositionen. Während der ersten Exposition wird einem adulten Versuchstier für einen definierten Zeitraum ein artgleiches Jungtier präsentiert. Das wiederholte Zusammenbringen des adulten Versuchstieres mit demselben Jungtier resultiert in einer Verringerung der Untersuchungszeit. Diese ist nicht auf eine Habituation an den Präsentationsablauf oder die Ermüdung des adulten Versuchstieres zurückzuführen, da die Präsentation eines neuen Jungtieres wiederum eine intensive und in der Dauer nicht signifikant von der ersten Exposition unterscheidbaren Untersuchung induziert (Thor & Holloway, 1982; Dantzer *et al.*, 1988; Kogan *et al.*, 2000). Thor und Holloway (1982) schlussfolgerten daraus, dass die Untersuchungszeit den Bekanntheitsgrad des Jungtieres reflektiert. Ein soziales Gedächtnis für einen Artgenossen wurde nach der ersten Exposition (Akquisition, Lernen) konsolidiert und während der zweiten Exposition (Test) abgerufen.

Auf dieser Grundlage entwickelten Engelmann und Mitarbeiter (1995) ihren Verhaltenstest für die Untersuchung der sozialen Diskriminierungsfähigkeit. Die Modifikation des Tests besteht darin, dem adulten Versuchstier während der zweiten Exposition gemeinsam mit dem bekannten ein neues, unbekanntes Jungtier zu präsentieren. Anhand der Dauer der Untersuchung an beiden Jungtieren (signifikant kürzere Untersuchungszeit am bereits während der ersten Exposition präsentierten Jungtier bzw. längere Untersuchungszeit am neuen Jungtier) kann ermittelt werden, ob das adulte Versuchstier nicht nur das bekannte Jungtier wiedererkennt (ein soziales Gedächtnis gebildet hat), sondern auch zwischen beiden Jungtieren trotz ihrer generellen gemeinsamen Charakteristika (Art/Stamm, Größe, Farbe, Alter) unterscheiden kann, ob die Wiedererkennung also auf einer „individuellen“ Identifizierung beruht. Ein Vorteil dieses Lernparadigmas besteht darin, dass keine zusätzlichen Stimuli (z.B. appetitive oder aversive Stimuli) benötigt werden, um die als Indikator für die Gedächtnisleistung dienende Verhaltensantwort hervorzurufen (Dantzer *et al.*, 1987; Engelmann *et al.*, 1995). Dadurch werden bevorzugt die Hirnareale aktiviert, die kritisch in die Generierung des Wiedererkennungsgedächtnisses involviert sind. Dies erlaubt die Untersuchung der neurobiologischen Grundlagen des sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses ohne die Verarbeitung von zusätzlichen Stimuli berücksichtigen zu müssen. Außerdem ist nur eine relativ kurze und unkomplizierte Trainingssession notwendig, um das Wiedererkennungsgedächtnis zu induzieren. Ein weiterer wichtiger Vorteil besteht in der Möglichkeit, ein Versuchstier wiederholt und unter verschiedenen Behandlungsbedingungen zu testen (intra-individuelle Kontrolle), wodurch nicht nur die statistische Aussagekraft der Ergebnisse erhöht wird, sondern auch die Versuchstierzahlen relativ gering gehalten werden können.

Das Untersuchungsverhalten während der Expositionen besteht im Wesentlichen aus dem Schnüffeln und Lecken am Kopf, am Körper aber vor allem am Ano-Genitalbereich des Stimulusjungtieres während das Versuchstier diesem kontinuierlich nahe folgt und den Kontakt hält (Thor & Holloway, 1982). Dies dient offensichtlich dazu, Informationen über die Identität des neuen Artgenossen zu sammeln (Akquisition). Da Nagetiere Makrosmaten sind und daher der Geruchssinn für sie eine wesentliche Rolle spielt, ist die während des Untersuchens vorwiegend aufgenommene Information, die individuelle Signatur des Artgenossen, olfaktorischer Natur (Bowers & Alexander, 1967; Carr *et al.*, 1976; Sawyer *et al.*, 1984; Matochik, 1988; Popik *et al.*, 1991a). Diese „olfaktorische Signatur“ besteht aus einer komplexen Mischung chemischer Substanzen von kleinen volatilen Molekülen (Schwende *et al.*, 1986) bis zu großen, nicht-volatilen Proteinen (Singh *et al.*, 1987).

1.2.2 Das olfaktorische System

Die Fähigkeit, sozial-relevante Stimuli aufzunehmen, zu verarbeiten und mit einer adäquaten Verhaltensantwort zu reagieren, setzt die Existenz spezialisierter neuronaler Systeme voraus, welche die Akquisition solcher Stimuli (sensorische Systeme) und die Verknüpfung so aufgenommener Informationen mit Emotionen ermöglichen und eine Motivation generieren, die letztendlich in das Untersuchungsverhalten mündet. Für die Aufnahme sowie die Verarbeitung sozialer Stimuli ist bei Nagern das olfaktorische System verantwortlich. Dieses besteht bei Nagern und anderen Vertebraten aus zwei neuronalen Subsystemen, dem hauptolfaktorischen System (HOS) und dem akzessorischen olfaktorischen System (AOS). In der Nasenhöhle befinden sich das Riechepithel (*Regio olfactoria*) mit den chemosensorischen Neuronen (Rezeptorzellen, bipolare Neuronen, primäre Sinneszellen) des HOS und das Vomeronasalorgan (*Organum vomeronasale*, OVN) mit denen des AOS. Die Sinneszellen des jeweiligen Systems projizieren entweder in den hauptolfaktorischen Teil (HOB) oder in den akzessorischen olfaktorischen Teil (AOB) des Riechkolbens (*Bulbus olfactorius*).

Vom HOB werden die olfaktorischen Informationen an verschiedene Teile des primären olfaktorischen Kortex weitergeleitet. Dazu gehören unter anderem der *Nucleus olfactorius anterior*, der *Cortex piriformis* (Pir), der *Cortex entorhinalis* und Teile des *Nucleus amygdalae corticalis* (NACo). In einer neueren Studie wurde zudem eine direkte Verbindung zwischen dem HOB und dem *Nucleus amygdalae medialis* (NAME) beschrieben (Kang *et al.*, 2009). Diese Hirnareale sind wiederum mit dem *Hypothalamus*, weiteren Teilen des limbischen Systems und des Neokortex verbunden (Scalia & Winans, 1975; Gheusi *et al.*, 1994; Sanchez-Andrade & Kendrick, 2009).

Die Mehrzahl der Efferenzen des AOB projizieren in den NAME und in Teile des NACo. Auch der *Nucleus interstitialis striae terminalis* (NIST) erhält Afferenzen direkt aus dem AOB und aus den kortiko-medialen Kerngebieten der Amygdala (*Corpus amygdaloideum*; Scalia & Winans, 1975). Über diese Kerngebiete des *Corpus amygdaloideum* und den NIST erreichen die Projektionen Gebiete des *Hypothalamus*, darunter die *Area praeoptica medialis* (APM), und über den NIST und die *Nuclei septales* den Hippokampus (Li *et al.*, 1990; Simerly, 1990; Canteras *et al.*, 1995; Cooke *et al.*, 1998; Swanson & Petrovich, 1998; von Campenhausen & Mori, 2000). Die wichtigsten afferenten und efferenten Verbindungen zwischen den beschriebenen Hirnarealen sind in Abbildung 1 dargestellt.

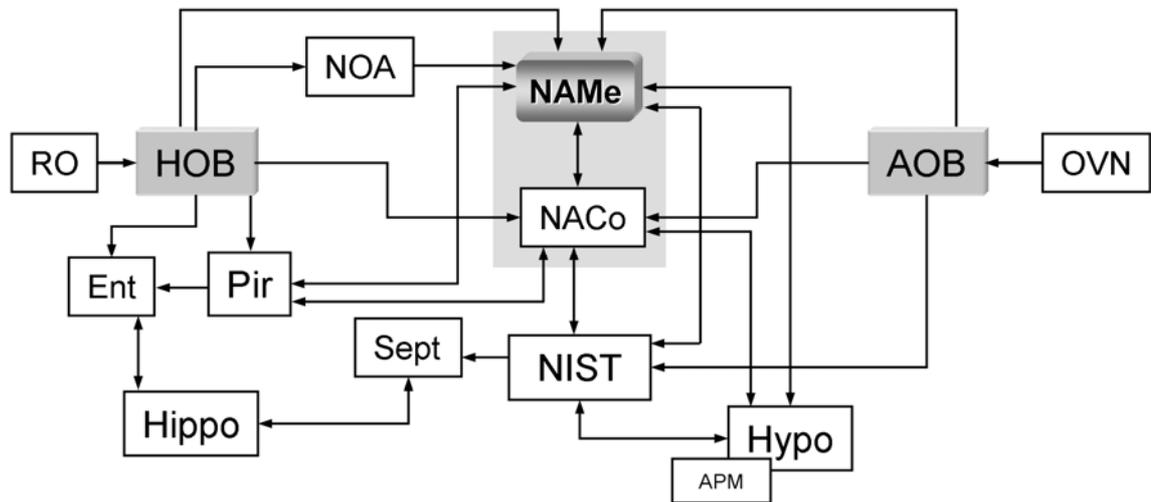


Abb. 1: Wichtige afferente und efferente Verbindungen des hauptolfaktorischen und des akzessorischen olfaktorischen Systems.

AOB: akzessorischer Teil des *Bulbus olfactorius*; APM: *Area praeoptica medialis*; Ent: *Cortex entorhinalis*; Hippo: Hippokampus; HOB: hauptolfaktorischer Teil des *Bulbus olfactorius*; Hypo: *Hypothalamus*; NACo: *Nucleus amygdalae corticalis*; NAME: *Nucleus amygdalae medialis*; NIST: *Nucleus interstitialis striae terminalis*; NOA: *Nucleus olfactorius anterior*; OVN: *Organum vomeronasale*; Pir: *Cortex piriformis*; RO: *Regio olfactoria*; Sept: *Nuclei septales* (modifiziert nach: Swanson & Petrovich, 1998; Richter *et al.*, 2005; Brennan & Kendrick, 2006; Brennan & Zufall, 2006; Spehr *et al.*, 2006; Baum, 2009)

Grundsätzlich wird davon ausgegangen, dass bei Nagern beide Systeme an der Verarbeitung olfaktorischer Stimuli beteiligt sind, diese aber unterschiedliche Funktionen innehaben (Scalia & Winans, 1975). Demnach werden volatile Duftstoffe vorwiegend durch das HOS und nicht-volatile, pheromonelle Duftstoffe vorwiegend durch das AOS (Leinders-Zufall *et al.*, 2000; Dulac & Torello, 2003) detektiert und verarbeitet. Andererseits gibt es vermehrt Hinweise dafür, dass sowohl volatile als auch nicht-volatile Stimuli in beiden olfaktorischen Systemen verarbeitet werden (Meredith, 1991; Gheusi *et al.*, 1994; Sam *et al.*, 2001; Trinh & Storm, 2003; Restrepo *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2005; Brennan & Zufall, 2006; Spehr *et al.*, 2006; Kelliher, 2007; Martel & Baum, 2007; Baum & Kelliher, 2009; Keller *et al.*, 2009; Martel & Baum, 2009; Sanchez-Andrade & Kendrick, 2009; Keller *et al.*, 2010). Beide Systeme bestehen zunächst aus definierten Hirnarealen und Verarbeitungswegen; auf der Ebene des *Corpus amygdaloideum* ist eine funktionelle Differenzierung des NACo als Teil des HOS und des NAME (und auch des NIST) als Teil des AOS (Swanson & Petrovich, 1998; Pitkänen, 2000) jedoch nicht mehr möglich. Beide Kerngebiete erhalten direkt oder indirekt Informationen aus beiden olfaktorischen Systemen (Kevetter & Winans, 1981a, b; Licht & Meredith, 1987; Gomez & Newman, 1992; Cooke *et al.*, 1998; McDonald, 1998; von Campenhausen & Mori, 2000; Kang *et al.*, 2009, 2011a; Kang *et al.*, 2011b). In den kortikomedialen Kerngebieten des *Corpus amygdaloideum* werden die Informationen beider Systeme

scheinbar assoziiert und integriert (Meredith, 1998; Keller *et al.*, 2004; Brennan & Kendrick, 2006; Keller *et al.*, 2009).

1.2.3 Grundlagen des sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses

Der Test zur Untersuchung des sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses und dessen Modifikationen wurden in den vergangenen Jahren in verschiedenen Laboratorien erfolgreich angewandt (Popik *et al.*, 1991b; Engelmann *et al.*, 1995; Kogan *et al.*, 2000; Richter *et al.*, 2005; Squires *et al.*, 2006). Im Jahr 2000 beschrieben Kogan und Mitarbeiter erstmals, dass in Gruppen gehaltene, männliche Mäuse die Fähigkeit besitzen, ihre Artgenossen bis zu sieben Tage lang wiederzuerkennen. Im Gegensatz zu Ratten (Dantzer *et al.*, 1987; Noack *et al.*, 2010) besitzen Mäuse demzufolge die Fähigkeit, ein soziales Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis auszubilden. Zudem zeigten Kogan und Mitarbeiter (2000) mit Hilfe der systemischen Applikation des Proteinbiosynthese-Inhibitors Anisomycin, dass das Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis für Artgenossen von der Proteinbiosynthese abhängig und weiterhin, dass die *cyclic AMP responsive element binding protein* (CREB)-vermittelte Transkription für die Induktion dieses Langzeitgedächtnisses wichtig ist. Eine Abhängigkeit von der Funktion des Hippokampus wurde in dieser Arbeit jedoch nur für das Kurzzeit-Wiedererkennungsgedächtnis nachgewiesen.

In einer anderen Studie wurde mittels systemischer Applikation von Anisomycin zu verschiedenen Zeitpunkten während des Tests der sozialen Diskriminierungsfähigkeit an Mäusen demonstriert, dass dem sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis zwei Phasen der *De-novo*-Proteinbiosynthese zugrunde liegen. Die erste Phase beginnt direkt nach der ersten Exposition, hält bis zu drei Stunden an und geht mit der Synthese von c-Fos in distinkten Hirnarealen einher. Die zweite Phase beginnt sechs Stunden nach der ersten Exposition und hält bis zu 15 Stunden an, ist jedoch nicht assoziiert mit einer erhöhten c-Fos-Synthese (Richter *et al.*, 2005; Wanisch *et al.*, 2008). Engelmann (2009) beschrieb zudem die Vulnerabilität der Gedächtniskonsolidierung innerhalb kritischer Zeitfenster gegenüber proaktiven und retroaktiven Interferenzen. Diese Interferenzphänomene scheinen mit den Anisomycinsensitiven Konsolidierungsprozessen verknüpft zu sein. So wird vermutet, dass das Phänomen des derartig provozierten Vergessens auf der Kollision zweier verschiedener Gedächtnis Spuren und damit eher auf eine Störung der Gedächtniskonsolidierung als auf dessen Abrufbarkeit zurückzuführen ist.

1.2.4 Der NAME und das soziale Wiedererkennungsgedächtnis

Wie bereits erwähnt, scheint die Verarbeitung der „olfaktorischen Signatur“ des Artgenossen mit dem Entstehen einer komplexen neurochemischen Signatur in distinkten Hirnarealen des hauptolfaktorischen (HOB, Pir, NACo) und des akzessorischen olfaktorischen Systems (MOB, NIST, APM, NAME) assoziiert zu sein. In diesen Hirnarealen wird durch die „olfaktorische Signatur“ eines Artgenossen die c-Fos-Synthese während der ersten kritischen Phase der Proteinbiosynthese aktiviert (Ferguson *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2005) – darunter insbesondere auch im NAME, welcher ein mutmaßlich an der olfaktorischen Musterbildung kritisch involviertes Hirnareal ist.

Die beiden Neuropeptide Vasopressin und Oxytocin sind nachweislich von großer Bedeutung für das soziale Wiedererkennungsgedächtnis von Nagern. Untersuchungen über ihre Bedeutung liefern außerdem Hinweise für die des NAME. Vasopressin moduliert das soziale Wiedererkennungsgedächtnis männlicher Mäuse wie folgt: Direkt nach der ersten Jungtierexposition systemisch appliziertes Vasopressin verlängert die Dauer der Aufrechterhaltung des Wiedererkennungsgedächtnisses, wohingegen die Injektion eines Vasopressin (V1)-Rezeptor-Antagonisten die Ausbildung des sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses blockiert (Bluthe *et al.*, 1993). Offensichtlich scheint endogenes Vasopressin wichtig für die (Kurzzeit-)Speicherung des sozialen Gedächtnisses zu sein (Dantzer *et al.*, 1987; Le Moal *et al.*, 1987; Bluthe *et al.*, 1993). Weiterhin wurde beschrieben, dass Vasopressin (V1a und V1b)-Rezeptor-*knock-out*-Mäuse Defizite in ihrer Fähigkeit zur sozialen Wiedererkennung zeigen (Wersinger *et al.*, 2002; Bielsky *et al.*, 2004). Überwiegend an Ratten wurde demonstriert, dass dabei vor allem die Androgen-abhängigen, vasopressinergen Neuronen, welche vom NAME und vom NIST in den *Nucleus septalis lateralis* (NSL) projizieren, von entscheidender Bedeutung sind (Buijs *et al.*, 1978; Caffè & van Leeuwen, 1983; de Vries & Buijs, 1983; van Leeuwen & Caffè, 1983; Caffè *et al.*, 1987; Dantzer *et al.*, 1988; Mayes *et al.*, 1988; Engelmann & Landgraf, 1994; Landgraf *et al.*, 1995; van Wimersma Greidanus & Maigret, 1996; Everts & Koolhaas, 1997; de Vries & Miller, 1998). Die Wirkung des im NAME und im NIST synthetisierten Vasopressins an V1a-Rezeptoren im NSL ist bei Mäusen notwendig und ausreichend für die soziale Wiedererkennung; eine Aktivierung der V1a-Rezeptoren im NAME ist dafür jedoch nicht erforderlich (Bielsky *et al.*, 2005).

Die Hypothese einer essentiellen Beteiligung des NAME am sozialen Wiedererkennungsgedächtnis erhält ganz wesentliche Unterstützung durch die Beobachtung, dass Oxytocin, speziell im Oxytocin-Rezeptor-reichen NAME (Insel *et al.*, 1993), eine wichtige Rolle während der frühen Verarbeitung (Akquisition) von „olfaktorischen Signaturen“ spielt

(Ferguson *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 2001). Oxytocin-*knock-out* (OTKO)-Mäuse bzw. Wildtyp-Mäuse (und C57Bl/6 Mäuse), denen ein Oxytocin-Antagonist intrazerebroventrikulär injiziert wurde, sind nicht in der Lage, ein soziales Kurzzeit-Wiedererkennungsgedächtnis auszubilden (Ferguson *et al.*, 2000; Choleris *et al.*, 2003; Choleris *et al.*, 2006; Samuelsen & Meredith, 2011). OTKO-Mäuse erhalten die Fähigkeit zur sozialen Wiedererkennung, wenn ihnen Oxytocin intrazerebroventrikulär direkt vor der ersten Jungtierexposition, jedoch nicht, wenn es nach der ersten Jungtierexposition injiziert wird (Ferguson *et al.*, 2000; Ferguson *et al.*, 2001). Die „olfaktorische Signatur“ eines Jungtiers induziert die c-Fos-Synthese im NAME von Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch in dem von OTKO-Mäusen. OTKO-Mäuse sind nach der bilateralen Injektion von Oxytocin in den NAME direkt vor der ersten Jungtierexposition zur sozialen Wiedererkennung in der Lage. Die lokale, bilaterale Injektion eines Oxytocin-Rezeptor-Antagonisten in den NAME von männlichen Wildtypmäusen direkt vor der ersten Exposition verhinderte die Ausbildung des Wiedererkennungsgedächtnisses (Ferguson *et al.*, 2001). Auch bei weiblichen Mäusen wurde eine Bedeutung der Oxytocin-Rezeptoren im NAME für die soziale Wiedererkennung bestätigt (Choleris *et al.*, 2007). Bei Schafen induziert die Geburt eines Lammes eine vermehrte Oxytocin-mRNA-Expression unter anderem in Teilen des olfaktorischen Systems, darunter auch der NAME (Broad *et al.*, 1999). Die temporäre Inaktivierung des NACo oder des NAME von Mutterschafen resultierte in beiden Fällen in dem Verlust der Fähigkeit, das eigene Lamm wiederzuerkennen, wobei diese Hirnareale scheinbar vor allem für die Gedächtnisbildung wichtig sind (Keller *et al.*, 2004).

Der NAME von Mäusen ist zudem beteiligt an der unterschiedlichen Verarbeitung der olfaktorischen Stimuli eines bekannten *versus* eines unbekanntem Sexualpartners im Zusammenhang mit dem Bruce-Effekt (Halem *et al.*, 2001; Binns & Brennan, 2005). Am Goldhamster und an Mäusen wurde gezeigt, dass die c-Fos-Synthese im NAME nach der Präsentation sozial relevanter Stimuli von Artgenossen (Urin, Flankendrüsen-Sekret, Scheidensekret, Käfig eines Artgenossen) erhöht ist (Meredith & Westberry, 2004; Samuelsen & Meredith, 2009a; Maras & Petrulis, 2010). Der NAME spielt beim Goldhamster offenbar eine wichtige Rolle für die Analyse sozialer Stimuli während der Verarbeitung olfaktorischer Informationen über das Stimulusgeschlecht (Petrulis, 2009). Weiterhin wurde beschrieben, dass Läsionen des *Corpus amygdaloideum* (einschließlich des NAME) von neugeborenen Ratten in einem abnormen Sozialverhalten resultierten, welches noch im Erwachsenenalter beobachtet werden konnte (Daenen *et al.*, 2002). Vermutlich sind der NACo und der NAME auch bei Ratten für die soziale Wiedererkennung von Bedeutung (Maaswinkel *et al.*, 1996). Darüber hinaus

geben auch Studien am Menschen Anhaltspunkte für eine Beteiligung des *Corpus amygdaloideum* an der Verarbeitung sozialer Informationen: Bei Patienten mit „Autismus“ wurden Veränderungen in der Anatomie und Aktivität des *Corpus amygdaloideum* und Defizite im Wiedererkennungsgedächtnis für Gesichter nachgewiesen (Aylward *et al.*, 1999; Baron-Cohen *et al.*, 2000; Critchley *et al.*, 2000; Howard *et al.*, 2000).

Es gibt somit eine Reihe von Befunden zur Bedeutung definierter Neuromodulator-Systeme und Hirnareale für das soziale Wiedererkennungsgedächtnis, die mit Hilfe von permanenten *Knock-outs*, permanenten Läsionen aber auch lokalen Injektionen von Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten gewonnen wurden. Jedoch erfolgten fast alle Studien unter Anwendung von Tests über das Kurzzeitgedächtnis. Die Kombination des Verhaltenstests auf die soziale Diskriminierungsfähigkeit an Mäusen mit temporären, lokalen Inhibitionen erlaubt die Untersuchung der neurobiologischen Grundlagen des sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses, über welches bislang nur wenig bekannt ist.

1.3 Experimentelle Werkzeuge

1.3.1 Substanzen

Die Inaktivierung von Hirnarealen und die Untersuchung der als Konsequenz beispielsweise in Verhaltenstests entstehenden Veränderungen sind wichtige Werkzeuge für die Untersuchung der Funktion distinkter Hirnareale. Diese Inaktivierung kann sowohl durch chemisch oder operativ verursachte permanente Läsionen als auch durch temporäre Blockaden der Informationsübertragung (Weiterleitung von Aktionspotentialen, synaptische Übertragung) bzw. Informationsverarbeitung erfolgen. Temporäre Blockaden haben viele Vorteile gegenüber permanenten Läsionen. Sie sind reversibel, wodurch mit ihrer Hilfe auch die zeitliche Komponente von relevanten Prozessen innerhalb der inhibierten Hirnareale untersucht werden kann. Zudem sind dadurch keine kompensatorischen Plastizitätsmechanismen zu erwarten. Nach dem Abklingen temporärer Blockaden ist es außerdem möglich, die Funktion der untersuchten Hirnareale zu kontrollieren und damit sicherzustellen, dass Veränderungen im Verhalten während der Blockade ausschließlich durch diese bedingt wurden. Je nach Fragestellung ist bei der Wahl der spezifischen Substanzen die Art und Dauer ihrer Wirkung und ihre Reichweite (Diffusion) im Hirngewebe zu berücksichtigen. Dabei ist sowohl die Diffusion der Substanzen als auch ihre Wirkungsdauer abhängig von der verwendeten Konzentration, der Größe der Substanzmoleküle, ihrer Bindungsstärke an Rezeptoren oder

Kanäle, ihrem Umsatz (Verstoffwechslung), vom Widerstand (Dichte) des Gewebes und vom Injektionsdruck bzw. -volumen.

Substanzen, die sich durch ihre reversiblen Inaktivierungseigenschaften zur Untersuchung der Beteiligung lokaler Hirnareale während verschiedener Stadien von Lern- und Gedächtnisvorgängen eignen und daher im Rahmen dieser Dissertation eingesetzt wurden, werden im Folgenden beschrieben.

1.3.1.1 Lidocain

Lidocain (2-Diethylamino-*N*-(2,6-dimethylphenyl)acetamid) blockiert spannungsabhängige Natriumkanäle (Hille, 1966) und hemmt damit die Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen an den Membranen von Neuronen. Lidocain inaktiviert dabei an der injizierten Stelle sowohl die Zellkörper als auch die durchziehenden Axonen (Malpeli, 1999; Martin & Ghez, 1999). Geringe Lidocain-Konzentrationen (10 – 40 µg) in kleinen Injektionsvolumina (0,5 – 4 µl) inaktivieren ein Gebiet mit einer mittleren Distanz von ein bis zwei Millimetern ausgehend von der Injektionsstelle (Albert & Madryga, 1980; Sandkuhler *et al.*, 1987; Martin, 1991; Fenton & Bures, 1994; Tehovnik & Sommer, 1997; Boehnke & Rasmusson, 2001). Die Wirkung setzt innerhalb von zwei bis drei Minuten ein, erreicht nach zehn bis 20 Minuten ihr Maximum (Sandkuhler *et al.*, 1987; Martin, 1991) und ist je nach injizierter Konzentration nach 20 bis 60 Minuten abgeklungen (Malpeli & Schiller, 1979; Martin, 1991; Tehovnik & Sommer, 1997; Boehnke & Rasmusson, 2001). Die Injektion von 10 µg Lidocain bewirkt eine zehn- bis 20-prozentige funktionelle Inhibition (Pereira de Vasconcelos *et al.*, 2006).

1.3.1.2 Muscimol

Muscimol (5-(aminomethyl)-isoxazol-3-ol) ist ein Gamma-Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptor-Agonist, der überwiegend an GABA_A-Rezeptoren aber auch schwach an GABA_B-Rezeptoren bindet. GABA_A-Rezeptoren sind ubiquitär im zentralen Nervensystem verteilt (Palacios *et al.*, 1981; Heldt & Ressler, 2007). Das Vorhandensein von GABA_A-Rezeptoren speziell im *Corpus amygdaloideum* von Mäusen wurde mittels Rezeptorautoradiografie an mehreren Mausstämmen nachgewiesen (Yilmazer-Hanke *et al.*, 2003). Nach der Interaktion mit den Rezeptoren werden spezifisch diese Neuronen hyperpolarisiert, wodurch die Generierung von Aktionspotentialen in diesen Neuronen verhindert wird, ohne durchziehende Axonen zu beeinflussen. Die Bindung von Muscimol an die Rezeptoren ist stark und die Diffusion durch das Hirngewebe langsam (Krogsgaard-Larsen & Johnston, 1978; Gallagher *et*

al., 1983; Hikosaka & Wurtz, 1985; Martin, 1991; Johnston, 1996; Edeline *et al.*, 2002). Muscimol verteilt sich ausgehend von der Injektionsstelle mit einem mittleren Radius von 1,66 mm (Martin, 1991) bis über 3 mm (Arikan *et al.*, 2002; Edeline *et al.*, 2002). Je nach injizierter Muscimol-Konzentration dauert die bewirkte Inhibition 12 bis 24 Stunden an (Hikosaka & Wurtz, 1985; Martin & Ghez, 1993). Orientierend an der in der Literatur beschriebenen Konzentration von 1 µg/µl (8,8 mM) für intrazerebrale Injektionen bei Mäusen (Tang *et al.*, 2005; Lewis & Gould, 2007; Oliveira *et al.*, 2010) und den unveröffentlichten Erfahrungen von Frau Dr. Yulia Golub (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München) mit einer Muscimol-Konzentration von 0,5 µg/µl (4,4 mM) wurde die letztere als Ausgangskonzentration für die vorliegende Arbeit verwendet.

1.3.1.3 Anisomycin

Anisomycin ([[(2*S*,3*R*,4*R*)-4-hydroxy-2-[(4-methoxyphenyl)methyl]pyrrolidin-3-yl]acetat) inhibiert die Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen indem es an die 60S-Untereinheit der Ribosomen bindet und dort die Peptidyltransferaseaktivität blockiert (Barbacid & Vazquez, 1974; Barbacid *et al.*, 1975; Barbacid & Vazquez, 1975). Eine Studie über die räumliche und zeitliche Dynamik der durch Anisomycin induzierten Proteinbiosyntheseinhibition zeigte, dass 20 µg Anisomycin, in einem Volumen von 0,5 µl in den dorsalen Hippokampus injiziert, die Proteinbiosynthese in einem Radius von ca. zwei Millimetern um die Injektionsstelle herum über einen Zeitraum von mehr als sechs Stunden inhibiert. Die maximale Inhibition war dabei nach drei Stunden erreicht. Neun Stunden nach der Injektion war keine Inhibition der Proteinbiosynthese mehr nachweisbar (Wanisch & Wotjak, 2008).

1.3.2 c-Fos als Indikator für lernassoziierte, zelluläre Aktivität

Die Bildung des Produktes eines sogenannten *Immediate-early-gene* (IEG), c-Fos, erfolgt nach der Stimulation von Zellen (Greenberg & Ziff, 1984; Sagar *et al.*, 1988; Bullitt, 1990; Herrera & Robertson, 1996) und dient daher in neurobiologischen Untersuchungen häufig als Indikator für neuronale Aktivität. Die Expression von IEGs wird darüber hinaus mit Proteinbiosynthese-abhängigen, lang anhaltenden synaptischen Veränderungen während des Lernens und der Gedächtnisbildung in Verbindung gebracht (siehe: Hughes & Dragunow, 1995; Dragunow, 1996; Brennan & Keverne, 1997; Tischmeyer & Grimm, 1999; Cammarota *et al.*, 2000). Das Protein c-Fos ist ein Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 (Chiu *et al.*, 1988; Curran & Franza, 1988). AP-1 wiederum induziert die Expression von „späten“ Genen für

Langzeit-Veränderungen des zellulären Phänotyps (Sheng & Greenberg, 1990; Morgan & Curran, 1991; Chinenov & Kerppola, 2001). Im Grundzustand der Zelle ist kaum *c-fos*-mRNA und c-Fos-Protein messbar (Hughes *et al.*, 1992). In vielen Hirnregionen wird die *c-fos*-mRNA-Synthese nach akuter Stimulation innerhalb von 30 bis 60 Minuten induziert. Der maximale c-Fos-Proteingehalt im Zellkern ist zwischen einer und drei Stunden *post stimulationem* messbar und sinkt nach vier bis sechs Stunden wieder ab (Sonnenberg *et al.*, 1989; Ikeda *et al.*, 1994; Cullinan *et al.*, 1995).

1.4 Ziel der Arbeit

Wie oben geschildert, deuten die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse auf eine Funktion des NAME während des sozialen Kurzzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses hin. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Art und den Zeitpunkt einer möglichen Beteiligung des NAME bei der Generierung des sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses an Mäusen zu untersuchen.

1.4.1 Vorversuche

Um optimale Voraussetzungen für die Injektionsexperimente zu schaffen, sollten eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt werden. Zunächst musste ermittelt werden, ob es einen Unterschied im Verhalten der Versuchstiere gegenüber männlichen und weiblichen Stimulus-Jungtieren gibt. Außerdem sollte die Untersuchungszeit und das Aggressions- und Sexualverhalten gegenüber einem Stimulus-Jungtier sowie die Körpermasse der Versuchstiere an sieben aufeinander folgenden Tagen nach der Operation (OP) zur Implantation von Führungskanülen überwacht werden. Anhand dieser Daten sollte der optimale Zeitpunkt für den Beginn der Injektionsexperimente bestimmt werden. Da es weder im eigenen Labor noch aus der Literatur entsprechenden Vorkenntnisse gab, wurde zudem getestet, ob die Implantation von Führungskanülen (OP, Platzierung der Führungskanülen) oder die Injektionsprozedur *per se* einen Einfluss auf das soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis bei Mäusen haben.

Da in unserem Institut bisher keine Studien mit intrazerebralen Injektionen von Muscimol durchgeführt wurden, musste auch die optimale Konzentration von Muscimol für die intraamygdaloide Injektion bestimmt werden. Um das Diffusionsareal der in den NAME injizierten Substanzen abschätzen zu können, wurde ein Fluorophor-gekoppeltes Muscimol (Muscimol BODIPY TMR-X) injiziert. Ferner sollte die Diffusion von Anisomycin und

dessen inhibitorische Wirkung auf die Proteinbiosynthese mit Hilfe eines immunhistochemischen Nachweises der Unterdrückung einer induzierten c-Fos-Synthese ermittelt werden.

1.4.2 Hauptversuche

Die unter 1.2.4 beschriebenen Studien lieferten wichtige Hinweise darauf, dass der NAME eine Rolle für das soziale Wiedererkennungsgedächtnis spielt. Jedoch konnten anhand dieser Ergebnisse keine eindeutigen Aussagen darüber getroffen werden, wann und wie der NAME in die Prozesse des Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses involviert sein könnte. Daher war es einerseits Ziel der vorliegenden Arbeit, Informationen über den Zeitpunkt - während der Akquisition der olfaktorischen Informationen, der Konsolidierung und/oder des Abrufens des Gedächtnisinhaltes - der Beteiligung des NAME zu erhalten. Andererseits sollte die Art - Informationsweiterleitung, Informationsspeicherung - der Beteiligung des NAME untersucht werden. Aufschluss darüber sollten mögliche Veränderungen in der Langzeit-Gedächtnisleistung geschlussfolgert aus Veränderungen distinkter Verhaltensparameter nach temporären Inhibitionen der Funktion des NAME zu verschiedenen Zeitpunkten während des Verhaltenstests auf die soziale Diskriminierungsfähigkeit der Versuchstiere geben. Im Verhaltenstest wurde das Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis der Versuchstiere durch den Einsatz eines Expositionsintervalles (EI) von 24 Stunden untersucht. Die temporären Inhibitionen sollten durch bilaterale Injektionen der Substanzen Lidocain, Muscimol und Anisomycin in den NAME erzielt werden. Aufgrund der lang anhaltenden Wirkung von Muscimol und Anisomycin wurden beide Substanzen drei Stunden vor der ersten oder der zweiten Exposition injiziert. Dementsprechend sollte durch Muscimol die Informationsweiterleitung und durch Anisomycin die Informationsspeicherung im Sinne der Unterdrückung Proteinbiosynthese-abhängiger, neuronaler Plastizität während der Akquisition/Konsolidierung oder während des Abrufens inhibiert werden. Da Lidocain eine relativ kurze Wirkdauer hat, konnte diese Substanz zur Untersuchung der Informationsweiterleitung im NAME auch drei Stunden nach der ersten Exposition eingesetzt werden.

Während des Verhaltenstests über die soziale Diskriminierungsfähigkeit sollten folgende Verhaltensparameter gemessen werden: die Dauer der Untersuchung der Stimulus-Jungtiere als Indikator für die Akquisition, Interpretation und Wiedererkennung der Informationen der „olfaktorischen Signatur“ durch die Versuchstiere, wodurch der Bekanntheitsgrad der Jungtiere reflektiert wird und die Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens der Versuchstiere gegenüber den Jungtieren. Neben dem praktischen Nutzen des Ausschlusses extrem aggressiver und/oder sexuell interessierter Versuchstiere, erschien letzteres aufgrund von Hinweisen

auf eine Rolle, die der NAME während der Regulation von aggressiven Verhaltensweisen und Sexualverhaltensweisen spielt (Baum *et al.*, 1994; Choi *et al.*, 2005), der Erfassung wert.

Aus einer neueren Studie ist bekannt, dass Mäuse allein anhand der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ im Verhaltenstest ein Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis für einen Artgenossen demonstrieren können und dass durch die Präsentation dieser volatilen Fraktion die c-Fos-Synthese im AOB und im MOB induziert wird (Noack *et al.*, 2010). Um einen weiteren Hinweis für eine Funktion des NAME als Ort der Integration von Informationen sowohl des HOS als auch des AOS während der Bildung und Aufrechterhaltung des sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses für einen Artgenossen zu erhalten, sollte zudem die c-Fos-Synthese im NAME und auch im Pir, als Teil des HOS, nach der Detektion der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ im VFC (*volatile fraction cage*, Noack *et al.*, 2010) untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Männliche C57BL/6JOlaHsd Mäuse (Harlan-Winkelmann, weitergezüchtet im zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) im Alter von neun bis 16 Wochen wurden als Versuchstiere verwendet. Sie wurden bis zur experimentellen Nutzung in Gruppen mit einer Größe von drei bis acht Tieren und unter pathogenfreien, kontrollierten Bedingungen (Temperatur: 21 ± 1 °C, relative Luftfeuchtigkeit: 50 – 65 %) mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von jeweils 12 Stunden (Beleuchtung: 06:00 – 18:00 Uhr) gehalten. Sie hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Männliche und weibliche C57BL/6JOlaHsd Mäuse wurden in einem Alter von 25 bis 35 Tagen als olfaktorische Stimuli (Jungtier) eingesetzt. Alle Experimente waren genehmigt durch die Tierschutzkommission des Bundeslandes Sachsen-Anhalt.

2.1.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte, Lösungen

Die für die experimentelle Durchführung wichtigen Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, und Gerätschaften, spezielle Computerprogramme und die Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen sind im Anhang (8.1) aufgelistet und beschrieben.

2.2 Methoden

2.2.1 Soziale Diskriminierung (Verhaltenstest)

Die Fähigkeit zur sozialen Wiedererkennung wurde mit einem Verhaltenstest auf die soziale Diskriminierung (Engelmann *et al.*, 1995; Engelmann *et al.*, 2011) untersucht. Der Verhaltenstest wurde während der Hellphase durchgeführt. Die zuvor in Gruppen gehaltenen Versuchstiere wurden ca. zwei Stunden vor Beginn des Verhaltenstests einzeln in Versuchskäfige mit frischer Einstreu (Typ II Käfig) isoliert. Der Test auf die soziale Diskriminierung bestand aus zwei vierminütigen Expositionen (Abb. 2). Während der ersten Exposition wurde dem Versuchstier ein Jungtier (J1) in den Versuchskäfig gesetzt (*Sampling*). Nach einem EI von 24 Stunden wurde dem Versuchstier J1 gemeinsam mit einem zweiten, unbekanntem Jungtier (J2) im Versuchskäfig präsentiert (*Choice*). Die Jungtiere wurden zur Unterscheidung

am Schwanz mit einem geruchsneutralen Edding markiert und vor, zwischen und nach den Expositionen in separaten Käfigen gehalten. Die Dauer des direkten Kontaktes des Versuchstieres mit einem Jungtier wurde während der beiden Expositionen per Tastendruck mit Hilfe eines Computerprogramms (EVENTLOG) erfasst. Dabei galt das Lecken und aktive Schnüffeln (Wesson *et al.*, 2008) am Körper und insbesondere am Ano-Genitalbereich des Jungtieres als Untersuchungsverhalten. Eine signifikant längere Untersuchungszeit gegenüber J2 im Vergleich mit der gegenüber J1 wurde als Beweis für ein intaktes soziales Wiedererkennungsgedächtnis gewertet (Engelmann *et al.*, 1995). Zudem wurde das Aggressionsverhalten (Attackieren, Beißen, Kämpfen, dominantes Niederdrücken) und das Sexualverhalten (Deckverhalten) als ein Parameter (Aggressions- und Sexualverhalten) registriert. Nach Beendigung des Verhaltenstests wurden die Versuchstiere wieder in ihre ursprünglichen Gruppen zurückgesetzt.



Abb. 2: Schematische Darstellung der sozialen Diskriminierung.

Während des vierminütigen *Samplings* wurde dem Versuchstier J1 präsentiert. Nach einem EI von 24 Stunden wurde während des vierminütigen *Choice* die Untersuchungszeit des Versuchstieres gegenüber dem bekannten J1 und einem unbekanntem J2 gemessen. EI: Expositionsintervall; J: Jungtier.

2.2.2 Stereotaktische Eingriffe

Für die OP zur bilateralen Implantation von Führungskanülen wurde das Versuchstier zunächst narkotisiert. Nach einer kurzen Betäubung mit Isofluran wurde die Lösung für eine tiefe Narkose intraperitoneal injiziert (0,1 ml/10 g Körpermasse). Zudem wurden dem Versuchstier 0,2 ml einer Lösung des Analgetikums Metacam[®] subkutan gespritzt. Anschließend wurde das Versuchstier am Kopf in einem stereotaktischen Apparat fixiert und seine Augen wurden mit Augengel vor Austrocknung geschützt. Die Schädelhaare wurden mit einer Schere entfernt. Nachdem die Kopfhaut mit einem Skalpell rostro-caudal ca. 1 cm geöffnet wurde, konnten die Schädelnähte und damit auch das Bregma mit Hilfe eines mit einem Stieltupfer aufgetragenen Tropfens Wasserstoffperoxid (H₂O₂, 3 %) sichtbar gemacht werden. Die Platzierung der Führungskanülen wurde anhand eines stereotaktischen Atlanten (Franklin & Paxinos, 1997) festgelegt und mit Hilfe des stereotaktischen Apparates ausgehend von Bregma eingestellt (lateral: +/- 2,5 mm; anterior – posterior: + 0,3 mm anterior von Bregma; ventral: + 4,5 mm). An den bilateral definierten Kanülenpositionen wurde die Schädeldecke

mit einem Zahnbohrer durchbohrt. Die Führungskanülen wurden langsam in das Hirngewebe eingelassen und an ihrer ventralen Position (1 mm über dem NAME) platziert. Neben jeder der beiden Führungskanülen wurde zusätzlich eine Schraube in der Schädeldecke befestigt. Die Wunde wurde mit Hilfe von Augenstäbchen getrocknet, bevor die Führungskanülen und Schrauben mit einem Tropfen Gewebekleber (Histoacryl) und anschließend mit lichthärtendem Zahnzement an der Schädeldecke und untereinander fixiert wurden. Als Schutz vor Verstopfung durch geronnenes Blut oder Einstreu wurden die Führungskanülen mit Mandrins (passend gekürzte Insektennadeln) verschlossen (Abb. 3). Die Versuchstiere wurden nach der OP für 24 Stunden isoliert gehalten, während denen sie aus der Narkose aufwachen konnten. Anschließend wurden sie in ihre ursprünglichen Gruppen zurückgeführt. Die postoperative Erholungsphase bis zum ersten Verhaltensversuch hatte eine Dauer von mindestens sieben Tagen.

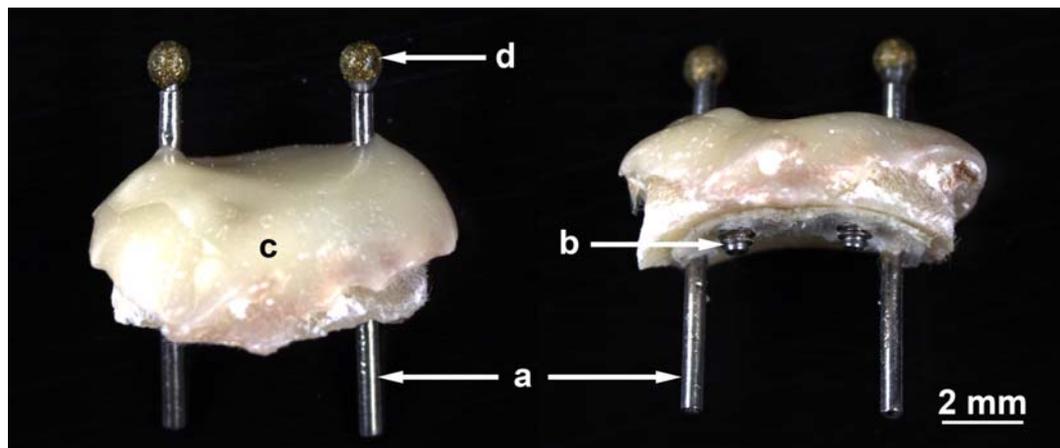


Abb. 3: Darstellung des Implantates.

Der untere Abschnitt der Führungskanülen (a) befand sich im Hirngewebe einen Millimeter über dem Zielareal, dem NAME. Die Führungskanülen und die Schrauben (b) wurden mit Zahnzement (c) untereinander und an der Schädeldecke fixiert. Als Schutz vor Verstopfung erfolgte der Verschluss der Führungskanülen mit gekürzten Insektennadeln (d).

2.2.3 Injektion in den NAME

Erfolgt die Injektion vor dem *Sampling*, so wurden die Versuchstiere zwei Stunden vor Beginn der Injektionen in ihre Versuchskäfige isoliert. Die bilaterale Injektion von Substanzen in den NAME erfolgte unter kontinuierlicher Isofluran-Inhalationsnarkose. Die Insektennadeln wurden für die Dauer der Injektion aus den Führungskanülen entfernt. Die Injektion erfolgte mit Hilfe von Injektionskanülen. Jede Injektionskanüle war mit einem kalibrierten Kunststoffschlauch verbunden. Die Kunststoffschläuche wurden zunächst mit NaCl-Lösung befüllt. Anschließend wurde die entsprechend zu injizierende Substanz in die Schläuche gesogen. Eine trennende Luftblase zwischen der NaCl-Lösung und der Substanz erlaubte

während des Injektionsvorganges die Kontrolle der Fließgeschwindigkeit und des verabreichten Flüssigkeitsvolumens. In jede der beiden Führungskanülen wurde simultan je eine Injektionskanüle eingebracht (Abb. 4 A). Die Injektionskanülen waren einen Millimeter länger als die Führungskanülen, sodass sie über die Führungskanülenlänge hinaus bis zum NAME in das Hirngewebe eindringen. Über das freie Ende des Kunststoffschlauches wurden die Injektionskanülen mit einer Mikroinjektionspumpe verbunden (Abb. 4 B). Mit Hilfe dieser Pumpe erfolgte die bilaterale Injektion von 0,5 µl Substanz über einen Zeitraum von einer Minute. Um eine vollständige Diffusion der Substanzen zu gewährleisten, wurden die Injektionskanülen eine weitere Minute im Gewebe belassen. Die Versuchstiere wachten nach der Injektion in ihren Versuchskäfigen aus der Narkose auf.

Versuchstiere mit verstopften oder beschädigten Führungskanülen wurden von der Studie ausgeschlossen.

Bei allen Injektionsexperimenten handelte es sich um doppelblinde Überkreuzstudien. Die injizierten Substanzen wurden vor Beginn durch eine an den Experimenten unbeteiligte Person kodiert, sodass die Experimentatorin während des Versuches und der Datenauswertung nicht wusste, ob den Versuchstieren die Kontrollsubstanz oder das Verum injiziert wurde. Zudem wurden die Versuchstiere in zwei Gruppen unterteilt. Den beiden Gruppen wurde in einem ersten Injektionsdurchlauf jeweils eine Substanz (Verum oder Kontrollsubstanz, kodiert) injiziert. Nach sieben Tagen wurde den beiden Gruppen in einem zweiten Injektionsdurchlauf die entsprechend andere Substanz injiziert (Überkreuzdesign). Eine Verfälschung der Ergebnisse aufgrund experimenteller oder tagesformbedingter Unterschiede konnte dadurch vermindert werden. Außerdem diente jedes Versuchstier als eigene Kontrolle.

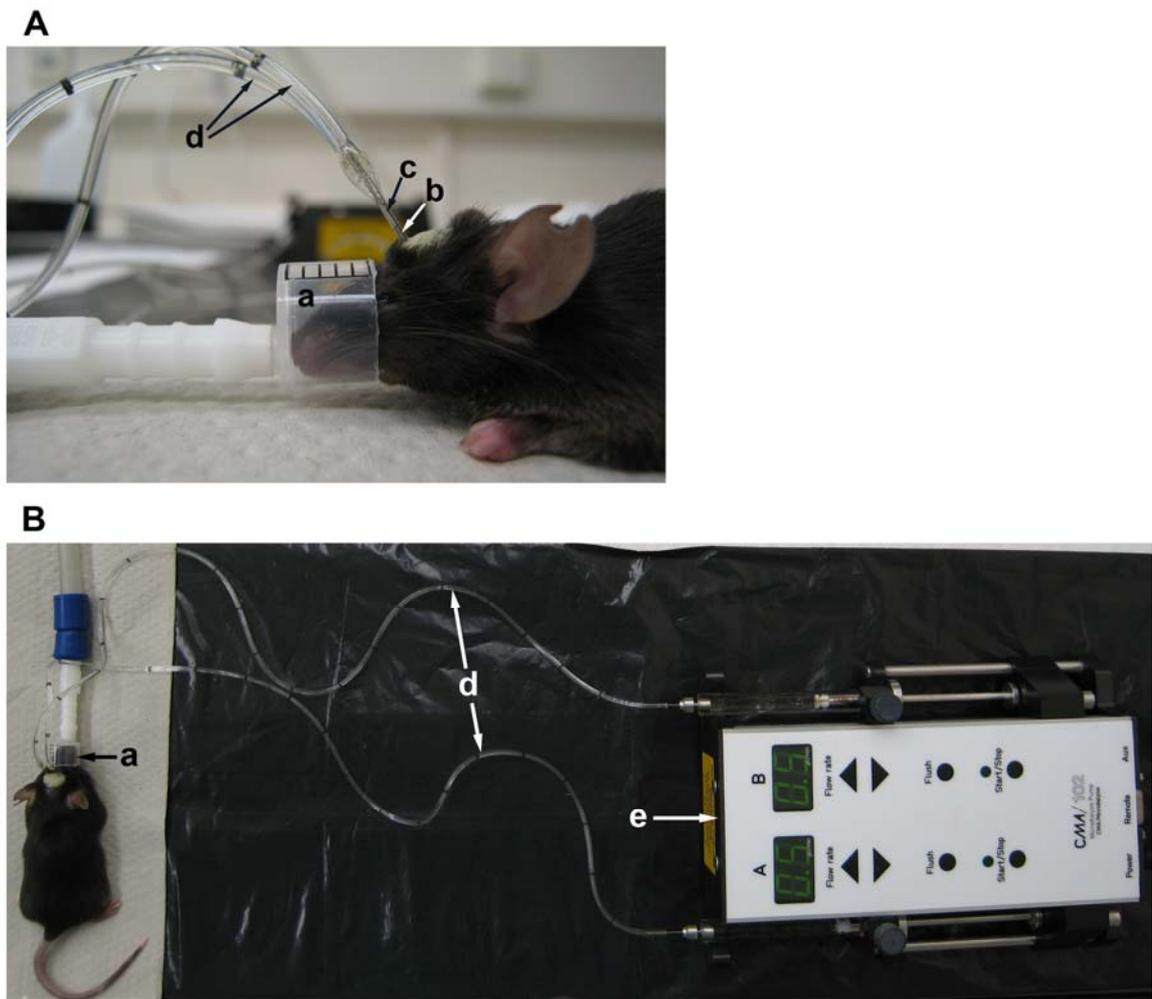


Abb. 4: Darstellung des Aufbaus für die intraamygdaloidale Injektion.

(A) Unter kontinuierlicher Isofluran-Inhalationsnarkose des Versuchstieres über eine Atemmaske (a) wurde in jede Führungskanüle (b) eine Injektionskanüle (c) gebracht. (B) Die Injektion erfolgte über kalibrierte Kunststoffschläuche (d) mit Hilfe einer Mikroinjektionspumpe (e).

2.2.4 Histologie

Im Anschluss an die Versuchsreihen wurde die Position der Führungskanülen bei jedem Versuchstier histologisch überprüft. Dazu wurden die Versuchstiere mit Isofluran getötet. Nach der Dekapitation wurde das Gehirn entnommen, für zwei Minuten in mit flüssigem Stickstoff auf $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlten 2-Methylbutan eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Mit einem Kryostat wurden $25\text{ }\mu\text{m}$ dicke, koronale Hirnschnitte angefertigt und direkt auf SuperFrost[®] Plus-Objektträger aufgenommen. Nachdem die Hirnschnitte getrocknet waren, wurden sie einer Färbung nach Nissl (in dieser Reihenfolge: eine Minute Kresylviolett, 20 Sekunden 70 % Ethanol, 20 Sekunden 96 % Ethanol, fünf Minuten Isopropanol, fünf Minuten Xylol) unterzogen und abschließend mit DePeX und Deckgläsern eingedeckt. Die durch die Führungskanülen und die Injektion entstandenen Läsionen wurden lichtmikroskopisch (Mikroskop: Axio Imager.M1; Computerprogramm: AxioVision)

dokumentiert und ausgewertet. Befand sich die anhand der Läsion rekonstruierte Injektionsstelle mehr als einen Millimeter außerhalb der Grenzen des NAME, so wurden die Daten dieser Versuchstiere von der Analyse ausgeschlossen. Anhand der histologischen Präparate wurden die Koordinaten vor jeder weiteren Implantation korrigiert.

2.2.5 Immunhistochemie

Um das Hirngewebe für die immunhistochemischen Untersuchungen zu gewinnen, wurden die Versuchstiere zunächst mit einer intraperitonealen Injektion einer 5:3 Mischung aus Ketavet[®] und Domitor[®] (0,1 ml/Maus) narkotisiert. Anschließend wurden die Versuchstiere über die linke Herzkammer mit einer NaCl-Lösung, gefolgt von einer Formaldehydlösung, perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen, für 24 Stunden in Formaldehydlösung nachfixiert, daraufhin in Sucroselösung überführt und unter leichtem Schütteln bei 4 °C bis zur Infiltration der Sucrose in das Gewebe (ca. zwei bis drei Tage) aufbewahrt. Danach konnten die Gehirne auf einem Korkplättchen mit Einbettmedium ummantelt, mit 2-Methylbutan auf - 50 °C heruntergekühlt und bei - 80 °C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren werden. Mit dem Kryostat wurden 25 µm dicke, koronale Hirnschnitte angefertigt, in 24-Well-Platten mit PBS überführt und zweimalig mit PBS gewaschen. Alle Schritte der im Folgenden beschriebenen Färbeprozedur erfolgten, sofern nicht anders angegeben, unter leichtem Schütteln und bei Raumtemperatur. Alle Waschschritte erfolgten mit PBS jeweils dreimalig für zehn Minuten. Um die Penetration des Antikörpers in das Gewebe zu erleichtern und Aldehydbindungen, die möglicherweise mit dem Antikörper interagieren könnten, zu unterdrücken, wurden die Hirnschnitte für 15 Minuten mit Natrium-Borhydrid (1 % in PBS) behandelt und anschließend gewaschen. Daraufhin wurden die Hirnschnitte für 20 Minuten mit einer Methanol-H₂O₂-Lösung inkubiert, um endogene Peroxidasen zu zerstören. Die Hirnschnitte wurden gewaschen. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit Ziegennormalserum (ZNS)-Lösung für 30 Minuten folgte die Behandlung der Hirnschnitte mit dem primären Antikörper (in ZNS-Lösung) bei 4 °C. Nach drei Nächten wurden die Hirnschnitte wiederum gewaschen. Auf das Blockieren mit Rinderserumalbumin (RSA)-Lösung für eine Stunde folgte die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (in RSA-Lösung). Nach einer Nacht wurden die Hirnschnitte gewaschen, für eine Stunde mit RSA (0,2 % in PBS) und anschließend für vier Stunden mit einer Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex-Lösung behandelt und erneut gewaschen. Eine Änderung des pH-Wertes wurde durch einmaliges, zehnminütiges Waschen mit 50 mM TRIS-Puffer erzielt. Die Visualisierung der Antikörperbindungsstellen erfolgte durch eine Überschichtung der Hirnschnitte mit DAB (0,05 % in 50 mM TRIS-

Puffer, 0,5 ml pro Well) und die Reaktion mit H₂O₂ (0,3 %, 25 µl pro Well, vier Minuten). Diese Reaktion wurde durch Waschen gestoppt. Die Hirnschnitte wurden in Leitungswasser überführt, auf gelatinierte Objektträger gezogen und mindestens eine Stunde lang getrocknet. Einer aufsteigenden Alkoholreihe (in dieser Reihenfolge jeweils fünf Minuten: 70 %, 85 %, 96 %, zweimal 100 % Ethanol, anschließend zweimal zehn Minuten Xylol) folgte das abschließende Eindecken der Präparate mit DePeX und Deckgläsern.

2.3 Experimente

2.3.1 Vorversuche

2.3.1.1 Einfluss des Jungtiergeschlechtes auf die Untersuchungszeit und das Aggressions- und Sexualverhalten

Die Untersuchungszeit und die Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens unoperierter Versuchstiere gegenüber Jungtieren männlichen und weiblichen Geschlechtes wurde während einer vierminütigen Jungtierexposition (entspricht dem *Sampling*) erfasst.

2.3.1.2 Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase

An sieben aufeinanderfolgenden Tagen nach der OP wurde die Körpermasse der Versuchstiere bestimmt. Weiterhin wurde sowohl die Untersuchungszeit als auch die Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens gegenüber einem Jungtier während einer vierminütigen Jungtierexposition (entspricht dem *Sampling*) an sieben aufeinanderfolgenden Tagen gemessen (Abb. 5). Um Habituationen auszuschließen, wurde dem Versuchstier an jedem dieser sieben Testtage ein neues, unbekanntes Jungtier (Abb. 5: J₁ – J₇) präsentiert.

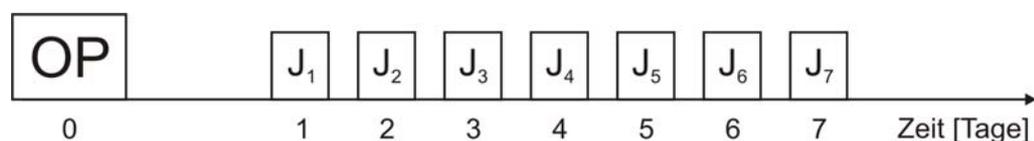


Abb. 5: Experimentelles Design zur Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase. An sieben aufeinanderfolgenden Tagen nach der OP wurde die Körpermasse der Versuchstiere, die Untersuchungszeit und die Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens gegenüber einem Jungtier erfasst. J: Jungtier; OP: Operation.

2.3.1.3 Einfluss der OP auf die soziale Diskriminierung und das Aggressions- und Sexualverhalten

Vor jeder OP-Reihe wurden die Versuchstiere im Verhaltenstest auf ihre Fähigkeit zur sozialen Diskriminierung untersucht. Besonders aggressive Versuchstiere wurden nicht operiert. Ein möglicher Einfluss der OP auf die Fähigkeit zur sozialen Diskriminierung der Versuchstiere wurde überprüft, indem der Verhaltenstest beginnend (*Sampling*) am siebenten Tag nach jeder OP-Reihe durchgeführt wurde. Zudem wurde das Aggressions- und Sexualverhalten der Versuchstiere gegenüber den Jungtieren vor und nach der OP erfasst.

2.3.1.4 Soziale Diskriminierung nach Transport

Um Störungen der dem Verhaltenstest unterzogenen Versuchstiere durch mögliche Geräusche und Fremdgerüche zu vermeiden, wurden die Injektionen in einem anderen Raum durchgeführt. Aus diesem Grund wurde im Rahmen von Vorversuchen getestet, ob der Transport der Versuchstiere und/oder die Isoflurannarkose bzw. die Injektionsprozedur einen Einfluss auf die Fähigkeit zur sozialen Diskriminierung hatten. Zu diesem Zwecke wurden die Versuchstiere direkt vor dem *Sampling* entweder a) in den Injektionsraum transportiert, dort kurz mit ihrem Versuchskäfig abgestellt und wieder in den Messraum zurückgebracht (ca. zwei Minuten bis zum *Sampling*) oder b) in den Injektionsraum transportiert, dort kurz mit Isofluran betäubt und in den Messraum zurückgebracht, wo sie aus der Narkose aufwachen konnten (ca. vier Minuten bis zum *Sampling*) oder c) in den Injektionsraum transportiert, dort einer Scheininjektion unterzogen (gesamte Injektionsprozedur wie unter 2.2.3 beschrieben, jedoch ohne die eigentliche Injektion einer Substanz) und in den Messraum zurückgebracht, wo sie aus der Narkose aufwachen konnten und sechs Minuten Erholungszeit vor dem *Sampling* hatten (insgesamt ca. neun Minuten bis zum *Sampling*). Entsprechend dem Verhaltenstest wurde nach einem EI von 24 Stunden *Choice* durchgeführt.

2.3.1.5 Konzentration Muscimol

Muscimol wurde in NaCl-Lösung gelöst und in fünf verschiedenen Konzentrationen (4,4 mM; 2,2 mM; 1,1 mM, 367 μ M; 110 μ M) drei Stunden vor einer vierminütigen Jungtierexposition (entspricht dem *Sampling*) injiziert. Während der Jungtierexposition wurde die Untersuchungszeit bestimmt. Zusätzlich bewertete die Experimentatorin die lokomotorische Aktivität, die Reaktion der Versuchstiere auf taktile Stimulation und den Atemrhythmus auf einer Skala von eins bis sechs, wobei sechs der Intensität des Verhaltens eines Kontrolltieres (Injektion von NaCl-Lösung) entsprach.

2.3.1.6 Diffusion von Muscimol BODIPY TMR-X

Muscimol BODIPY TMR-X (1 mg) wurde durch kräftiges Schütteln (Vortex), mehrfache Erwärmung und Ultraschall in NaCl-Lösung (2 ml) gelöst und jeweils fünf Versuchstieren in den Konzentrationen 367 μM (siehe 2.3.2.2: entspricht der Molarität des in den Hauptversuchen injizierten Muscimols) und 823 μM injiziert. Drei Stunden nach der Injektion wurden die Versuchstiere, wie unter 2.2.5 beschrieben, narkotisiert, perfundiert und ihre Gehirne eingefroren und geschnitten. Die Hirnschnitte wurden nach dem Schneiden frei flotierend in PBS aufgefangen, direkt auf gelatinierte Objektträger aufgezogen und nach dem Trocknen mit Immumount und Deckgläsern eingedeckt. Die Dokumentation des Diffusionsareals erfolgte lichtmikroskopisch (Mikroskop: Axio Imager.M1; Computerprogramm: AxioVision), wobei das Muscimol BODIPY TMR-X mit einer Wellenlänge von 544 nm angeregt wurde und Fluoreszenzlicht von 570 nm emittierte.

2.3.1.7 c-Fos-Synthese nach Injektion von Anisomycin versus NaCl-Lösung

Die Versuchstiere wurden zwei Stunden vor der Injektion in Versuchskäfige isoliert. Anisomycin wurde durch die Zugabe weniger Mikroliter HCl (1 M) gelöst und durch die Zugabe des gleichen Volumens NaOH (1 M) neutralisiert (pH 7,0 bis 7,2). Anschließend wurde das gelöste Anisomycin mit NaCl-Lösung auf eine Endkonzentration von 40 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. Injiziert wurden bei einem Injektionsvolumen von 0,5 μl dementsprechend 20 μg Anisomycin pro Seite. Anisomycin oder NaCl-Lösung (Kontrolle) wurde drei Stunden vor einer vierminütigen Jungtierexposition (entspricht dem *Sampling*) injiziert. Sowohl die Konzentration des Anisomycins als auch der Injektionszeitpunkt entsprach damit dem in den Hauptversuchen verwendeten Protokoll (siehe 2.3.2.3). Während der Jungtierexposition wurde das Untersuchungsverhalten gegenüber dem Jungtier aufgezeichnet (siehe 2.2.1). 70 Minuten später wurden die Versuchstiere, wie unter 2.2.5 beschrieben, narkotisiert, perfundiert und die Hirnschnitte der immunhistochemischen Färbung gegen c-Fos zugeführt. Es wurden von jedem Versuchstier mindestens drei vergleichbare Hirnschnitte im Bereich des NAME und des Pir mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Axio Imager.M1; Objektiv 10x) fotografiert. Mit dem Computerprogramm AxioVision wurde im Bereich des NAME ein Areal mit einer Größe von 0,118 mm^2 und im Bereich des Pir ein Areal mit einer Größe von 0,337 mm^2 markiert. Innerhalb dieser Areale erfolgte das Auszählen der c-Fos-immunpositiven Zellen.

2.3.2 Hauptversuche

2.3.2.1 Injektion von Lidocain versus NaCl-Lösung

Alle Versuchstiere wurden vor den Injektionen im Verhaltenstest auf ihre Fähigkeit zur sozialen Diskriminierung getestet.

Die Konzentration der Lidocain-Lösung betrug $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. Bei einem Injektionsvolumen von $0,5 \mu\text{l}$ wurden dementsprechend $10 \mu\text{g}$ Lidocain pro Seite injiziert. Als Kontrollsubstanz wurden den Versuchstieren $0,5 \mu\text{l}$ NaCl-Lösung pro Seite injiziert. Die Injektion erfolgte zu drei verschiedenen Zeitpunkten während des Verhaltenstests: direkt vor dem *Sampling* oder drei Stunden nach dem *Sampling* oder direkt vor *Choice* (Abb. 6). Wurde direkt vor dem *Sampling* oder direkt vor *Choice* injiziert, betrug die Erholungszeit sechs Minuten zwischen der Injektion und der Exposition.

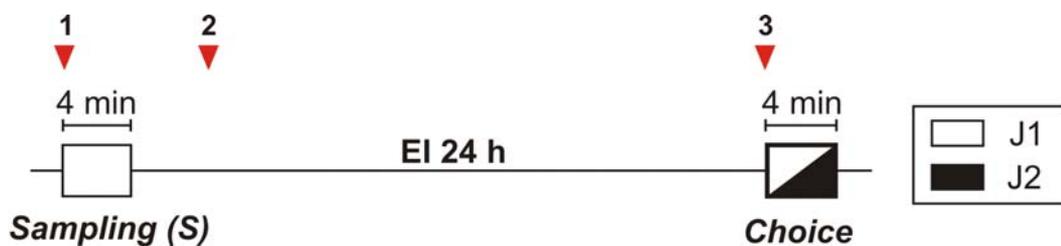


Abb. 6: Zeitpunkte der Injektion von Lidocain und NaCl-Lösung während der sozialen Diskriminierung. Lidocain oder NaCl-Lösung wurde entweder direkt vor dem *Sampling* (1) oder drei Stunden nach dem *Sampling* (2) oder direkt vor *Choice* injiziert (3). EI: Expositionsintervall; J: Jungtier.

2.3.2.2 Injektion von Muscimol versus NaCl-Lösung

Alle Versuchstiere wurden vor den Injektionen im Verhaltenstest auf ihre Fähigkeit zur sozialen Diskriminierung getestet.

Muscimol wurde mit NaCl-Lösung auf eine Konzentration von $41,6 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ($367 \mu\text{M}$) verdünnt. Bei einem Injektionsvolumen von $0,5 \mu\text{l}$ wurden dementsprechend $20,8 \text{ ng}$ Muscimol pro Seite injiziert. Als Kontrollsubstanz wurden den Versuchstieren $0,5 \mu\text{l}$ NaCl-Lösung pro Seite injiziert. Die Injektionen fanden entweder drei Stunden vor dem *Sampling* oder drei Stunden vor *Choice* (Abb. 7) statt.

Die Versuchstiere wurden ein bis zwei Wochen nach Beendigung der Injektionsexperimente im Verhaltenstest auf ihre soziale Diskriminierungsfähigkeit getestet, um mögliche Langzeitkonsequenzen des Muscimols feststellen zu können.

2.3.2.3 Injektion von Anisomycin versus NaCl-Lösung

Alle Versuchstiere wurden vor den Injektionen im Verhaltenstest auf ihre Fähigkeit zur sozialen Diskriminierung getestet.

Anisomycin wurde, wie unter 2.3.1.7 beschrieben, gelöst. Pro Seite wurden 0,5 µl der Anisomycin-Lösung (20 µg Anisomycin) bzw. 0,5 µl NaCl-Lösung (Kontrollsubstanz) entweder drei Stunden vor dem *Sampling* oder drei Stunden vor *Choice* (Abb. 7) injiziert.

Um eine mögliche Langzeitwirkung/-inhibition durch Anisomycin erfassen zu können, wurden die Versuchstiere ein bis zwei Wochen nach den Injektionsexperimenten im Verhaltenstest auf ihre soziale Diskriminierungsfähigkeit getestet.

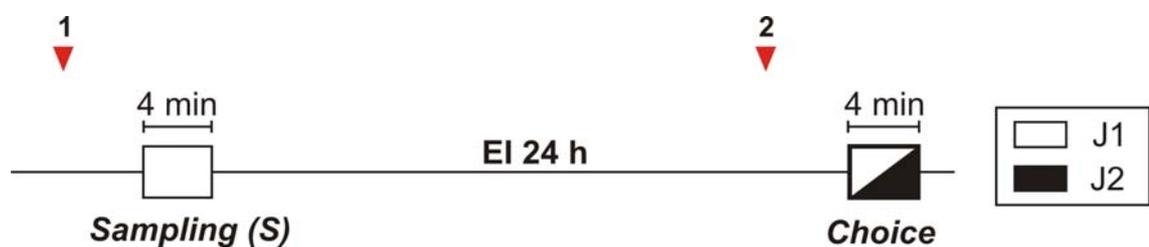


Abb. 7: Zeitpunkte der Injektion von Muscimol, Anisomycin und NaCl-Lösung während der sozialen Diskriminierung.

Die Substanzen wurden entweder drei Stunden vor dem *Sampling* (1) oder drei Stunden vor *Choice* (2) injiziert. EI: Expositionsintervall; J: Jungtier.

2.3.2.4 c-Fos-Synthese nach Präsentation der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ im VFC

Unoperierten Versuchstieren wurden die volatilen Bestandteile im VFC (Noack *et al.*, 2010; Engelmann *et al.*, 2011) präsentiert. Der VFC besteht aus einem Käfigteil (Abb. 8 a; Typ III Käfig) mit zwei Löchern (Durchmesser 7 cm) in einer Seitenwand. In jedes Loch ist eine durchsichtige Plastikröhre (Abb. 8 b) geschraubt, an der sich ein Computerlüfter (Abb. 8 c) befindet. Der Innenraum des Käfigteils ist von dem der Plastikröhren durch ein Metallgitter in jedem Loch der Käfigwand getrennt.

Die Versuchstiere wurden am Abend vor dem Experiment in den für jedes Versuchstier mit frischer Einstreu befüllten Käfigteil des VFC isoliert. Am nächsten Morgen wurde für die Präsentation ein Jungtier in eine der beiden Röhren gesetzt. Der Computerlüfter erzeugte einen Luftstrom durch die Röhre (1 m/s im Zentrum der Röhre) über das Jungtier hinweg und durch das Metallgitter in den Käfigteil hinein. Das Versuchstier hatte keinen direkten Kontakt zu dem Jungtier, konnte also die nicht-volatilen Bestandteile der „olfaktorischen Signatur“ nicht detektieren. Die Präsentation erfolgte für vier Minuten. Die Kontrolltiere erhielten für vier Minuten einen Luftstrom (Raumluft), indem der Computerlüfter einer Röhre, in der sich

jedoch kein Jungtier befand, angeschaltet wurde. Während der Präsentation wurde das aktive Schnüffeln der Versuchstiere in Richtung des Luftstromes in einem Abstand von 5 cm um das Metallgitter herum als Untersuchungsverhalten aufgezeichnet (siehe 2.2.1). 120 Minuten nach der Präsentation der volatilen Bestandteile der „olfaktorischen Signatur“ eines Jungtieres bzw. des Luftstromes wurden die Versuchstiere, wie unter 2.2.5 beschrieben, narkotisiert, perfundiert und die Hirnschnitte der immunhistochemischen Färbung gegen c-Fos unterzogen. Die Analyse der c-Fos-Synthese im NAME und im Pir erfolgte wie unter 2.3.1.7 beschrieben.

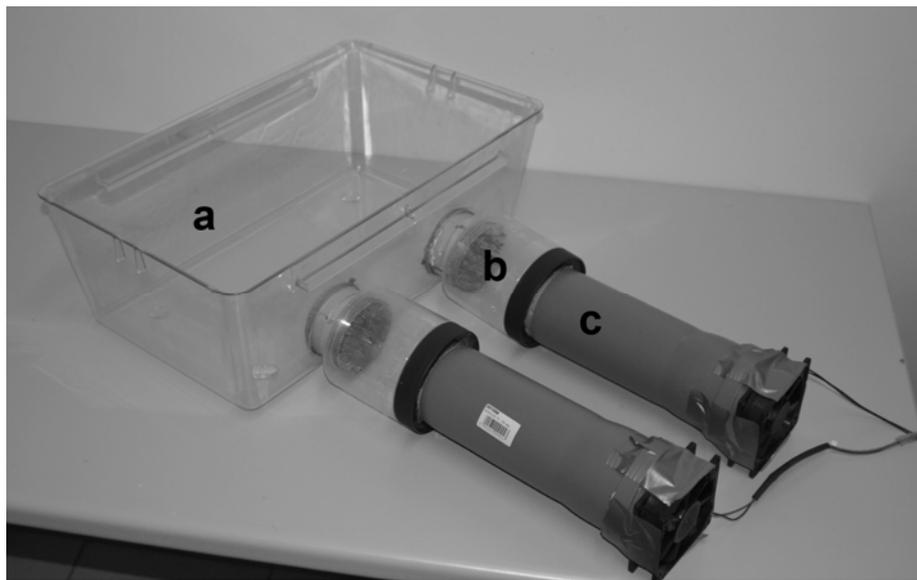


Abb. 8: VFC (*volatile fraction cage*).

Der VFC besteht aus einem Käfigteil (a) mit zwei Löchern in einer Seitenwand. In jedes der beiden Löcher ist eine Plastikröhre (b) geschraubt. Der Innenraum des Käfigteils ist von dem der Plastikröhren durch ein Metallgitter abgegrenzt. An jeder Plastikröhre befindet sich ein Computerlüfter (c).

2.3.3 Statistische Analyse der Daten

2.3.3.1 Analyse der Daten aus den Verhaltensversuchen

Die mit Hilfe des Computerprogramms EVENTLOG gewonnenen Dateien wurden mit dem Computerprogramm WinRat geöffnet. Die damit erschlossenen Daten aus den Verhaltenstests wurden mit dem Computerprogramm GraphPad Prism als Mittelwerte (MW) + Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels der Computerprogramme GraphPad Prism und GB-STAT.

Anhand dreier Tests (Kolmogorov-Smirnov; D'Agostino-Pearson; Shapiro-Wilk) wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft. Bestätigte mindestens einer der drei Tests die Normalverteilung der Daten, so wurden diese der parametrischen Analyse unterzogen.

Die statistische Signifikanz der Daten aus der Untersuchung des Einflusses des Geschlechtes der Jungtiere auf die Untersuchungszeit wurde mit Hilfe eines t-Tests und auf die Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests überprüft.

Die statistische Signifikanz der Daten aus der Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase wurde mit Hilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen und, wenn erlaubt, mit anschließendem Dunnett's-Test (verglich die Werte eines jeden Tages nach der OP mit den Werten des Kontrolltages vor der OP) überprüft. Waren die Daten nicht normalverteilt, so erfolgte die Überprüfung auf statistisch signifikante Unterschiede mit dem Friedman-Test.

Die statistische Analyse der Daten der sozialen Diskriminierung vor und nach der OP sowie nach Transport erfolgte mit einem t-Test für gepaarte Stichproben (Untersuchungszeiten gegenüber J1 und J2 während *Choice*). Der statistische Vergleich der Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens der Versuchstiere gegenüber J1 während des *Samplings* bzw. gegenüber J1 und J2 (Summe der Verhaltensdauer) während *Choice* vor und nach der OP erfolgte mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test.

Die anhand verschiedener Verhaltensparameter gewonnenen Daten für verschiedene Muscimol-Konzentrationen wurden gleichzeitig als Einzelwerte und als $MW \pm SEM$ dargestellt. Eine statistische Analyse dieser Daten wurde aufgrund der niedrigen Stichprobenmenge nicht durchgeführt.

Die vorliegende Studie wurde so geplant, dass die Daten aus den Injektionsexperimenten (Untersuchungszeiten der Versuchstiere gegenüber J1 und J2 während *Choice*) mit einem t-Test für gepaarte Stichproben statistisch analysiert werden sollten. Dies ist damit zu begründen, dass es nicht von Bedeutung war, ob die injizierten Substanzen oder der Injektionszeitpunkt einen Einfluss auf die Gesamtuntersuchungszeit hatten. Es galt vielmehr statistisch zu prüfen, ob die Versuchstiere in jedem einzelnen Injektionsfall das neue J2 signifikant länger als J1 untersuchten (Engelmann *et al.*, 1995). Waren die Untersuchungszeiten gegenüber J1 bzw. J2 während *Choice* nicht normalverteilt, so wurden diese zusätzlich mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test auf Unterschiede geprüft.

Über die Analyse mit dem t-Test für gepaarte Stichproben hinaus, wurde dennoch für jeden Injektionszeitpunkt eine zweifaktorielle, randomisierte Block-ANOVA (Behandlung x Jungtier) und zusätzlich eine einfaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen der während *Choice* gewonnenen Daten durchgeführt. Erlaubten es die Ergebnisse der ANOVA, so wurde anschließend der Newman-Keuls-Test durchgeführt.

Die Daten der sozialen Diskriminierung nach der OP aller Versuchstiere, die für die jeweiligen Injektionsexperimente (verschiedene Zeitpunkte) mit einer Substanz eingesetzt wurden und die Daten aus dem Verhaltenstest nach Beendigung der Injektionsexperimente wurden mit einem t-Test für gepaarte Stichproben (Untersuchungszeiten gegenüber J1 und J2 während *Choice*) geprüft.

Für die statistische Analyse des Aggressions- und Sexualverhaltens der Versuchstiere (Dauer des Verhaltens und Anzahl der Verhaltensepisoden) wurden die Basalwerte (Verhalten ohne Injektion), die Werte nach der Injektion der NaCl-Lösung und die Werte nach der Injektion des Verums entweder mit dem Friedman-Test und anschließendem Dunn-Test (Vergleich Basalwerte *versus* Injektion von NaCl-Lösung; Vergleich Basalwerte *versus* Injektion des Verums) oder, bei Normalverteilung der Daten, mit einer einfaktoriellen ANOVA für wiederholte Messungen und anschließendem Dunnett's-Test (Vergleich Basalwerte *versus* Injektion von NaCl-Lösung; Vergleich Basalwerte *versus* Injektion des Verums) verglichen. Für die Analyse des Aggressions- und Sexualverhaltens während des *Samplings* wurde die Verhaltensdauer bzw. die Anzahl der Verhaltensepisoden gegenüber J1 nach den genannten Behandlungen der Versuchstiere verglichen. Für die Analyse des Aggressions- und Sexualverhaltens während *Choice* wurde die Summe der Verhaltensdauer bzw. die Summe der Anzahl der Verhaltensepisoden gegenüber J1 und J2 nach den genannten Behandlungen der Versuchstiere verglichen.

Betrug die Irrtumswahrscheinlichkeit weniger als 5 %, wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen als statistisch signifikant gewertet.

2.3.3.2 Analyse der Daten der c-Fos-Synthese

Die Untersuchungszeit gegenüber einem Jungtier wurde für beide Behandlungsgruppen als MW + SEM dargestellt und nach Prüfung auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch überprüft.

Die Anzahl c-Fos-immunpositiver Zellen mehrerer Hirnschnitte wurde für jedes Tier gemittelt. Die MW aller Tiere wurden als Einzelwerte und deren MW für jede Behandlungs-

gruppe mit dem Computerprogramm GraphPad Prism dargestellt. Bestätigte der Kolmogorov-Smirnov-Test die Normalverteilung der Daten in den einzelnen Behandlungsgruppen, so wurden diese anschließend mit einem t-Test auf Unterschiede überprüft.

3 ERGEBNISSE

3.1 Histologie

Die durch die Injektionen entstandenen Läsionen zeigten sich in den nach Nissl gefärbten Hirnschnitten als tiefviolette Anhäufung von zerstörtem Gewebe und Blut in einem Bereich, welcher sich von ca. 0,5 mm dorsal des NAME bis in den antero-dorsalen Teil des NAME erstreckte (Abb. 9).

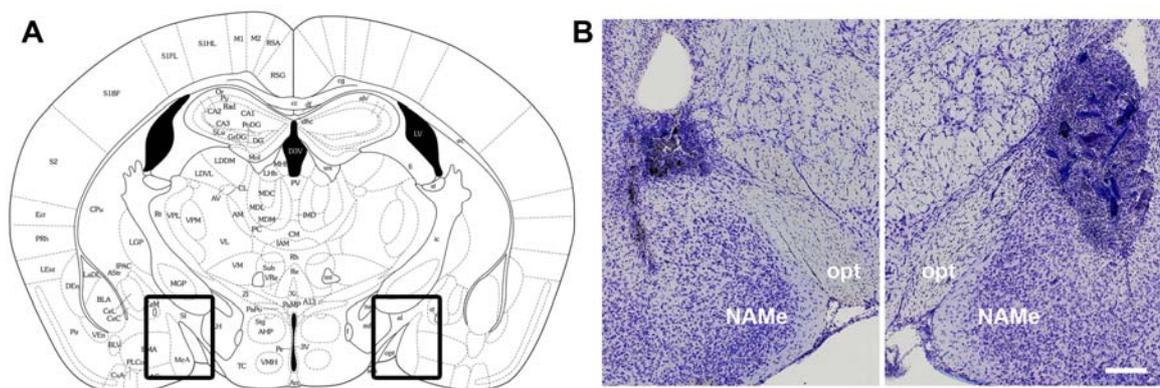


Abb. 9: Repräsentative Abbildungen zur Darstellung der durch die intraamygdaloidale Injektion entstandenen Läsion.

In der schematischen Darstellung eines Frontalschnittes durch das Mäusehirn (A, Bregma - 1,22 mm, modifiziert nach: Franklin & Paxinos, 1997) sind zwei Ausschnitte im Bereich des NAME markiert. An diesen Positionen wurden die repräsentativen Bilder (B) der nach Nissl gefärbten Hirnschnitte aufgenommen. Die Läsionen sind als Hohlräume im Gewebe und die darunter befindliche, tiefviolett gefärbte Anhäufung von zerstörtem Gewebe erkennbar. NAME: *Nucleus amygdalae medialis*; opt: *Tractus opticus*; Maßstab: 200 μ m.

3.2 Vorversuche

3.2.1 Einfluss des Jungtiergeschlechtes auf die Untersuchungszeit und das Aggressions- und Sexualverhalten

Weder in der Untersuchungszeit ($p = 0,9497$; Abb. 10 A) noch in der Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens ($p = 0,3651$; Abb. 10 B) der Versuchstiere gegenüber männlichen und weiblichen Jungtieren waren signifikante Unterschiede festzustellen.

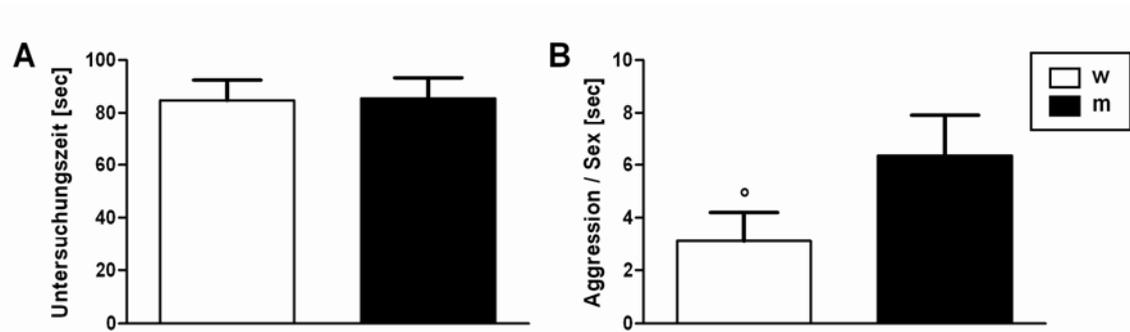


Abb. 10: Einfluss des Geschlechtes der Jungtiere auf die Untersuchungszeit (A) und die Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens (B).

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber Jungtieren beider Geschlechter. w: weibliches Jungtier (n = 18); m: männliches Jungtier (n = 25); MW + SEM; ° Daten nicht normalverteilt.

3.2.2 Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase

Die Körpermasse der Versuchstiere war nach der OP signifikant reduziert (ANOVA: $F_{7,140} = 20,83$; $p < 0,0001$). Nach einer kontinuierlichen Zunahme der Körpermasse über die folgenden Tage, erreichte sie am siebenten postoperativen Tag wieder den Wert des OP-Tages (Abb. 11 A). Das Gewicht des Implantates beträgt $273,3 \pm 9,9$ mg (MW \pm SEM; n = 6) und war damit vernachlässigbar gering.

Die Untersuchungszeit gegenüber einem Jungtier war an den ersten drei postoperativen Tagen signifikant geringer als vor der OP, erreichte aber ab dem vierten postoperativen Tag wieder ihren Ausgangswert (ANOVA: $F_{7,168} = 5,057$; $p < 0,0001$; Abb. 11 B).

Nach der OP gab es keine signifikanten Änderungen in der Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens der Versuchstiere gegenüber einem Jungtier (Friedman-Test: $p = 0,0614$; Abb. 11 C).

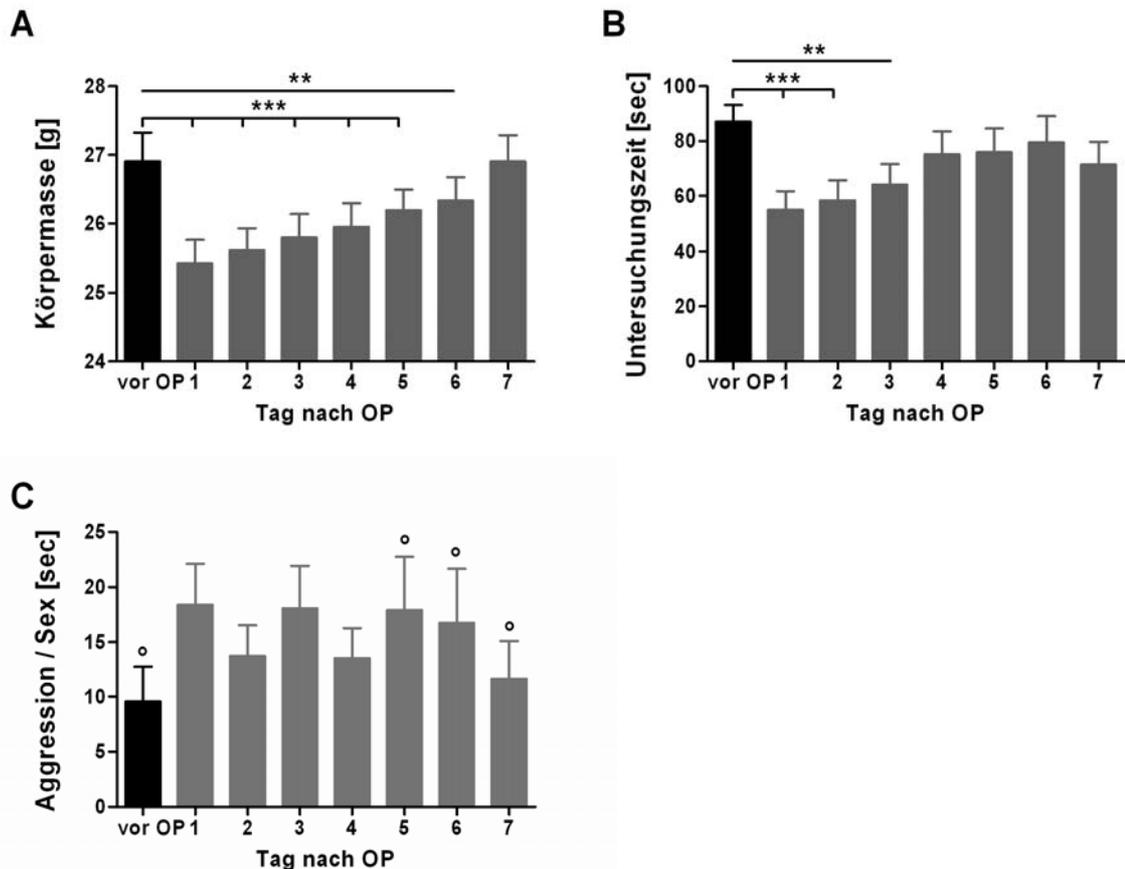


Abb. 11: Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase. **(A)** Körpermasse der Versuchstiere (n = 21). **(B)** Untersuchungszeit gegenüber einem Jungtier (n = 25). **(C)** Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens gegenüber einem Jungtier (n = 25). MW + SEM; *** p < 0,001; ** p < 0,01; ANOVA, anschließend Dunnett's-Test; ° Daten nicht normalverteilt.

3.2.3 Einfluss der OP auf die soziale Diskriminierung und das Aggressions- und Sexualverhalten

Im sowohl vor (p = 0,0037; Abb. 12 A) als auch sieben Tage nach (p < 0,0001; Abb. 12 B) der OP durchgeführten Verhaltenstest auf die soziale Diskriminierungsfähigkeit untersuchten die Versuchstiere das unbekannte J2 gegenüber dem bekannten J1 signifikant länger. Sowohl vor als auch sieben Tage nach der OP untersuchten zwei (jeweils andere) der 25 Versuchstiere J1 länger als J2.

In der Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens der Versuchstiere gegenüber J1 während des *Samplings* (p = 0,0696) bzw. gegenüber J1 und J2 während *Choice* (p = 0,9571) zeigten sich vor und sieben Tage nach der OP keine signifikanten Unterschiede (Abb. 12 C).

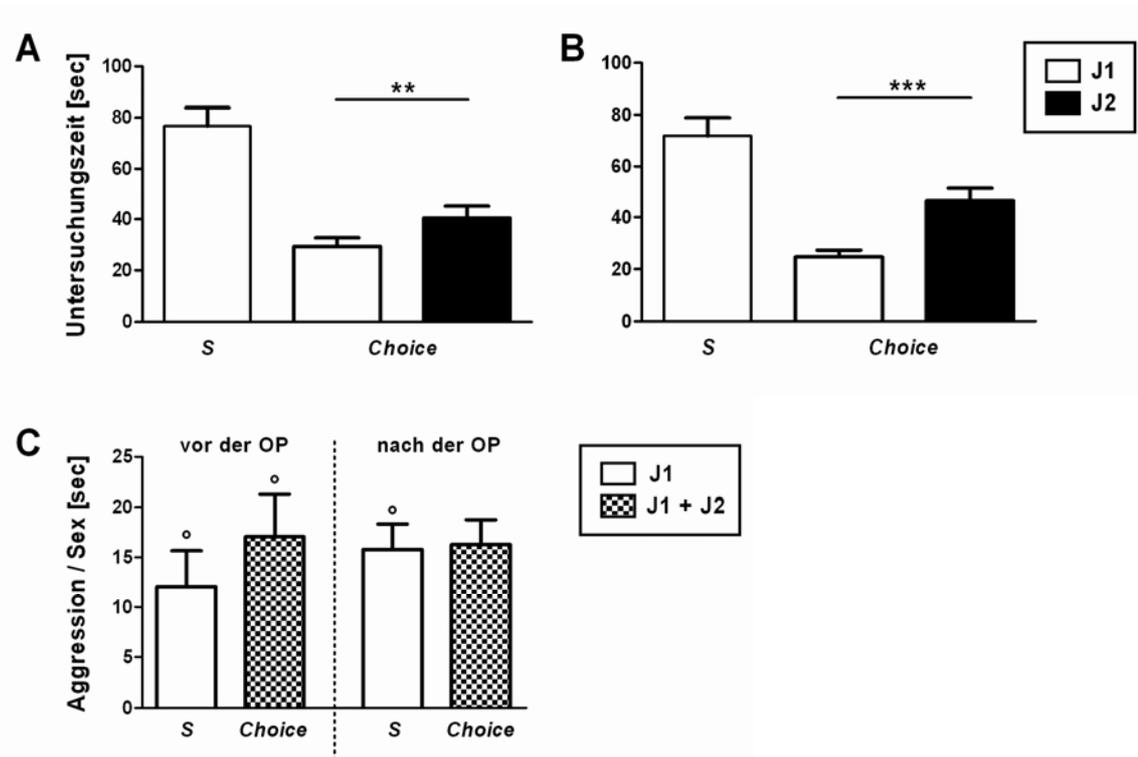


Abb. 12: Soziale Diskriminierung und Aggressions- und Sexualverhalten vor und sieben Tage nach der OP.

J2 wurde während *Choice* sowohl vor der OP (**A**) als auch sieben Tage nach der OP (**B**) signifikant länger untersucht als J1 (n = 25). (**C**) Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens gegenüber J1 während des *Samplings* bzw. gegenüber J1 und J2 während *Choice* vor der OP (linke Spalte) und sieben Tage nach der OP (rechte Spalte). J: Jungtier; S: *Sampling*; MW + SEM; *** p < 0,001; ** p < 0,01; t-Test für gepaarte Stichproben; ° Daten nicht normalverteilt.

3.2.4 Soziale Diskriminierung nach Transport

Die Versuchstiere untersuchten nach a) dem Transport in den Injektionsraum (p = 0,0034; Abb. 13 A), b) einer zusätzlichen Isoflurannarkose (p = 0,0119; Abb. 13 B) bzw. c) einer zusätzlichen Scheininjektion (p = 0,0004; Abb. 13 C) J2 signifikant länger als J1.

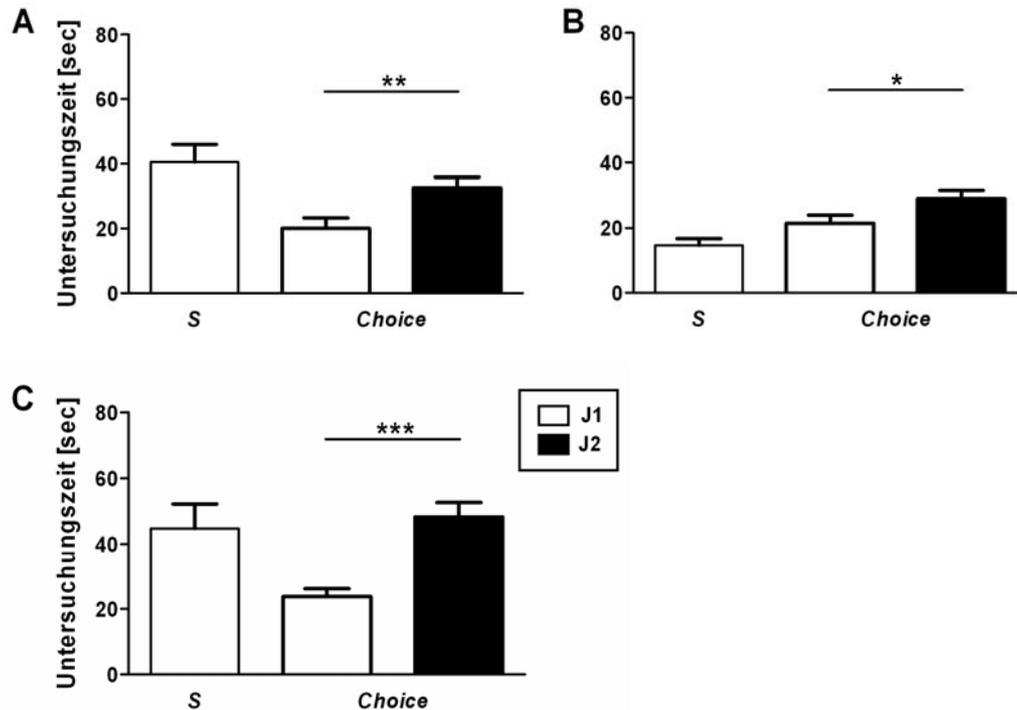


Abb. 13: Soziale Diskriminierung nach Transport. Nach dem Transport in den Injektionsraum (A, n = 21) und zusätzlicher Isoflurannarkose (B, n = 30) oder zusätzlicher Scheininjektion (C, n = 8) untersuchten die Versuchstiere J2 signifikant länger als J1. J: Jungtier; S: Sampling; MW + SEM; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05; t-Test für gepaarte Stichproben.

3.2.5 Konzentration Muscimol

Wurde den Versuchstieren Muscimol in hohen Konzentrationen (1,1 mM; 2,2 mM; 4,4 mM) injiziert, so zeigten sie drei Stunden nach der Injektion deutlich messbare Verhaltensänderungen (Abb. 14). Im Vergleich zu den mit NaCl-Lösung behandelten Kontrolltieren war die lokomotorische Aktivität der Versuchstiere (Abb. 14 A) sowie ihre Reaktion auf taktile Stimulation (Abb. 14 B) reduziert und ihr Atemrhythmus verändert (Abb. 14 C; Hecheln, Schnappatmung, anormal erhöhte oder erniedrigte Frequenz). Zudem zeigten die mit den drei hohen Muscimol-Konzentrationen injizierten Versuchstiere keinerlei Untersuchungsverhalten gegenüber einem präsentierten Jungtier (Abb. 14 D). Weitere, sporadisch aufgetretene Verhaltensauffälligkeiten der mit den drei hohen Muscimol-Konzentrationen injizierten Versuchstiere wurden beobachtet, jedoch nicht quantifiziert: Diese Versuchstiere kauerten gekrümmt, teilweise zuckend oder sich ataktisch bewegend, mit geschlossenen Augen, aber nicht schlafend, letharg an einer Stelle ihres Versuchskäfigs und ignorierten äußere Stimuli. Auch ein flaches Strecken ihres gesamten Körpers wurde vereinzelt beobachtet.

Wurde Muscimol in den Konzentrationen 367 μ M und 110 μ M injiziert, so entsprachen die lokomotorische Aktivität, die Reaktion auf taktile Stimulation, der Atemrhythmus, die

Untersuchungszeit gegenüber einem Jungtier und das Gesamtverhalten denen der Kontrolltiere (Abb. 14).

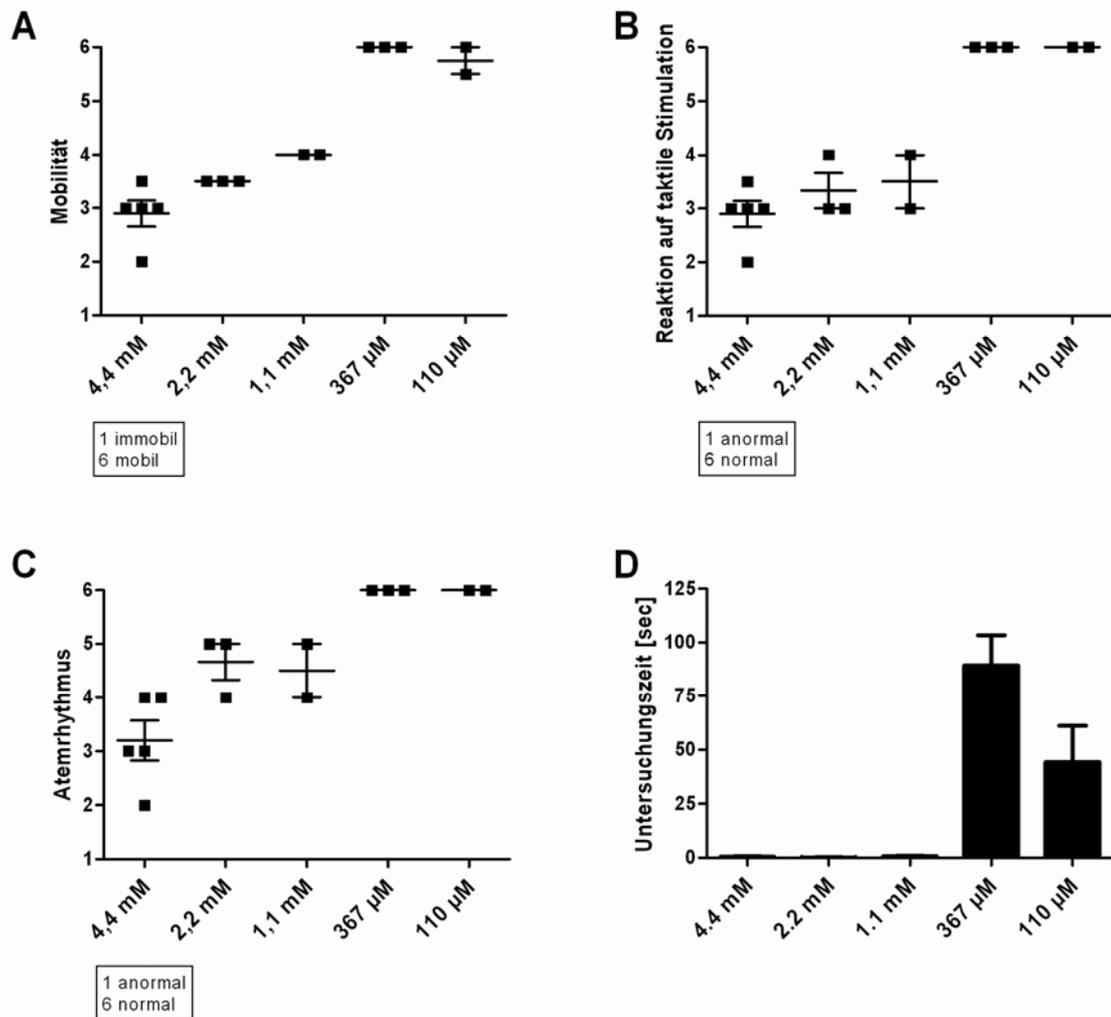


Abb. 14: Verhalten der Versuchstiere drei Stunden nach Injektion verschiedener Muscimol-Konzentrationen in den NAME.

Die lokomotorische Aktivität (A), die Reaktion auf taktile Stimulation (B), der Atemrhythmus (C) und die Untersuchungszeit gegenüber einem Jungtier (D) waren nach Injektion von 4,4 mM (n = 5), 2,2 mM (n = 3) und 1,1 mM (n = 2) Muscimol, im Vergleich zu den mit NaCl-Lösung injizierten Kontrolltieren, verändert. Nach der Injektion von 367 µM (n = 3) oder 110 µM (n = 2) Muscimol entsprach das Verhalten der Versuchstiere dem der Kontrolltiere. A, B und C: ■ Einzelwerte und MW ± SEM; D: MW + SEM.

3.2.6 Diffusion von Muscimol BODIPY TMR-X

1 mg des Feststoffes Muscimol BODIPY TMR-X ließ sich, anders als in der Literatur beschrieben (Allen *et al.*, 2008), weder in 1 ml noch in 2 ml NaCl-Lösung oder durch zusätzliches Schütteln, Erwärmen bzw. durch Ultraschall vollständig lösen. Auf den Einsatz des organischen Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde bewusst verzichtet, da dieses die Diffusionseigenschaften beeinflusst und damit das Ergebnis verfälscht hätte. Um dennoch

einen Eindruck von der Diffusion zu erhalten, wurde das teilweise gelöste Muscimol BODIPY TMR-X in den rechnerisch angestrebten Konzentrationen 367 μM und 823 μM injiziert. In den Hirnschnitten dreier von insgesamt zehn injizierten Versuchstieren konnte keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. In den Hirnschnitten der restlichen Versuchstiere zeigte sich unabhängig von der injizierten Muscimol BODIPY TMR-X-Konzentration folgendes Bild: Das Muscimol BODIPY TMR-X konzentrierte sich, ohne in das Gewebe hineinzudiffundieren, entweder als Pfropfen im Gewebe außerhalb der eigentlichen Kanülen-/Injektionsposition (Abb. 15 A – C) oder als Pfropfen direkt an der Injektionsstelle (Abb. 15 D – F). In den Hirnschnitten einer Maus (823 μM) war weder an der Injektionsstelle noch im umgebenden Gewebe ein Pfropfen zu erkennen, jedoch zeigte sich um die Injektionsstelle herum eine geringfügige Fluoreszenz im Gewebe (ventral: ca. 200 μm ; dorsal entlang des Kanülenstichkanals > 400 μm). Diese erreichte jedoch nicht den NAME (Abb. 15 G – J).

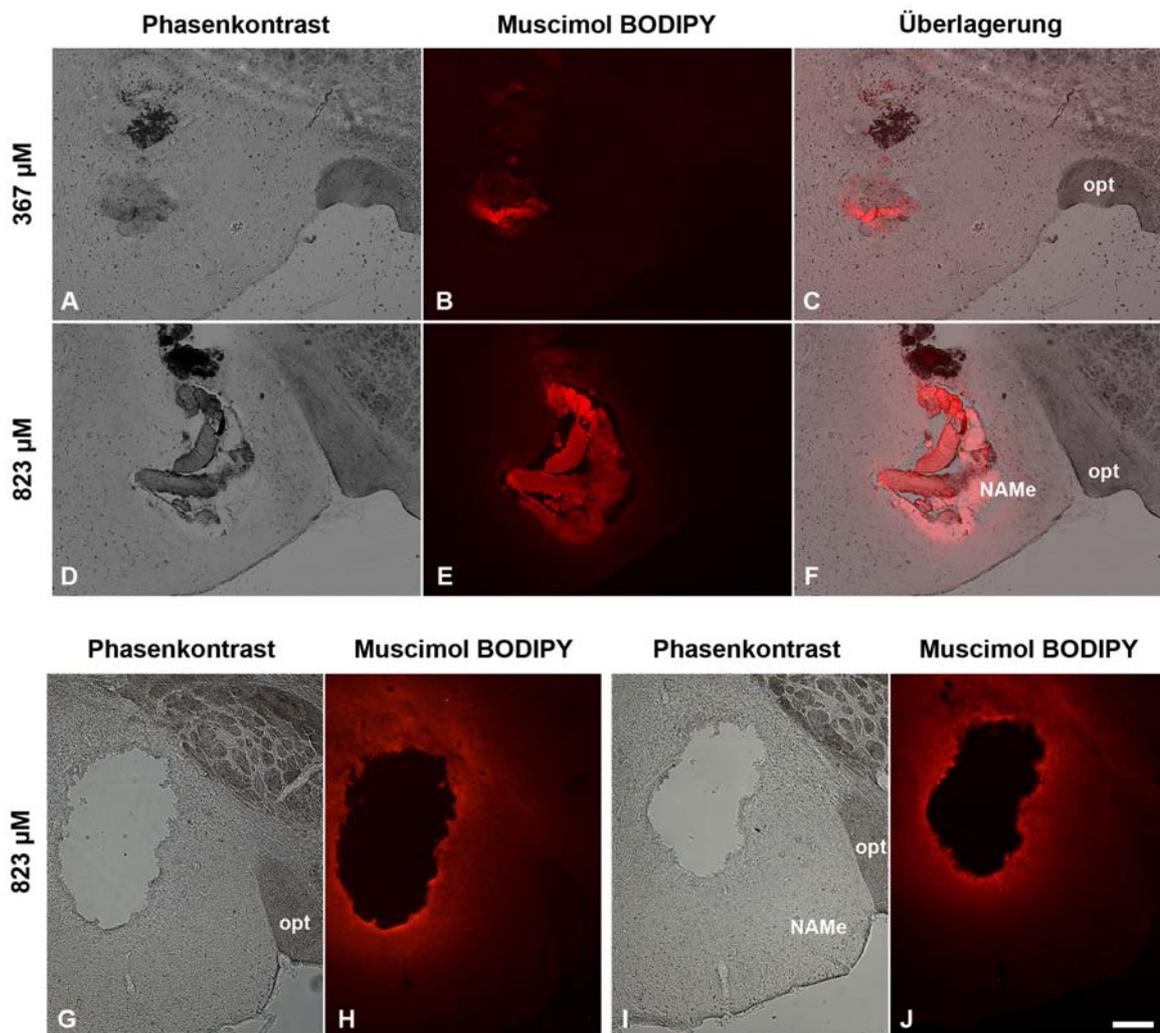


Abb. 15: Versuch der Darstellung des Diffusionsareals von Muscimol BODIPY TMR-X. (A – C) Diffusionsareal von Muscimol BODIPY TMR-X in der Konzentration 367 μM . (D – J) Diffusionsareal von Muscimol BODIPY TMR-X in der Konzentration 823 μM . NAME: *Nucleus amygdalae medialis*; opt: *Tractus opticus*; Maßstab: 200 μm .

3.2.7 c-Fos-Synthese nach Injektion von Anisomycin versus NaCl-Lösung

Die Untersuchungszeiten der beiden Versuchstiergruppen gegenüber den Jungtieren während der vierminütigen Exposition waren nicht signifikant verschieden ($p = 0,3095$; Abb. 16 A). Die Anzahl c-Fos-immunpositiver Zellen nach der Injektion von NaCl-Lösung in den NAME drei Stunden vor einer Jungtierexposition lag im Pir bei $82,13 \pm 13,59$ (Abb. 16 C, E, K) und im NAME bei $26,75 \pm 6,632$ (Abb. 16 G, I, L). Im Vergleich dazu war die Anzahl c-Fos-immunpositiver Zellen nach der Injektion von Anisomycin in den NAME drei Stunden vor einer Jungtierexposition sowohl im Pir ($15,79 \pm 3,786$; $p = 0,0015$; Abb. 16 D, F, K) als auch im NAME ($5,033 \pm 2,157$; $p = 0,0144$; Abb. 16 H, J, L) signifikant reduziert.

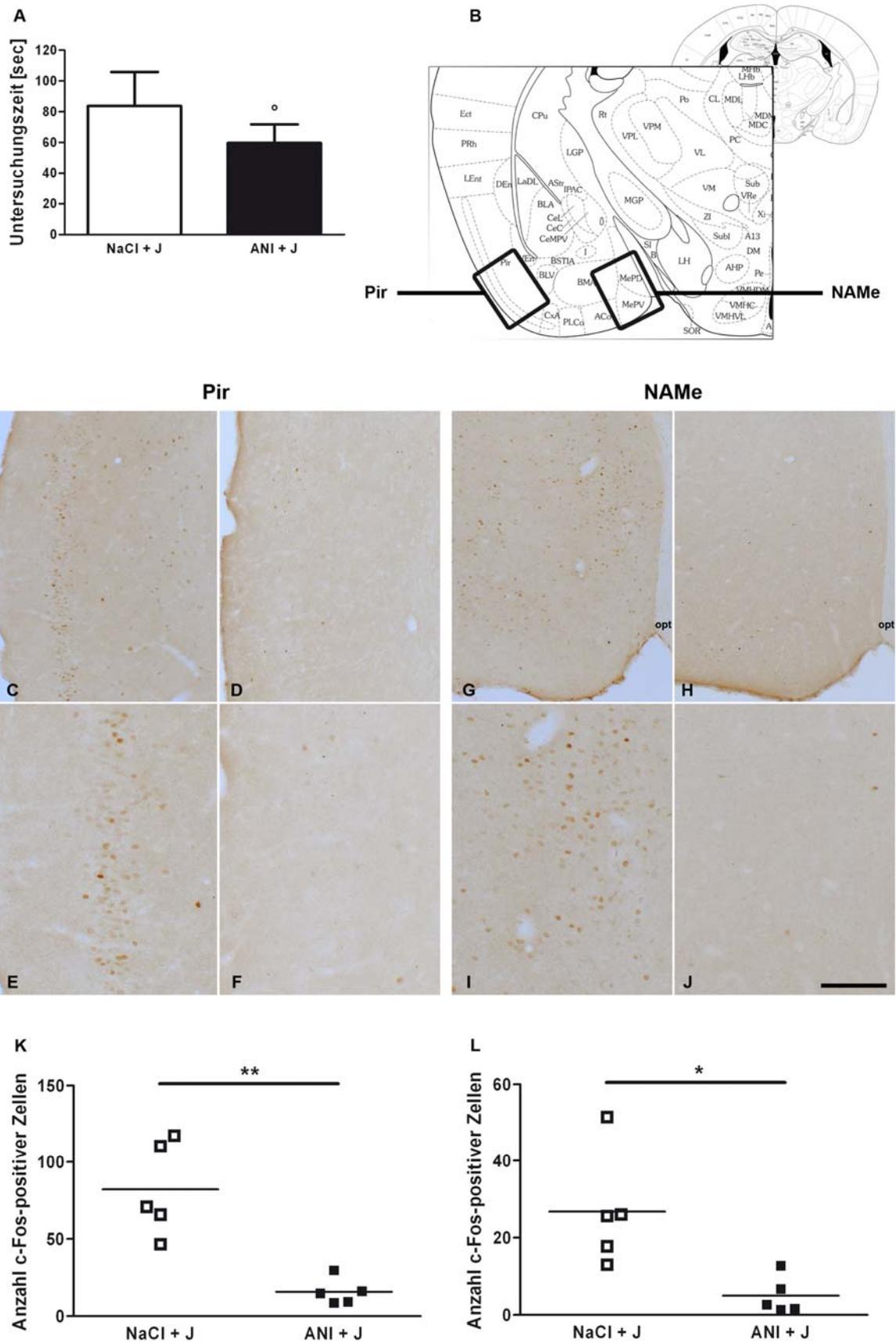


Abb. 16: c-Fos-Synthese nach Injektion von Anisomycin *versus* NaCl-Lösung in den NAME der Versuchstiere drei Stunden vor einer Jungtierexposition (n = 5).

(A) Es gab keinen signifikanten Unterschied der beiden Versuchstiergruppen in der Untersuchungszeit gegenüber einem Jungtier während der vierminütigen Exposition (MW + SEM). (B) zeigt anhand einer

schematischen Darstellung eines Frontalschnittes durch das Mäusehirn (modifiziert nach: Franklin & Paxinos, 1997) die Positionen, an denen repräsentative Bilder im Bereich des NAME und des Pir aufgenommen wurden. (C – F) repräsentative Abbildungen im Bereich des Pir nach Injektion von NaCl-Lösung (C, E) und nach Injektion von Anisomycin (D, F). (G – J) repräsentative Abbildungen im Bereich des NAME nach Injektion von NaCl-Lösung (G, I) und nach Injektion von Anisomycin (H, J). Die Abbildungen E, F, I, J (Objektiv: 20 x) stellen einen vergrößerten Ausschnitt der jeweils darüber liegenden Abbildungen C, D, G, H (Objektiv: 10 x) dar. Die Anzahl c-Fos-immunpositiver Zellen war nach der Injektion von Anisomycin, im Vergleich zu der Anzahl c-Fos immunpositiver Zellen nach Injektion von NaCl-Lösung, sowohl im Pir (K) als auch im NAME (L) signifikant reduziert (■ Einzelwerte; — MW). ANI: Anisomycin; J: Jungtierexposition; NAME: *Nucleus amygdalae medialis*; opt: *Tractus opticus*; Pir: *Nucleus piriformis*; Maßstab: 200 µm (C, D, G, H), 100 µm (Detailaufnahmen E, F, I, J); ** p < 0,01; * p < 0,05; t-Test; ° Daten nicht normalverteilt.

3.3 Hauptversuche

3.3.1 Injektion von Lidocain versus NaCl-Lösung

3.3.1.1 Soziale Diskriminierung

Die operierten Versuchstiere untersuchten im Verhaltenstest vor den Injektionsexperimenten J2 signifikant länger als J1 ($p < 0,0001$; Abb. 17 A). Zwei der 33 Versuchstiere, die alle im Verhaltenstest vor ihrer OP J2 länger als J1 untersuchten, untersuchten in diesem Test J1 länger als J2.

Die zu den Zeitpunkten direkt vor dem *Sampling* ($p = 0,2905$), drei Stunden nach dem *Sampling* ($p = 0,1093$) und direkt vor *Choice* ($p = 0,2221$) mit NaCl-Lösung behandelten Versuchstiere zeigten während *Choice* keine Unterschiede in der Untersuchungszeit gegenüber beiden Jungtieren. Nach der Injektion von Lidocain direkt vor dem *Sampling* ($p = 0,0191$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: $p = 0,0353$) bzw. drei Stunden nach dem *Sampling* ($p = 0,0113$) untersuchten die Versuchstiere während *Choice* J2 signifikant länger als J1. Im Gegensatz dazu gab es keine Unterschiede in der Untersuchungszeit gegenüber beiden Jungtieren nach der Behandlung der Versuchstiere mit Lidocain direkt vor *Choice* ($p = 0,3092$; Abb. 17 B).

Die mit Hilfe der randomisierten Block-ANOVA bzw. der einfaktoriellen ANOVA für wiederholte Messungen errechneten Werte (Freiheitsgrade, F- und p-Werte) sind im Anhang (8.2.1) aufgeführt.

ANOVA - Injektion direkt vor dem Sampling:

Die randomisierte Block-ANOVA zeigte einen signifikanten Effekt des Faktors Jungtier und eine signifikante Interaktion der Faktoren Behandlung und Jungtier. Der anschließend durchgeführte Newman-Keuls-Test ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede. Auch die einfaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen zeigte einen signifikanten Effekt zwischen

den Gruppen. J2 wurde von den Versuchstieren, denen Lidocain injiziert wurde, signifikant länger untersucht als J1 ($p < 0,05$). Wurden die Versuchstiere mit NaCl-Lösung behandelt, so zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in den Untersuchungszeiten gegenüber beiden Jungtieren.

ANOVA - Injektion drei Stunden nach dem Sampling:

Die randomisierte Block-ANOVA zeigte einen signifikanten Effekt des Faktors Jungtier, jedoch keine signifikante Interaktion der Faktoren Behandlung und Jungtier. Auch die einfaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen zeigte einen signifikanten Effekt. J2 wurde von den mit Lidocain behandelten Versuchstieren signifikant länger untersucht als J1 ($p < 0,05$). Wurde den Versuchstieren NaCl-Lösung injiziert, so zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in den Untersuchungszeiten gegenüber beiden Jungtieren.

ANOVA - Injektion direkt vor Choice:

Sowohl die randomisierte Block-ANOVA als auch die einfaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen zeigten keine signifikanten Effekte.

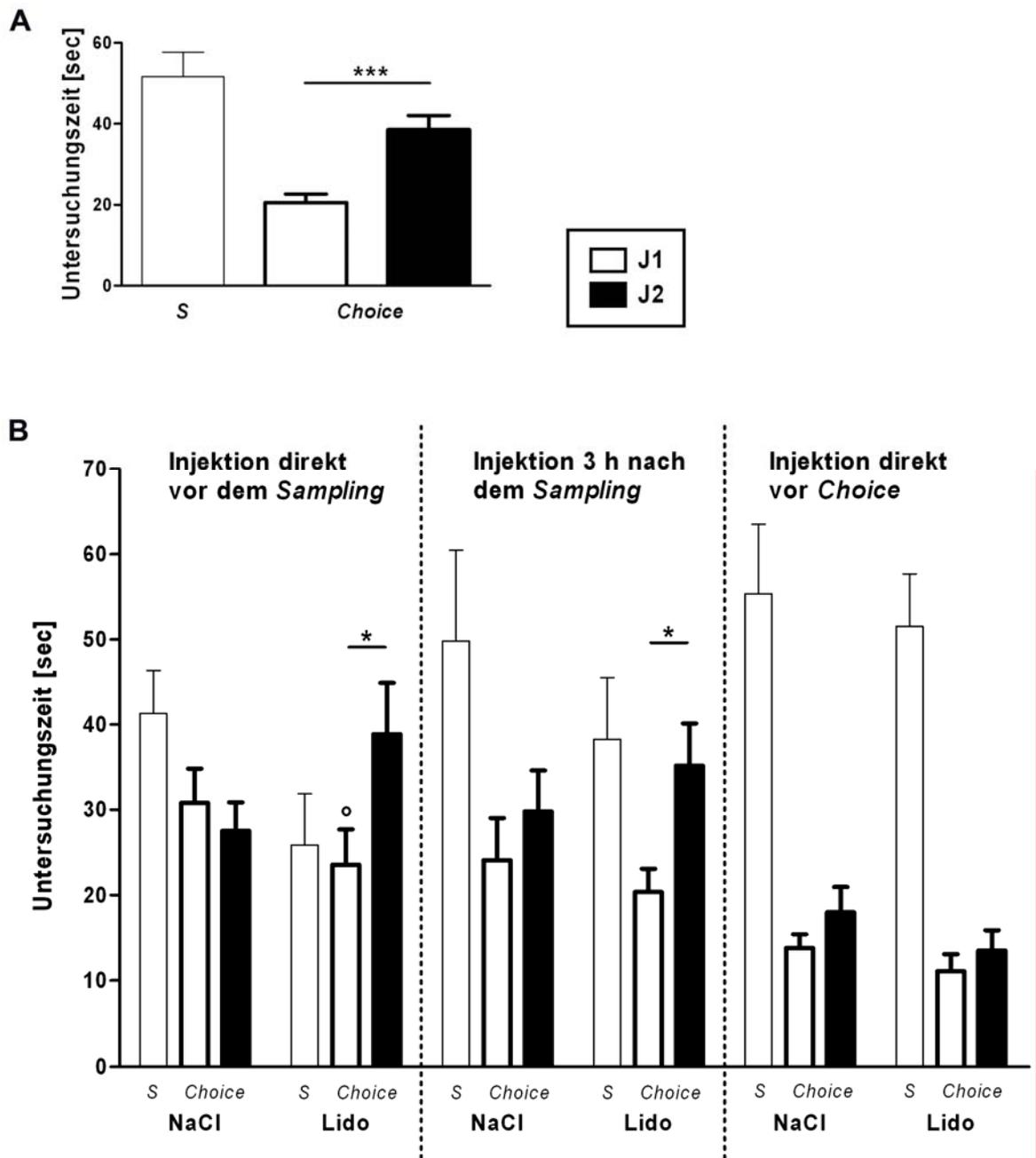


Abb. 17: Soziale Diskriminierung nach Injektion von Lidocain versus NaCl-Lösung. (A) Vor den Injektionsexperimenten untersuchten die operierten Versuchstiere J2 signifikant länger als J1 (n = 33). (B) Nach der Injektion direkt vor dem *Sampling* (linke Spalte, n = 15) und auch nach der Injektion drei Stunden nach dem *Sampling* (mittlere Spalte, n = 14) untersuchten die mit Lidocain injizierten Versuchstiere J1 signifikant länger als J2. Wurde den Versuchstieren zu diesen Zeitpunkten NaCl-Lösung injiziert, so zeigten sich keine Unterschiede in der Untersuchungszeit gegenüber beiden Jungtieren. Auch nach der Injektion von NaCl-Lösung oder Lidocain direkt vor *Choice* (rechte Spalte, n = 17) gab es keinen signifikanten Unterschied in der Untersuchungszeit gegenüber J1 und J2. J: Jungtier; Lido: Lidocain; S: *Sampling*; MW + SEM; *** p < 0,001; * p < 0,05; t-Test für gepaarte Stichproben; ° Daten nicht normalverteilt.

3.3.1.2 Aggressions- und Sexualverhalten

In der Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens (Abb. 18 A) und in der Anzahl der Verhaltensepisoden (Abb. 18 B) der Versuchstiere gegenüber den Jungtieren während des Verhaltenstests ohne vorherige Injektion (Basalwerte) und nach den Injektionen von NaCl-Lösung bzw. Lidocain direkt vor dem *Sampling* zeigten sich signifikante Unterschiede während des *Samplings* ($p < 0,0001$), jedoch nicht während *Choice* (Dauer: $p = 0,1969$; Anzahl Verhaltensepisoden: $p = 0,0891$). Nach der Injektion von NaCl-Lösung bzw. nach der Injektion von Lidocain war sowohl die Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens als auch die Anzahl der Verhaltensepisoden während des *Samplings* im Vergleich zu den Basalwerten signifikant ($p < 0,001$) reduziert (Abb. 18 A und B, linke Spalte).

In der Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens ($F_{2,26} = 4,465$; $p = 0,0215$) und in der Anzahl der Verhaltensepisoden ($p = 0,0027$) der Versuchstiere gegenüber den Jungtieren während des Verhaltenstests ohne vorherige Injektion (Basalwerte) und nach den Injektionen mit NaCl-Lösung bzw. Lidocain drei Stunden nach dem *Sampling* zeigten sich signifikante Unterschiede während *Choice*. Wurde den Versuchstieren Lidocain injiziert, so war sowohl die Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens ($p < 0,05$) als auch die Anzahl der Verhaltensepisoden ($p < 0,01$) im Vergleich zu den Basalwerten signifikant reduziert (Abb. 18 A und B, mittlere Spalte).

In der Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens der Versuchstiere und in der Anzahl der Verhaltensepisoden gegenüber den Jungtieren während des Verhaltenstests ohne vorherige Injektion (Basalwerte) und nach den Injektionen mit NaCl-Lösung bzw. Lidocain direkt vor *Choice* zeigten sich signifikante Unterschiede während *Choice* ($p < 0,0001$). Nach der Injektion von NaCl-Lösung ($p < 0,01$) bzw. nach der Injektion von Lidocain ($p < 0,001$) war die Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens und die Anzahl der Verhaltensepisoden während *Choice* im Vergleich zu den Basalwerten signifikant reduziert (Abb. 18 A und B, rechte Spalte).

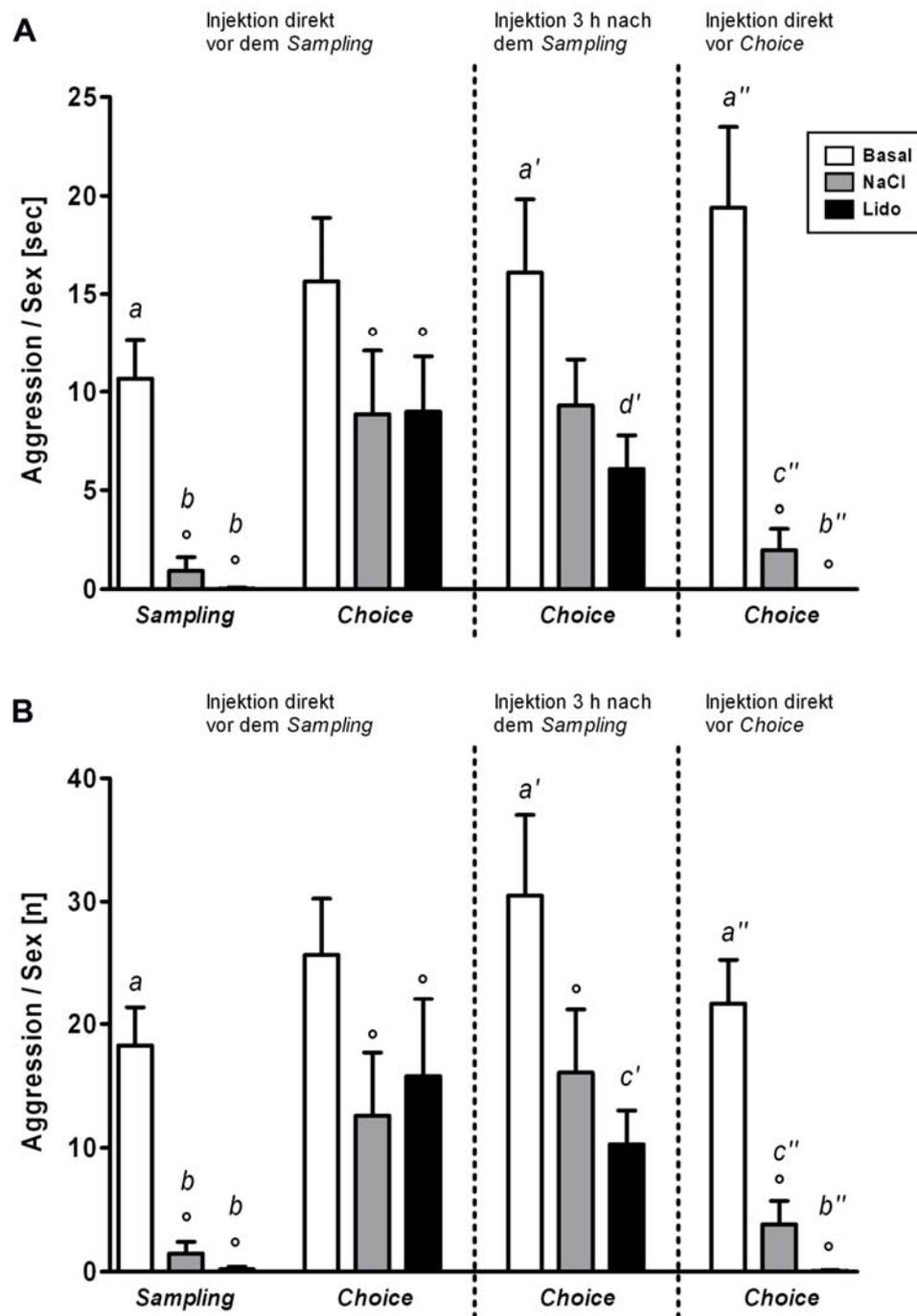


Abb. 18: Aggressions- und Sexualverhalten nach Injektion von Lidocain *versus* NaCl-Lösung. (A) Dauer und (B) Anzahl der Verhaltensepisoden während des *Samplings* und während *Choice* nach der Injektion direkt vor dem *Sampling* (linke Spalte, n = 15), während *Choice* nach der Injektion drei Stunden nach dem *Sampling* (mittlere Spalte, n = 14) und während *Choice* nach der Injektion direkt vor *Choice* (rechte Spalte, n = 17). Nach der Injektion von NaCl-Lösung bzw. Lidocain direkt vor dem *Sampling* zeigte sich eine signifikante Reduktion im Aggressions- und Sexualverhalten während des *Samplings* im Vergleich zu den Basalwerten des Aggressions- und Sexualverhaltens. Nach der Injektion von Lidocain drei Stunden nach dem *Sampling* war während *Choice* das Aggressions- und Sexualverhalten der Versuchstiere gegenüber deren Aggressions- und Sexualverhalten ohne Injektion (Basal) signifikant reduziert. Nach der Injektion von NaCl-Lösung bzw. Lidocain direkt vor *Choice* zeigte sich eine signifikante Reduktion im Aggressions- und Sexualverhalten der Versuchstiere während *Choice* im Vergleich zu deren Aggressions- und Sexualverhaltens ohne Injektion. Lido: Lidocain; MW + SEM; a vs. b, a'' vs. b'' p < 0,001; a' vs. c', a'' vs. c'' p < 0,01; Friedman-Test, anschließend Dunn-Test; a' vs. d' p < 0,05; ANOVA, anschließend Dunnett's-Test; ° Daten nicht normalverteilt.

3.3.2 Injektion von Muscimol versus NaCl-Lösung

3.3.2.1 Soziale Diskriminierung

Die operierten Versuchstiere untersuchten im Verhaltenstest vor den Injektionsexperimenten J2 signifikant länger als J1 ($p < 0,0001$; Abb. 19 A). Eines der 30 Versuchstiere, die alle im Verhaltenstest vor ihrer OP J2 länger als J1 untersuchten, untersuchte in diesem Test J1 länger als J2.

Wurden die Versuchstiere drei Stunden vor dem *Sampling* ($p = 0,0424$) oder drei Stunden vor *Choice* ($p = 0,0035$) mit NaCl-Lösung injiziert, so untersuchten sie während *Choice* J2 signifikant länger als J1. Die Versuchstiere, denen drei Stunden vor dem *Sampling* Muscimol injiziert wurde, untersuchten keines der beiden während *Choice* präsentierten Jungtiere signifikant länger als das andere Jungtier ($p = 0,0965$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: $p = 0,08$). Im Gegensatz dazu untersuchten die Versuchstiere, denen drei Stunden vor *Choice* Muscimol injiziert wurde, J2 signifikant länger als J1 ($p = 0,0035$; Abb. 19 B).

Im Kontrolltest nach allen Injektionsexperimenten war, während *Choice*, die Untersuchungszeit der Versuchstiere gegenüber J2 signifikant länger als gegenüber J1 ($p = 0,0081$; Abb. 19 C).

Die mit Hilfe der randomisierten Block-ANOVA bzw. der einfaktoriellen ANOVA für wiederholte Messungen errechneten Werte (Freiheitsgrade, F- und p-Werte) sind im Anhang (8.2.2) aufgeführt.

ANOVA - Injektion drei Stunden vor dem Sampling:

Die randomisierte Block-ANOVA ergab einen signifikanten Effekt des Faktors Jungtier, jedoch keine signifikante Interaktion der Faktoren Behandlung und Jungtier. Die einfaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen zeigte keinen signifikanten Effekt zwischen den Gruppen.

ANOVA - Injektion drei Stunden vor Choice:

Die randomisierte Block-ANOVA zeigte einen signifikanten Effekt des Faktors Jungtier, jedoch keine signifikante Interaktion der Faktoren Behandlung und Jungtier. Die einfaktorielle ANOVA zeigte einen signifikanten Effekt. J2 wurde sowohl nach der Injektion der Versuchstiere mit NaCl-Lösung ($p < 0,01$) als auch nach der Injektion von Muscimol ($p < 0,05$) signifikant länger untersucht.

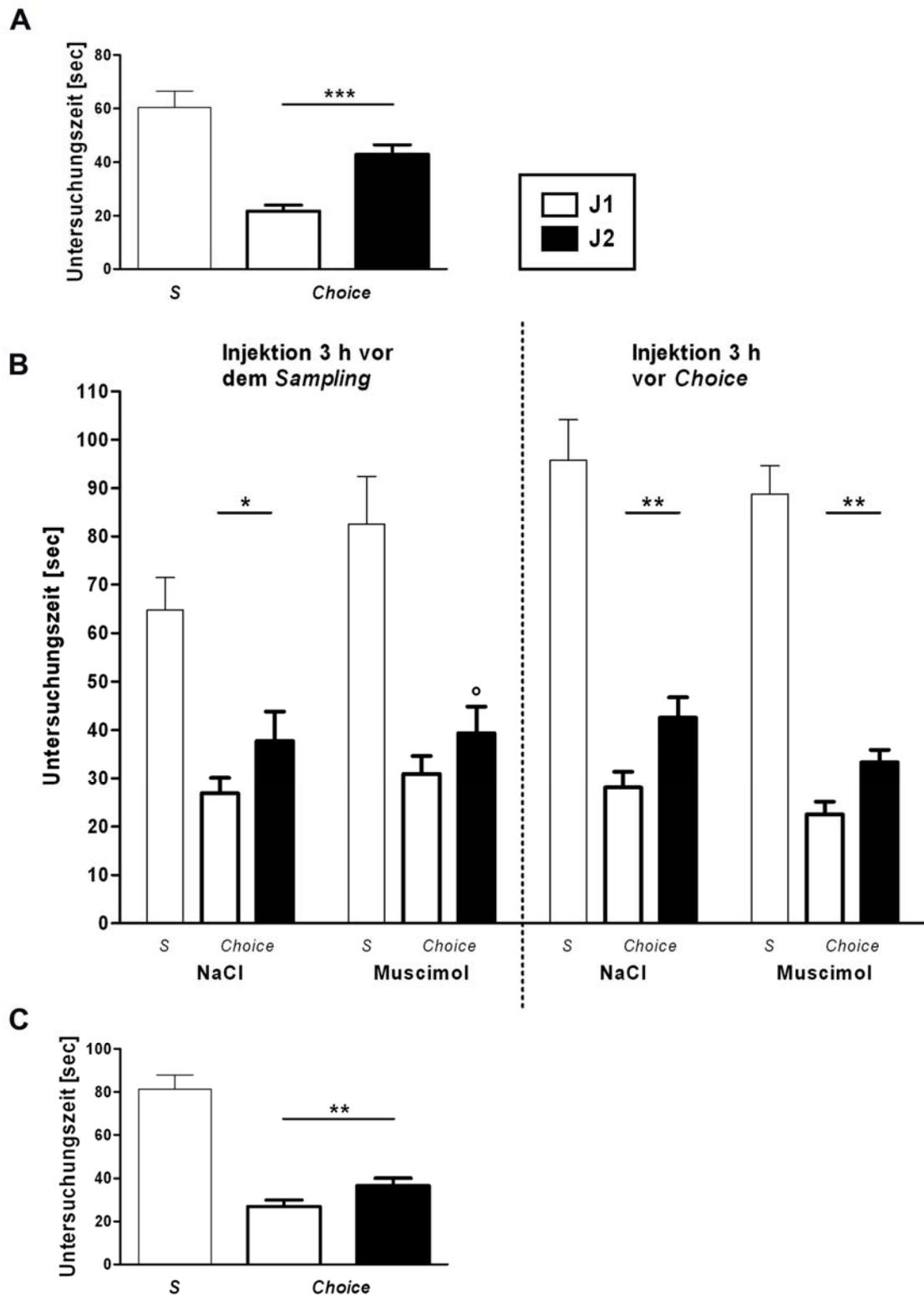


Abb. 19: Soziale Diskriminierung nach Injektion von Muscimol versus NaCl-Lösung. (A) Vor den Injektionsexperimenten untersuchten die operierten Versuchstiere J2 signifikant länger als J1 (n = 30). (B) Wurde den Versuchstieren drei Stunden vor dem *Sampling* (linke Spalte, n = 19) oder drei Stunden vor *Choice* (rechte Spalte, n = 15) NaCl-Lösung injiziert, untersuchten sie J2 signifikant länger als J1. Wurde den Versuchstieren Muscimol drei Stunden vor dem *Sampling* injiziert, so zeigte sich während *Choice* kein signifikanter Unterschied in der Untersuchungszeit gegenüber beiden Jungtieren. Wurde ihnen Muscimol drei Stunden vor *Choice* injiziert, untersuchten sie J2 signifikant länger. (C) Im Verhaltenstest nach allen Injektionsexperimenten untersuchten die Versuchstiere (n = 28) J2 während *Choice* signifikant länger als J1. J: Jungtier; S: *Sampling*; MW + SEM; *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05; t-Test für gepaarte Stichproben; ° Daten nicht normalverteilt.

3.3.2.2 Aggressions- und Sexualverhalten

In der Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens (Abb. 20 A) und in der Anzahl der Verhaltensepisoden (Abb. 20 B) der Versuchstiere gegenüber den Jungtieren während des Verhaltenstests ohne vorherige Injektion (Basalwerte) und nach den Injektionen von NaCl-Lösung bzw. Muscimol drei Stunden vor dem *Sampling* zeigten sich signifikante Unterschiede während des *Samplings* (Dauer: $p = 0,0112$; Anzahl Verhaltensepisoden: $p = 0,0221$), jedoch nicht während *Choice* (Dauer: $p = 0,6514$; Anzahl Verhaltensepisoden: $p = 0,5558$). Nach der Injektion von Muscimol war die Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens während des *Samplings* gegenüber der Dauer des Aggressions- und Sexualverhalten ohne vorherige Injektion (Basalwerte) signifikant ($p < 0,05$) reduziert (Abb. 20 A, linke Spalte).

Im Gegensatz zur Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens der Versuchstiere gegenüber den Jungtieren während des Verhaltenstests ($p = 0,0994$) zeigten sich signifikante Unterschiede in der Anzahl der Verhaltensepisoden während *Choice* ($p = 0,0489$) ohne vorherige Injektion (Basalwerte) und nach den Injektionen mit NaCl-Lösung bzw. Muscimol drei Stunden vor *Choice*. Nach der Injektion von Muscimol ($p < 0,05$) war die Anzahl der Verhaltensepisoden während *Choice* im Vergleich zu den Basalwerten signifikant reduziert (Abb. 20 B, rechte Spalte).

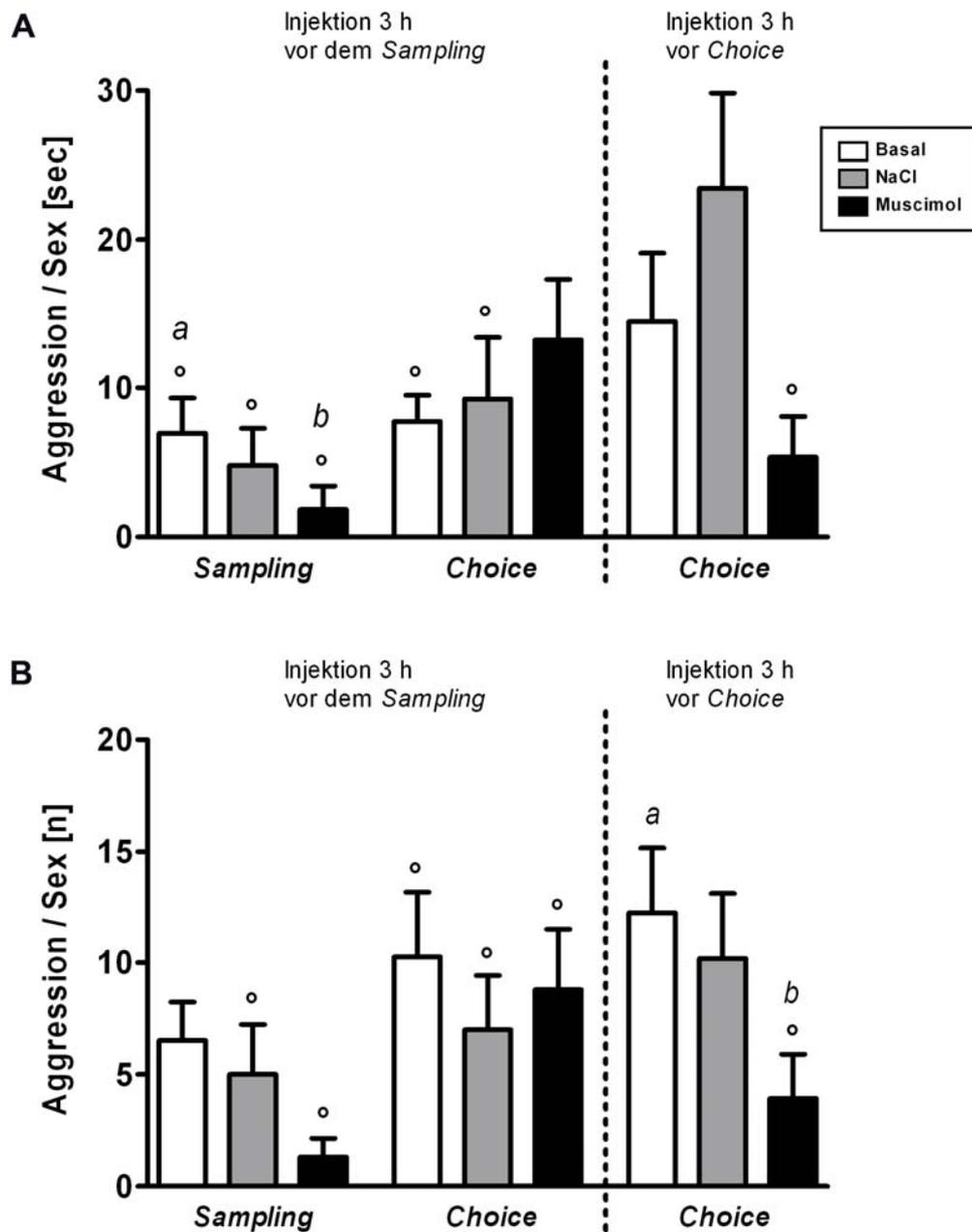


Abb. 20: Aggressions- und Sexualverhalten nach Injektion von Muscimol versus NaCl-Lösung. (A) Dauer und (B) Anzahl der Verhaltensepisoden während des *Samplings* und während *Choice* nach der Injektion drei Stunden vor dem *Sampling* (linke Spalte, n = 19) und während *Choice* nach der Injektion drei Stunden vor *Choice* (rechte Spalte, n = 15). Nach der Injektion von Muscimol drei Stunden vor dem *Sampling* war die Dauer des Aggressions- und Sexualverhalten der Versuchstiere gegenüber der Dauer ohne Injektion (Basal) während des *Samplings* signifikant reduziert. Nach der Injektion von Muscimol drei Stunden vor *Choice* zeigte sich eine signifikante Reduktion in der Anzahl der Verhaltensepisoden während *Choice* im Vergleich zu der Anzahl der Verhaltensepisoden ohne Injektion. MW + SEM; a vs. b, p < 0,05; Friedman-Test, anschließend Dunn-Test; ° Daten nicht normalverteilt.

3.3.3 Injektion von Anisomycin versus NaCl-Lösung

3.3.3.1 Soziale Diskriminierung

Die operierten Versuchstiere untersuchten im Verhaltenstest vor den Injektionsexperimenten J2 signifikant länger als J1 ($p = 0,0003$; Abb. 21 A). Zwei der 20 Versuchstiere, die alle im Verhaltenstest vor ihrer OP J2 länger als J1 untersuchten, untersuchten in diesem Test J1 länger als J2.

Sowohl die drei Stunden vor dem *Sampling* ($p = 0,0019$) als auch die drei Stunden vor *Choice* ($p = 0,0138$) mit NaCl-Lösung behandelten Versuchstiere untersuchten J2 signifikant länger als J1. Wurde den Versuchstieren drei Stunden vor dem *Sampling* Anisomycin injiziert, so untersuchten sie während *Choice* J1 signifikant länger ($p = 0,0078$). Nach der Injektion von Anisomycin drei Stunden vor *Choice* gab es keinen signifikanten Unterschied in der Untersuchungszeit gegenüber J1 und J2 ($p = 0,6285$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test: $p = 0,4488$; Abb. 21 B).

Die Versuchstiere untersuchten im Kontrolltest nach allen Injektionsexperimenten J2 signifikant länger als J1 ($p = 0,0031$; Abb. 21 C).

Die mit Hilfe der randomisierten Block-ANOVA bzw. der einfaktoriellen ANOVA für wiederholte Messungen errechneten Werte (Freiheitsgrade, F- und p-Werte) sind im Anhang (8.2.3) aufgeführt.

ANOVA - Injektion drei Stunden vor dem Sampling:

Die randomisierte Block-ANOVA zeigte eine signifikante Interaktion der Faktoren Behandlung und Jungtier. Wurden den Versuchstieren NaCl-Lösung injiziert, so untersuchten sie J2 signifikant länger ($p < 0,01$). Die einfaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen zeigte einen signifikanten Effekt zwischen den Gruppen. J2 wurde nach der Injektion der Versuchstiere mit NaCl-Lösung von diesen signifikant länger untersucht ($p < 0,01$). Wurden die Versuchstiere mit Anisomycin injiziert, so untersuchten sie J1 signifikant länger ($p < 0,05$).

ANOVA - Injektion drei Stunden vor Choice:

Die randomisierte Block-ANOVA zeigte einen signifikanten Effekt für den Faktor Behandlung, jedoch keine signifikante Interaktion der Faktoren Behandlung und Jungtier. Die einfaktorielle ANOVA zeigte einen signifikanten Effekt zwischen den einzelnen Gruppen, jedoch untersuchten die Versuchstiere weder nach Injektion mit NaCl-Lösung noch nach Injektion mit Anisomycin J2 signifikant länger.

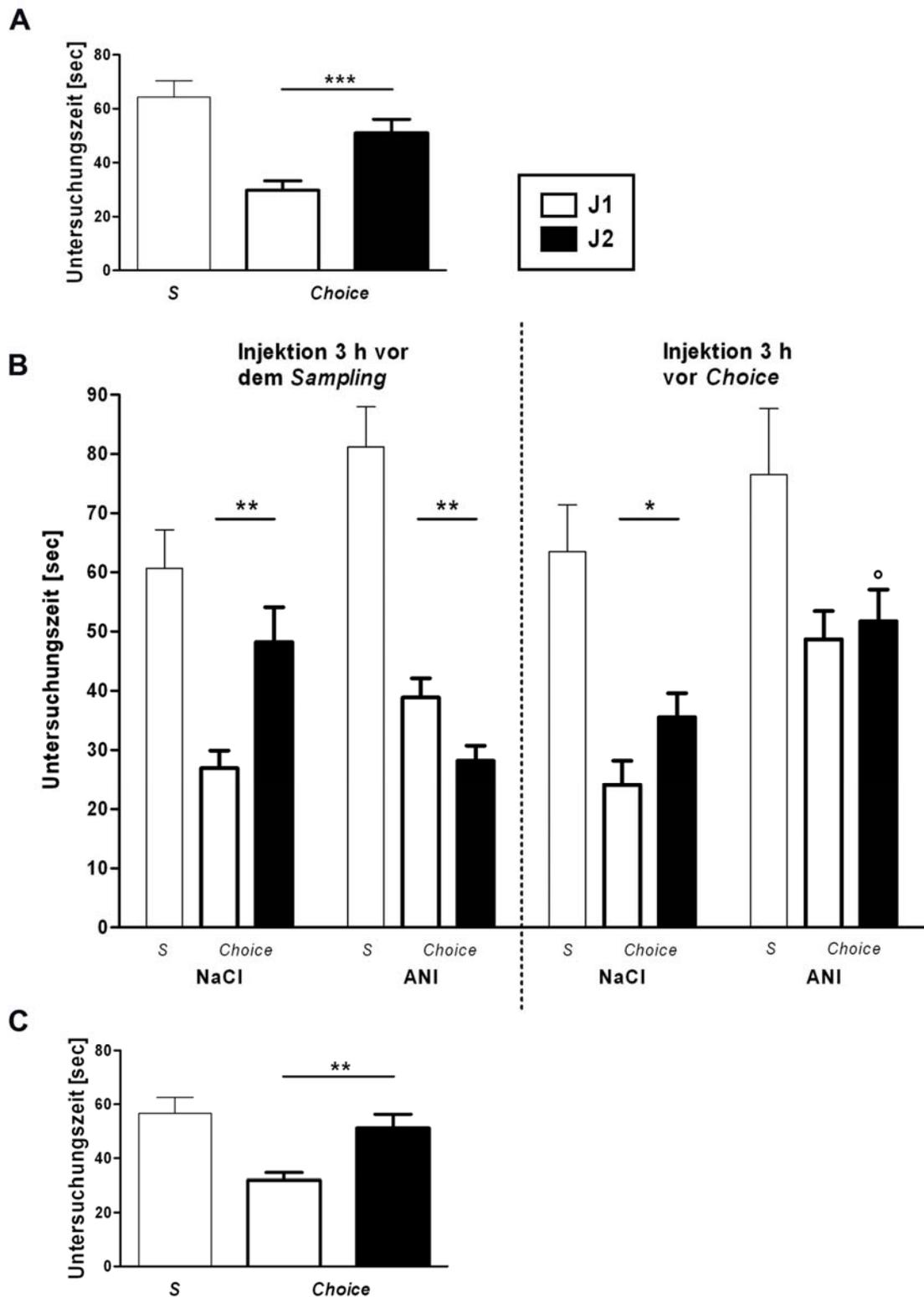


Abb. 21: Soziale Diskriminierung nach Injektion von Anisomycin *versus* NaCl-Lösung. (A) Vor den Injektionsexperimenten untersuchten die operierten Versuchstiere J2 signifikant länger als J1 (n = 20). (B) Die mit Anisomycin drei Stunden vor dem *Sampling* (linke Spalte, n = 18) behandelten Versuchstiere untersuchten während *Choice* J1 signifikant länger als J2. Wurde den Versuchstieren Anisomycin drei Stunden vor *Choice* (rechte Spalte, n = 17) injiziert, so zeigten sie keine Unterschiede in der Untersuchungszeit gegenüber beiden Jungtieren. Im Gegensatz dazu untersuchten die Versuchstiere während *Choice* J2 signifikant länger als J1, wenn ihnen NaCl-Lösung zu den entsprechenden Zeitpunkten injiziert wurde. (C) Im Kontrollexperiment nach Beendigung der Injektionsexperimente untersuchten die Versuchstiere während *Choice* J2 signifikant länger als J1 (n = 17). ANI: Anisomycin; J: Jungtier;

S: *Sampling*; MW + SEM; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; t-Test für gepaarte Stichproben; ° Daten nicht normalverteilt.

3.3.3.2 Aggressions- und Sexualverhalten

In der Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens (Abb. 22 A) und in der Anzahl der Verhaltensepisoden (Abb. 22 B) der Versuchstiere gegenüber den Jungtieren während des Verhaltenstests ohne vorherige Injektion (Basalwerte) und nach den Injektionen von NaCl-Lösung bzw. Anisomycin drei Stunden vor dem *Sampling* zeigten sich keine signifikanten Unterschiede während des *Samplings* (Dauer: $p = 0,1975$; Anzahl Verhaltensepisoden: $p = 0,2818$) und während *Choice* (Dauer: $p = 0,3912$; Anzahl Verhaltensepisoden: $p = 0,5108$; Abb. 22 A und B, linke Spalte).

Während des Verhaltenstests ohne vorherige Injektion (Basalwerte) und nach den Injektionen mit NaCl-Lösung bzw. Anisomycin drei Stunden vor *Choice* zeigten sich signifikante Unterschiede sowohl in der Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens als auch in der Anzahl der Verhaltensepisoden der Versuchstiere gegenüber den Jungtieren während *Choice* (sowohl Dauer als auch Anzahl Verhaltensepisoden: $p = 0,038$; Abb. 22 A und B, rechte Spalte). Der Dunn-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede nach der Injektion von Anisomycin bzw. NaCl-Lösung im Vergleich zu den Basalwerten auf.

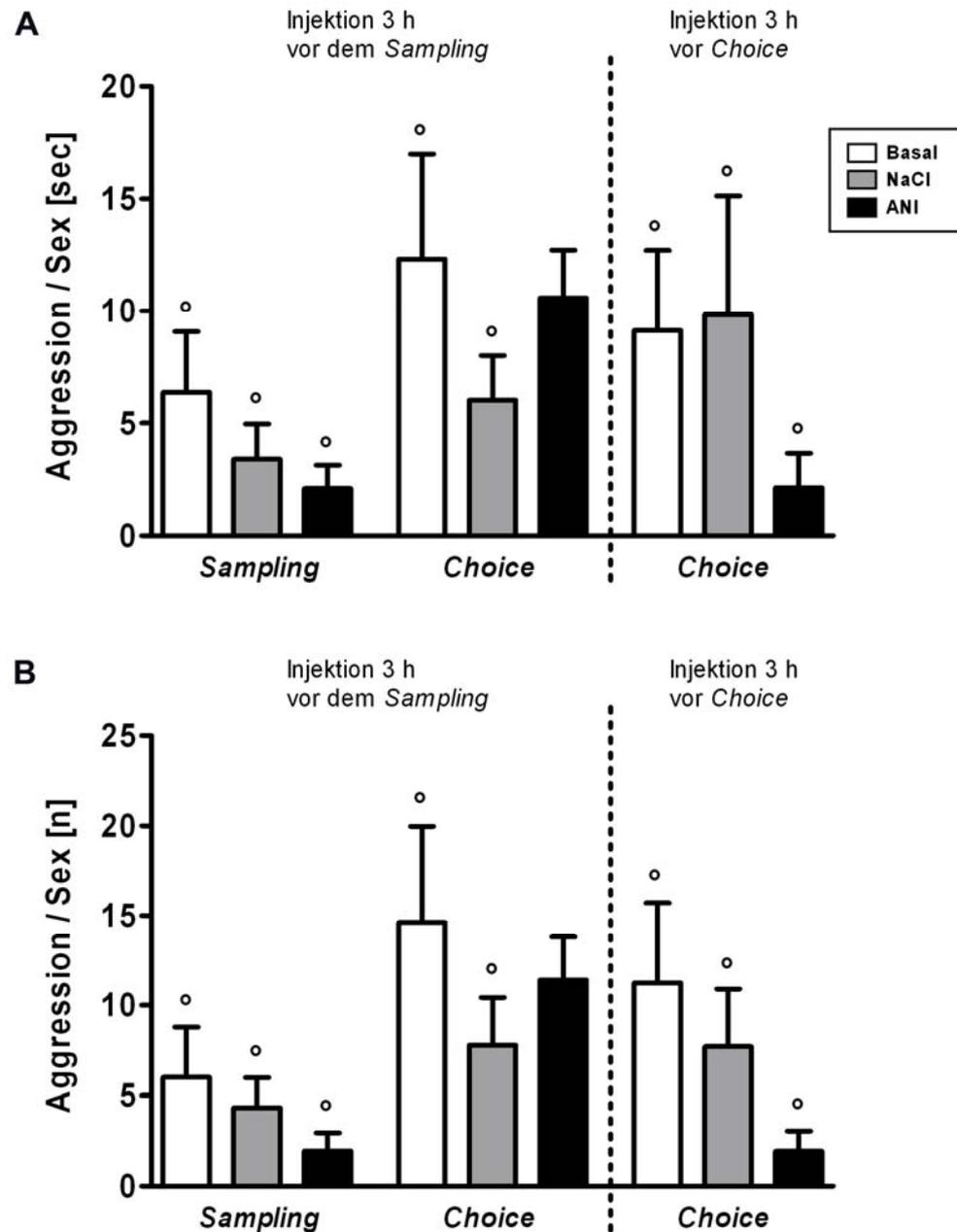


Abb. 22: Aggressions- und Sexualverhalten nach Injektion von Anisomycin versus NaCl-Lösung. (A) Dauer und (B) Anzahl der Verhaltensepisoden während des *Samplings* und während *Choice* nach der Injektion drei Stunden vor dem *Sampling* (linke Spalte, n = 18) und während *Choice* nach der Injektion drei Stunden vor *Choice* (rechte Spalte, n = 17). ANI: Anisomycin; MW + SEM; ° Daten nicht normalverteilt.

3.3.4 c-Fos-Synthese nach Präsentation der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ im VFC

Die Versuchstiere untersuchten die volatile Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ eines Jungtieres signifikant länger als die Kontrolltiere die Raumluft ($p = 0,0097$; Abb. 23 A). Die Anzahl c-Fos-immunpositiver Zellen nach der Präsentation von Raumluft lag im Pir bei $16,98 \pm 3,003$ (Abb. 23 C, E, K) und im NAME bei $3,879 \pm 0,7298$ (Abb. 23 G, I, L). Im Vergleich dazu war die Anzahl c-Fos-immunpositiver Zellen nach der Präsentation der volatilen

Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ eines Jungtieres sowohl im Pir ($32,63 \pm 4,552$; $p = 0,0209$; Abb. 23 D, F, K) als auch im NAME ($11,53 \pm 2,037$; $p = 0,0076$; Abb. 23 H, J, L) signifikant erhöht.

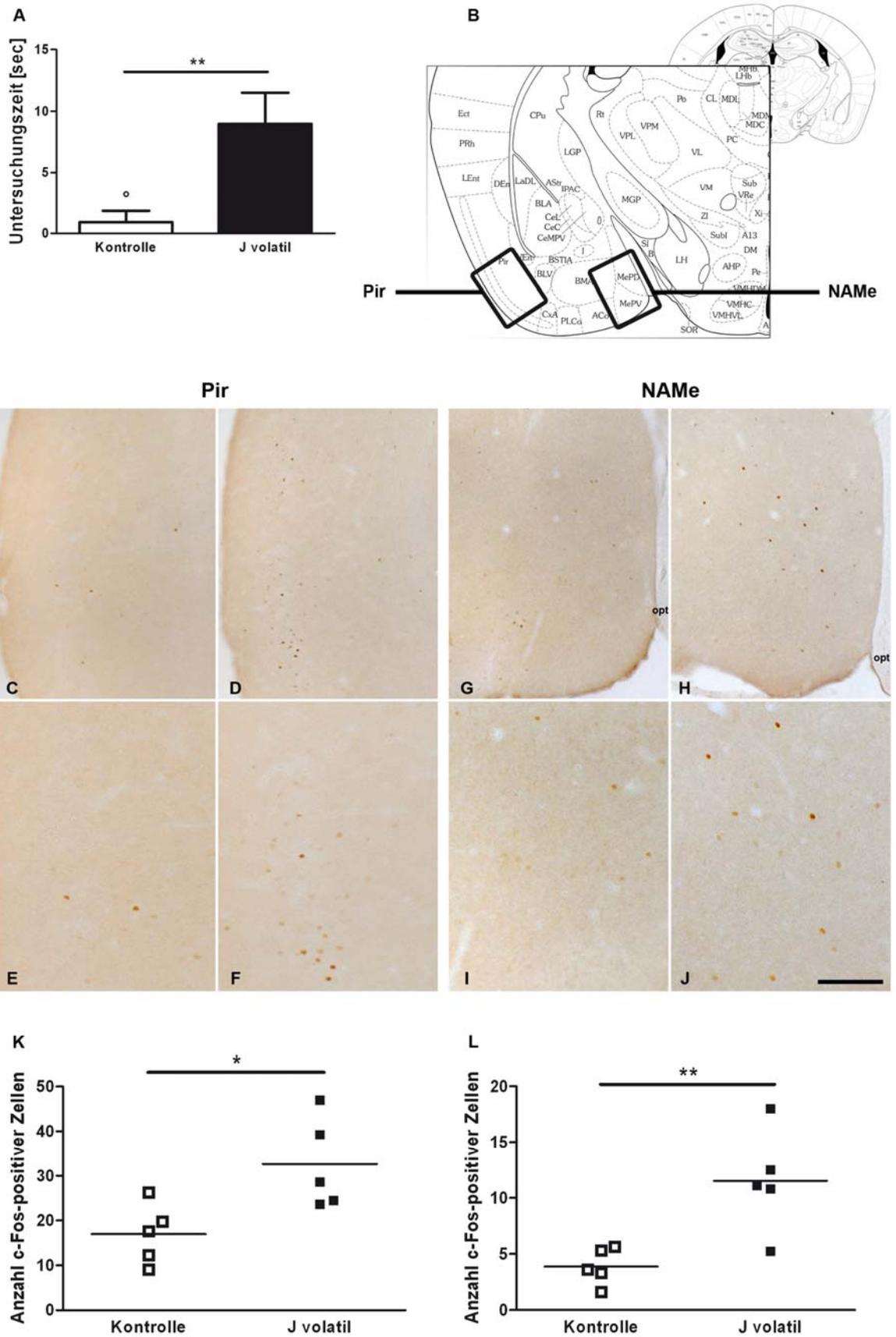


Abb. 23: c-Fos-Synthese nach der Präsentation der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ eines Jungtieres *versus* Raumluft (Kontrolle) im VFC (n = 5).

(A) Die Versuchstiere, denen die volatile Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ eines Jungtieres für vier Minuten präsentiert wurde, untersuchten diese signifikant länger als die Kontrolltiere die Raumluft (MW + SEM). (B) zeigt anhand einer schematischen Darstellung eines Frontalschnittes durch das Mäusehirn

(modifiziert nach: Franklin & Paxinos, 1997) die Positionen, an denen repräsentative Bilder im Bereich des NAME und des Pir aufgenommen wurden. (C – F) repräsentative Abbildungen im Bereich des Pir der Kontrolltiere (C, E) und der Versuchstiere, denen die volatile Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ eines Jungtieres präsentiert wurde (D, F). (G – J) repräsentative Abbildungen im Bereich des NAME der Kontrolltiere (G, I) und der Versuchstiere, denen die volatile Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ eines Jungtieres präsentiert wurde (H, J). Die Abbildungen E, F, I, J (Objektiv: 20 x) stellen einen vergrößerten Ausschnitt der jeweils darüber liegenden Abbildungen C, D, G, H (Objektiv: 10 x) dar. Die Anzahl c-Fos-immunpositiver Zellen war nach der Präsentation der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ eines Jungtieres, im Vergleich zu der Anzahl c-Fos immunpositiver Zellen nach der Präsentation von Raumluft, sowohl im Pir (K) als auch im NAME (L) signifikant erhöht (■ Einzelwerte; — MW). J volatil: Präsentation der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ eines Jungtieres; NAME: *Nucleus amygdalae medialis*; opt: *Tractus opticus*; Pir: *Nucleus piriformis*; Maßstab: 200 µm (C, D, G, H), 100 µm (Detailaufnahmen E, F, I, J); ** p < 0,01; * p < 0,05; t-Test (A: Mann-Whitney-U-Test); ° Daten nicht normalverteilt.

4 DISKUSSION

Basierend auf in der Literatur beschriebenen Befunden war es Ziel der vorliegenden Arbeit, Aufschluss über den Zeitpunkt (Akquisition/Konsolidierung, Abrufen) und die Art (Informationsweiterleitung, Informationsspeicherung) der Beteiligung des NAME an den Prozessen des sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses von Mäusen zu erhalten. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden inhibitorisch wirkende Substanzen während des Verhaltens-tests auf die soziale Diskriminierung in den NAME von Mäusen injiziert. Veränderungen in der Langzeit-Gedächtnisleistung der Versuchstiere nach diesen Behandlungen sollten Rückschlüsse auf die Funktion des NAME für das soziale Wiedererkennungsgedächtnis zulassen.

4.1 Vorbetrachtungen

Zunächst war es notwendig, eine Reihe von Vorversuchen durchzuführen, um sicherzustellen, dass die Ergebnisse der Hauptversuche ausschließlich den dort durchgeführten Behandlungen und nicht etwa einem möglichen Einfluss des Geschlechtes der Stimulusjungtiere, der OP, der Platzierung der implantierten Führungskanülen und/oder des Transportes zuzuschreiben waren.

Die histologische Überprüfung der Kanülenplatzierung erfolgte *post mortem* für jedes Versuchstier. Das Gewebe des NAME wurde durch die Führungskanülen und durch die Injektion (Injektionskanülen, Flüssigkeitsvolumen und Injektionsdruck) nicht derart geschädigt (Abb. 9), dass beobachtete Verhaltensänderungen darauf hätten zurückgeführt werden können. Durch die Kanülenplatzierung war gewährleistet, dass das Gewebe des NAME nicht mechanisch lädiert wurde, die Substanzen aber dennoch nahe genug an das Zielareal heran injiziert wurden, um in dieses hineindiffundieren zu können.

Es wurden keine Unterschiede im Verhalten der Versuchstiere gegenüber Jungtieren männlichen oder weiblichen Geschlechtes nachgewiesen (Abb. 10). Auch von Ratten wurde berichtet, dass die Untersuchungszeit gegenüber einem Jungtier unabhängig von dessen Geschlecht ist (Thor, 1980). Das relativ geringe (ca. vier bis sechs Sekunden) Aggressions- und Sexualverhalten gegenüber den Stimulusjungtieren wird bestimmt durch deren Alter (Thor, 1980; Terranova *et al.*, 1998), Geruch und Größe (Taylor, 1982). Aus diesem Grund erfolgte die Auswahl der Stimulusjungtiere für alle weiteren Versuche ausschließlich nach dem Alter.

Die Studien zur Charakterisierung der postoperativen Erholungsphase ergaben, dass sich durch die OP nicht nur die Körpermasse (Abb. 11 A) sondern auch die Untersuchungszeit der Versuchstiere gegenüber einem Jungtier (Abb. 11 B) reduzierte. Die OP stellte einen schwerwiegenden Eingriff mit einer mehr als vier Stunden andauernden Vollnarkose dar. Es war nicht Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die Schmerzantwort der Versuchstiere nach der OP im Detail zu erfassen. Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass eine herabgesetzte Aktivität in Form der geringeren Untersuchungszeit (geringes Interesse am Jungtier) bis zum dritten Tag nach der OP den, bedingt durch die OP, beeinträchtigten Gesundheitszustand des Versuchstieres widerspiegelte. Auch die Verringerung der Körpermasse nach der OP kann, als Folge von verminderter Wasser- und Futteraufnahme, als Indikator für Schmerz bzw. einen verschlechterten körperlichen Zustand gewertet werden. Darüber hinaus wurden subjektiv mindestens 24 Stunden, aber nie länger als 48 Stunden, nach der OP leichte, nagertypische Schmerzsymptome (ungepflegtes Haarkleid, verspannter, ataktischer Gang), jedoch keine Automutilation oder Angriffe auf oder durch Käfiggenossen beobachtet. Die Operation und der mögliche OP-Schmerz hatten offensichtlich keinen Einfluss auf das Aggressions- und Sexualverhalten gegenüber den Jungtieren (Abb. 11 C). Die Versuchstiere erholten sich in Hinblick auf ihre Körpermasse und ihr Verhalten gegenüber den Stimulusjungtieren während der sieben Tage nach der OP vollständig. Demzufolge darf postuliert werden, dass die Platzierung der Führungskanülen die Hirnareale nicht maßgeblich beschädigte, deren Funktion für ein normales Verhalten (Untersuchung, Aggressions- und Sexualverhalten) gegenüber einem Artgenossen erforderlich war. Außerdem ist ein Zeitraum von sieben Tagen nach einer solchen OP ausreichend für die Erholung der Versuchstiere und wurde folglich vor dem Start eines jeden Injektionsexperimentes gewählt.

Wie bereits erwähnt, reflektiert die Untersuchungszeit den relativen Bekanntheitsgrad der beiden, während *Choice* präsentierten Jungtiere. Eine signifikant geringere Untersuchungszeit (Verhaltensantwort) gegenüber J1 nach einem EI von 24 Stunden wird im Sinne des Vorhandenseins eines sozialen Langzeitgedächtnisses für J1 interpretiert (Engelmann *et al.*, 1995).

Dieses Gedächtnis diente als Grundvoraussetzung für die späteren Injektionsexperimente und wurde daher für alle Versuchstiere vor der OP und sieben Tage nach deren OP überprüft (Abb. 12). Die bereits in früheren Studien beschriebene Fähigkeit der Mäuse, ein soziales Langzeitgedächtnis für Artgenossen zu bilden (Kogan *et al.*, 2000; Richter *et al.*, 2005), wurde hier bestätigt. Die OP hatte zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluss auf die Verhaltensantwort, d.h. die Versuchstiere waren auch nach der OP in der Lage, J1 wiederzuerkennen (Abb. 12 B;

Abb. 17 A; Abb. 19 A; Abb. 21 A). Darüber hinaus zeigte sich sieben Tage nach der OP keine Veränderung im Aggressions- und Sexualverhalten der Versuchstiere gegenüber den Jungtieren während des *Samplings* bzw. während *Choice* im Vergleich zu den entsprechenden Verhaltensantworten vor der OP (Abb. 12 C). Auch diese Resultate sind ein Hinweis für die vollständige Erholung der Versuchstiere von der OP, da ein intaktes Sozialverhalten als Indiz für das generelle Wohlbefinden gewertet wird (Dantzer *et al.*, 1991). Zudem lieferten diese Ergebnisse die Erkenntnis, dass durch die Implantation der Führungskanülen die Funktion keines an der Ausbildung des sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses für Artgenossen bzw. an der Generierung von aggressivem Verhalten und/oder von Sexualverhaltensweisen beteiligten Hirnareals beeinträchtigt wurde. In den Hauptversuchen waren somit alle Veränderungen in der Diskriminierungsfähigkeit der Versuchstiere auf die während dieser Versuche applizierten Substanzen zurückzuführen.

Da sich alle Versuchstiere für die Verhaltensmessungen in einem Raum befanden, musste ausgeschlossen werden, dass die Injektionsprozedur an einem Versuchstier von den anderen Versuchstieren wahrgenommen wurde und so möglicherweise deren Verhalten im Test beeinflusste. Aus diesem Grund wurden die Versuchstiere für die Injektion der Substanzen in einen anderen Raum transportiert. Die Ergebnisse belegen, dass weder der Transport (Abb. 13 A) noch die Isoflurannarkose (Abb. 13 B) oder die Injektionsprozedur *per se* (Abb. 13 C) die Diskriminierungsfähigkeiten der Versuchstiere störte. In anderen Studien wurde beschrieben, dass sowohl bei Ratten (Burman & Mendl, 2000) als auch bei Mäusen (Engelmann, 2009) ein Käfigwechsel bzw. die Präsentation eines neuen Jungtieres zu verschiedenen Zeitpunkten während des Verhaltenstests die Fähigkeit zur sozialen Wiedererkennung hemmte (Interferenz). Jedoch weisen die Ergebnisse der vorliegende Studie, bestätigt durch die früherer Arbeiten (Richter *et al.*, 2005; Wanisch *et al.*, 2008; Engelmann, 2009), darauf hin, dass der Transport der Versuchstiere in ihrem Versuchskäfig und der Umgang mit den Versuchstieren zur Injektion von Substanzen unter Isoflurannarkose keinen störenden Einfluss auf das Wiedererkennungsgedächtnis für Artgenossen hat. Mögliche Veränderungen der Gedächtnisleistung in den Hauptversuchen sind daher mit großer Sicherheit auf die Wirkung der injizierten Substanzen zurückzuführen.

Weitere Vorversuche waren erforderlich, um eine geeignete Muscimol-Konzentration für die Injektion in den NAME zu finden. Im Vergleich zu den mit NaCl-Lösung behandelten Kontrolltieren zeigten die Versuchstiere nach der bilateralen Injektion der hohen Muscimol-

Konzentrationen deutliche Verhaltensanormalitäten (Abb. 14), die eine Durchführung des Verhaltenstests unter diesen Bedingungen ausschlossen. Diese Verhaltensanormalitäten waren nicht auf die Injektionsprozedur oder die Injektion von Substanzen an sich zurückzuführen, da sie nach einer Scheininjektion oder der Injektion von NaCl-Lösung, Lidocain oder Anisomyacin nicht beobachtet werden konnten.

Werden hohe Muscimol-Konzentrationen lokal injiziert, so bindet das Muscimol hoch affin und lang anhaltend an die Rezeptoren in unmittelbarer Nähe zur Injektionsstelle. Je höher die Muscimol-Konzentration ist, umso größer ist auch das Diffusionsareal, in dem biologisch relevante Konzentrationen erreicht werden, die Rezeptorantworten auslösen. Tatsächlich wurde in verschiedenen Studien berichtet, dass radioaktiv markiertes Muscimol (in 8,8 mM unmarkiertem Muscimol gelöst) bei einem Injektionsvolumen von 0,5 µl bis maximal 1,8 mm (Corcoran *et al.*, 2005), bei einem Injektionsvolumen von 1 µl mit einem mittleren Radius von 1,66 mm (Martin, 1991) und bei einem Injektionsvolumen von 0,05 – 0,4 µl sogar bis über 3 mm (Edeline *et al.*, 2002) in das umliegende Hirngewebe diffundiert. Die Autoren dieser Studien vermuteten, dass, neben der direkt auf die Diffusion und die Substanzbindung zurückzuführende Inhibition der lokalen und distalen Neuronen (Edeline *et al.*, 2002), auch eine verminderte Aktivität weiter entfernter Neuronen durch die Blockade ihrer Afferenzen wahrscheinlich ist (Martin, 1991; Arikan *et al.*, 2002). Diese Mechanismen können also die Beeinflussung der Aktivität eines relativ großen Hirnbereiches zur Folge haben. Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente bedeutete dies, dass nach der Injektion der hohen Muscimol-Konzentrationen möglicherweise die Aktivität des *Hypothalamus* und, zusätzlich zum NAME, andere Teile des *Corpus amygdaloideum* beeinflusst wurden. Der *Hypothalamus* ist an der Regulierung der Reaktion auf sensorische Stimuli und Stress und anderer autonomer Funktionen beteiligt. Der *Nucleus amygdalae centralis*, beispielsweise, spielt eine Rolle bei der Kontrolle der Aufmerksamkeit und, neben dem *Nucleus amygdalae basolateralis*, der Verarbeitung von Furcht- bzw. Angstreaktionen. Die *Nuclei amygdalae basolateralis* und *basomedialis* sind wichtig für die Steuerung der Motivation, des Entscheidungsverhaltens bei verschiedenen Wahlmöglichkeiten und des Erkundungsverhaltens (Yilmazer-Hanke, 2008). Die Beeinflussung der Aktivität der beispielhaft genannten Hirnareale allein könnte eine Erklärung für die fehlende Motivation, Stimulierbarkeit, Aufmerksamkeit und den veränderten Atemrhythmus der Versuchstiere nach der Injektion von Muscimol liefern.

Die gestörten motorischen Funktionen (ataktische Bewegungen, gekrümmte Haltung) sind mit einer möglichen Hemmung der Basalganglien durch Muscimol erklärbar. Studien

über Furchtkonditionierungsvorgänge bei Mäusen, in denen Muscimol in einer Konzentration von 8,8 mM in den *Cortex cingularis anterior* (Tang *et al.*, 2005), den *Cortex entorhinalis* bzw. das *Subiculum* (Lewis & Gould, 2007) injiziert wurde oder Studien zur Objektwiedererkennung nach Injektion von Muscimol (8,8 mM) in den dorsalen Hippokampus (Oliveira *et al.*, 2010), liefern keine Informationen über mögliche Verhaltensauffälligkeiten der Versuchstiere oder ähnliche Probleme mit dieser extrem hohen Konzentration. Es erscheint nicht unplausibel, dass Injektionen in diese Gebiete durch deren Lage kaum Einfluss auf die Funktionen der tiefer im Tel- und Dienzephalon gelegenen Hirnareale aufgrund von einfacher Substanzdiffusion haben.

Interessant ist hingegen, dass im Zusammenhang mit Injektionen vergleichsweise sehr hoher Muscimol-Konzentrationen in tiefer im Tel- und Dienzephalon gelegene Hirnareale, wie beispielsweise in den *Nucleus suprachiasmaticus* des *Hypothalamus* (22 mM Muscimol; Gillespie *et al.*, 1997), in die *Nuclei amygdalae centralis* (eingesetzte Muscimol-Konzentration nicht eindeutig: Angabe: "4,4 nmol (3,3 ng/nl) in 300 nl NaCl-Lösung" entspricht 14,6 mM (28,9 mM); Angabe: "8,8 nmol (6,6 ng/nl) in 300 nl NaCl-Lösung" entspricht 29,3 mM (57,8 mM); Jasnow & Huhman, 2001), in den Hippokampus bzw. den *Nucleus amygdalae basolateralis* (3,6 mM; 7,3 mM; 9 mM; 10,9 mM Muscimol; Markham *et al.*, 2010) oder in den NAME (5,5 mM; 11 mM Muscimol; Markham & Huhman, 2008) des Goldhamsters keine entsprechenden Verhaltensauffälligkeiten beschrieben wurden. Entgegen den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnissen nach Injektion der hohen Muscimol-Konzentrationen (kein soziales Interesse am Artgenossen, verminderte Reaktion auf taktile Stimulation, verminderte lokomotorische Aktivität), beschrieben die Autoren dieser Arbeiten (Jasnow & Huhman, 2001; Markham & Huhman, 2008; Markham *et al.*, 2010), dass die Dauer sozialer und nicht-sozialer Verhaltensweisen der Versuchstiere gegenüber einem adulten Artgenossen nach der Injektion des Muscimols entweder nicht verändert oder sogar verlängert, wohingegen die Dauer unterordnender bzw. defensiver Verhaltensweisen (abhängig vom Hirnareal, in das injiziert wurde) reduziert war. Dies spricht gegen eine generelle Inhibition sozialer Verhaltensweisen oder der lokomotorischen Aktivität durch die Injektion von Muscimol. Zudem wurde die Reaktion auf schmerzhaft stimuli durch die bilaterale Injektion von Muscimol in den *Nucleus amygdalae centralis* nicht beeinflusst (Jasnow & Huhman, 2001). Eine Ausnahme zeigte sich in einem Experiment der Studie von Markham und Huhman (2008) nach der Injektion von Muscimol (5,5 mM; 11 mM) in den NAME. Soziale Verhaltensweisen waren in diesem Fall signifikant reduziert, nicht-soziale Verhaltensweisen (Lokomotion, Erkundungsverhalten, Fressen, Putzen, Nestbau, Schlafen) waren signifikant erhöht,

wobei die Autoren nicht darauf eingingen, ob der Anteil des Schlafens dabei eine (ausschlaggebende) Rolle spielte. Die Autoren bemerkten jedoch explizit, dass die Reduktion sozialer Verhaltensweisen nicht für ihr Hauptergebnis, die Reduktion unterordnender Verhaltensweisen, verantwortlich sei und dass Muscimol in den injizierten Konzentrationen keine unspezifischen Effekte oder Ataxie auslöste (Markham & Huhman, 2008).

Auch nach der Injektion von 8,8 mM Muscimol in den *Nucleus amygdalae basolateralis* (Muller *et al.*, 1997; Huff & Rudy, 2004; Huff *et al.*, 2005) oder in den dorsalen Hippokampus (Corcoran & Maren, 2004; Corcoran *et al.*, 2005) von Ratten wurden keine vergleichbaren Verhaltensauffälligkeiten beschrieben. Allerdings wurde in einer anderen Studie erwähnt, dass die intrazerebroventrikuläre Injektion eines GABA_A-Rezeptor-Agonisten (THIP, 5 µg in 5 µl NaCl-Lösung) in Ratten Ataxie und Sedierung auslöste (Depaulis & Vergnes, 1983).

Sakamoto und Endo (2010) beschrieben bei Mäusen die Injektion einer, den vorliegenden Ergebnissen zufolge, relativ hohen Konzentration von 10 mM Muscimol (0,4 µl) in den *Nucleus amygdalae lateralis*. Eine Diffusion des Muscimols ausgehend von dieser Injektionsposition hätte ähnliche Hirnareale betreffen und deren Funktion beeinflussen müssen, wie nach Injektion in den NAME, jedoch berichteten die Autoren nicht von vergleichbaren Auffälligkeiten im Verhalten dieser Mäuse. Sie zeigten vielmehr, dass eine permanente Läsion, maßgeblich der basalen und lateralen Kerngebiete, des *Corpus amygdaloideum* keinen Einfluss auf die motorische Koordination oder das Schmerzempfinden der Mäuse hatte (Sakamoto & Endo, 2010). Dem gegenüber schilderte Frau Dr. Yulia Golub (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München; unveröffentlicht) Verhaltensauffälligkeiten von Mäusen nach Injektion von Muscimol in einer Konzentration von 8,8 mM in den dorsalen Hippokampus, die dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen, anormalen Verhalten ähnelten. Die Versuchstiere konnten infolgedessen nicht den geplanten Konditionierungstests unterzogen werden. Die hier beschriebenen Verhaltensauffälligkeiten nach der Injektion von 4,4 mM Muscimol konnten von Frau Dr. Golub nach intrahippokampaler Gabe jedoch nicht bestätigt werden. Für den Einsatz in den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Injektionsexperimenten waren darüber hinaus sogar die Muscimol-Konzentrationen 2,2 mM und 1,1 mM aufgrund der offensichtlichen Verhaltensänderungen, einschließlich der eingeschränkten Aktivität der Versuchstiere, vor allem aber aufgrund des ausbleibenden Untersuchens von Stimulusjungtieren ungeeignet. Diese Ergebnisse widersprechen den bereits erwähnten Studien über den erfolgreichen Einsatz hoher Muscimol-Konzentrationen. Sie lassen Zweifel an der Eignung dieser Konzentrationen für die Untersuchung der Auswirkung von Inhibitionen verschiedener Hirnareale auf das Verhalten von Versuchstieren auch in anderen Tests

aufkommen, da auch für diese sowohl intrinsisch motivierte (Untersuchen von sozialen und nicht-sozialen Stimuli, Lokomotion, Erkundungsverhalten) als auch responsive Verhaltensweisen (Reaktion auf Stimuli) und das Wohlbefinden der Versuchstiere Grundvoraussetzungen sind. Die Interpretation gemessener Verhaltensparameter nach der Injektion hoher Muscimol-Konzentrationen sollte daher mit Vorsicht und erst dann erfolgen, wenn ein verändertes Wohlbefinden der Versuchstiere, deren veränderte Aktivität und Reaktion auf Stimuli als Ursachen sicher ausgeschlossen werden können.

Edeline und Mitarbeiter (2002) diskutierten, dass die Injektion niedriger Substanzkonzentration in kleinen Volumina der beste Weg ist, um die Diffusion zu limitieren. Zudem zeigten Arikan und Mitarbeiter (2002), dass schon die relativ geringe Muscimol-Konzentration von 30 nM die spontane elektrische Aktivität von Neuronen im *Cerebellum* komplett blockieren kann. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Versuchstiere zeigten nach der intraamygdaloidalen Injektion von Muscimol in den beiden niedrigeren Konzentrationen (367 μ M und 110 μ M) keine Verhaltensauffälligkeiten mehr (Abb. 14). Es sollte sichergestellt werden, dass die Injektion eine größtmögliche Inhibition des NAME bewirkte. Aus diesen Gründen wurde für die Injektion in den Hauptversuchen die höhere Muscimol-Konzentration (367 μ M) gewählt. Wie später beschrieben, reichte diese Konzentration aus, um im Test auf die soziale Diskriminierung das Verhalten der Versuchstiere zu modulieren. Jedoch kann die Größe des durch die Diffusion der niedrigen Muscimol-Konzentrationen beeinflussten Hirnbereiches nicht sicher bestimmt werden.

Nicht für jede der in den Hauptversuchen verwendeten Substanzen standen Daten für deren Diffusion in verschiedenen Hirnarealen zur Verfügung. Daher bedurfte es einer Verifizierung der Substanzdiffusion im NAME. Dies sollte mit Hilfe der Injektion von Muscimol BODIPY TMR-X erfolgen. Wie schon angedeutet, hängt die biologisch effektive Diffusion neben dem injizierten Volumen, der Substanzkonzentration und anderen Faktoren auch von der verfügbaren Zeit nach der Injektion bis zum Verhaltensversuch ab. Da die Injektion von Anisomycin und Muscimol in den Hauptversuchen drei Stunden vor dem *Sampling* bzw. vor *Choice* stattfanden, wurde auch die Diffusion des Muscimol BODIPY TMR-X drei Stunden nach der Injektion untersucht.

Die Grundvoraussetzung der Löslichkeit des Muscimol BODIPY TMR-X in NaCl-Lösung ohne die Verwendung von DMSO war für die hier durchgeführten Experimente nicht gegeben. Das in der Literatur beschriebene Lösungs-Protokoll (Allen *et al.*, 2008) konnte hier nicht reproduziert werden und ist demnach kritisch zu bewerten.

In den Hirnschnitten von sechs Versuchstieren wurde eine Ansammlung (Pfropfen) fluoreszierendes Muscimol BODIPY TMR-X entweder direkt an der Injektionsstelle (Abb. 15 D – F) oder im umliegenden Gewebe, also nicht direkt am Ende der Injektionskanüle, nachgewiesen (Abb. 15 A – C). Es ist vorstellbar, dass große, ungelöste Moleküle des Muscimol BODIPY TMR-X in das Gewebe gedrückt wurden. In den Hirnschnitten dreier Versuchstiere konnte keine Fluoreszenz nachgewiesen werden. Dies lag möglicherweise daran, dass das Muscimol BODIPY TMR-X auch in diesen Tieren nicht in das Hirngewebe diffundierte und die ursprünglich vorhandenen Substanzpfropfen später durch die Gewebspräparation ausgewaschen wurden. Anhand der Hirnschnitte eines Versuchstieres entstand der Eindruck einer ca. 200 bis 400 μm weiten, asymmetrischen Diffusion des Muscimol BODIPY TMR-X in das Hirngewebe (Abb. 15 G – J), obgleich das Erscheinungsbild der Läsion vermuten lässt, dass auch bei diesem Versuchstier ein Großteil des Muscimol BODIPY TMR-X als Pfropfen in das Gewebe gedrückt und anschließend aus den Hirnschnitten herausgewaschen wurde.

Nicholson (1985) diskutierte zwei theoretische Möglichkeiten des Verhaltens injizierter Substanzen in Hirngewebe. Im ersten Fall bildet sich durch die injizierte Substanz ein Gewebeshohlraum, in dem sich die Substanz ansammelt. Im zweiten Fall bildet sich durch die Injektion kein Hohlraum, die Substanz diffundiert sofort in das umliegende Gewebe. Der Autor ging davon aus, dass in der Praxis eine Kombination aus beiden Fällen zutrifft, d.h. es bildet sich zu einem gewissen Grad ein Hohlraum, aus dem die Substanz dann in das umliegende Gewebe diffundiert (Nicholson, 1985). Da sich das Muscimol BODIPY TMR-X nicht vollständig lösen ließ, die Mehrzahl der Moleküle daher wahrscheinlich zu groß war, um in das Gewebe zu diffundieren, lag hier womöglich genau der Fall vor, dass sich ein großer Hohlraum gefüllt mit Muscimol BODIPY TMR-X bildete („Pfropfen“), aus dem dann ein geringer Teil gelösten Muscimol BODIPY TMR-X in das Gewebe diffundieren konnte. Neben diesen Modellen, in denen von einer sphärischen Ausbreitung ausgegangen wird (Nicholson, 1985), gibt es ein weiteres Modell der elliptischen Ausbreitung (Hupe *et al.*, 1999), welches sich am ehesten dazu eignet, die anhand der Hirnschnitte eines Tieres gewonnenen Beobachtungen erklären zu können. Diese elliptische Ausbreitung wurde dadurch begründet, dass Substanzen dazu tendieren, entlang des Kanülentraktes nach oben zu fließen (siehe auch: Corcoran *et al.*, 2005). Auch Allen und Mitarbeiter (2008) beschrieben, dass Muscimol BODIPY TMR-X, abhängig vom injizierten Hirnareal und der Gewebebeschaffenheit (Fasertrakte, mikroanatomische Grenzen zwischen Hirnarealen), asymmetrisch diffundiert. Vergleichbar mit der hier dargestellten, asymmetrischen Diffusion des Muscimol BODIPY TMR-X (823 μM) über 200 bis 400 μm diffundierte das Muscimol BODIPY TMR-X in der doppelten Konzentration

(1,6 mM) in dieser Studie ca. 0,5 bis 1 mm um die Injektionsstelle in das Gewebe (Allen *et al.*, 2008).

Da die Diffusion von Muscimol BODIPY TMR-X in wässrigem Milieu aufgrund des etwa sechsfach höheren Molekulargewichtes und der lipophilen Eigenschaften des Fluorophoranteils geringer ist, als die des reinen Muscimols (Allen *et al.*, 2008), kann anhand dieser Daten kein endgültiger Rückschluss auf die Diffusion des Muscimols in den Hauptversuchen gezogen werden. Der Ermittlung des möglichen, biologisch effektiven Diffusionsareals können allgemeine Informationen aus der Literatur dienen. So ist bekannt, dass sich Farbstoffe, die in einem Volumen bis zu 2 μl in thalamisches bzw. hypothalamisches Hirngewebe injiziert wurden, sphärisch oder tropfenförmig ausbreiten. Wurden 0,5 μl verschiedener Farbstoffe injiziert, so hatte das Diffusionsareal zehn bis 25 Minuten nach der Injektion einen Durchmesser von 0,9 bis 1,6 mm. Unabhängig vom Molekulargewicht der einzelnen Farbstoffe, zeigten sich jedoch bereits Unterschiede in der Größe des Diffusionsareals (Myers, 1966). Verschiedene Substanzen diffundieren also, aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften, ungleich weit. Zudem ist davon auszugehen, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen aufgrund ihrer Interaktion mit Ionenkanälen und/oder Rezeptoren und/oder ihrer Aufnahme in Zellen unterschiedlich diffundierten und in ihrer Diffusionsdistanz nur wenig vergleichbar mit Farbstoffen sind. Der effektive Radius der Substanzwirkung ist abhängig von der eingesetzten Konzentration, der Konzentration, die es bedarf, um einen Effekt auszulösen, der Stärke der Bindung, der Löslichkeit im Zielgewebe, der Abbaurate, dem Widerstand gegen den Druck der extrazellulären Flüssigkeit und der Dauer und Geschwindigkeit der Substanzinjektion. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die Durchführung einer zweifelsfreien Analyse der konzentrationsabhängigen Diffusion aufgrund der undefinierten Menge an Muscimol BODIPY TMR-X in Lösung und der fehlenden Anzahl auswertbarer Hirnschnitte nicht möglich. Zwar konnten daher keine endgültigen Aussagen über das räumliche und zeitliche Verhalten der in den NAME injizierten Substanzen getroffen, jedoch kann postuliert werden: Gelöste Moleküle diffundieren in das Gewebe des NAME ohne dort einen störenden Gewebeschaden zu hinterlassen.

Mit Hilfe der immunhistochemischen Untersuchung der c-Fos-Synthese nach der Injektion von 20 μg Anisomycin in den NAME drei Stunden vor einer vierminütigen Jungtierexposition wurde die Effektivität der Proteinbiosyntheseinhibition überprüft. Die Anzahl c-Fos-immunpositiver Zellen war sowohl im NAME als auch im Pir nach der Injektion von Anisomycin gegenüber der Injektion von NaCl-Lösung signifikant reduziert. Die Versuchstiere

beider Gruppen untersuchten die Jungtiere während der vierminütigen Exposition mit vergleichbarer Dauer (Abb. 16). Die Unterschiede in der Anzahl c-Fos-immunpositiver Zellen zwischen den mit NaCl-Lösung und den mit Anisomycin injizierten Versuchstiergruppen beruhten demzufolge nicht auf Unterschieden in der Dauer der Akquisition der „olfaktorischen Signatur“. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine vierminütige Jungtierexposition die Anzahl c-Fos-immunpositiver Zellen im NAME und im Pir erhöht und dass 20 Minuten vor der Jungtierexposition systemisch appliziertes Anisomycin diese c-Fos-Synthese in beiden Hirnarealen inhibiert (Richter *et al.*, 2005). Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuche bestätigten die c-Fos-Synthese in beiden Hirnarealen und deren Inhibition durch, hier lokal verabreichtes, Anisomycin.

Für den Einfluss der Injektion in den NAME auf die c-Fos-Synthese im Pir müssen zwei mögliche Mechanismen in Betracht gezogen werden: Dieser ist entweder auf die Diffusion des Anisomycins in den Pir oder die Störung einer funktionellen Verbindung zwischen beiden Hirnarealen zurückzuführen. Gegen letztere Annahme sprechen Hinweise aus der Literatur. Die durch soziale, olfaktorische Stimuli induzierte c-Fos-Synthese in verschiedenen, vom NAME innervierten Hirnarealen (NIST, APM) wurde durch die Läsion des NAME des Goldhamsters reduziert (Maras & Petrusis, 2008). Außerdem wurde gezeigt, dass die durch einen sozialen Stimulus im NAME, im NIST und in der APM induzierte c-Fos-Synthese in OTKO-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen reduziert war. Die c-Fos-Synthese im Pir blieb jedoch auch in den OTKO-Mäusen erhöht. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die Verarbeitung sozialer, olfaktorischer Stimuli in den OTKO-Mäusen bis zum NAME normal verlief, der NAME jedoch nicht aktiviert wurde und daher die anschließend Informationsweiterleitung zum NIST und zur APM nicht normal stattfinden konnte (Ferguson *et al.*, 2001). Die primär durch die Inaktivierung des NAME beeinflussten Hirnareale waren demzufolge der NIST und die APM, wohingegen der Pir nicht funktionell inhibiert wurde.

Hingegen wurde bereits in früheren Studien gezeigt, dass intrazerebral injiziertes Anisomycin, in der hier verwendeten Konzentration, aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften bis zu zwei Millimeter vom Injektionsort in das umliegende Gewebe diffundiert und die Diffusion bzw. die Inhibition der Proteinbiosynthese drei Stunden nach der Injektion maximal war (Wanisch & Wotjak, 2008). Die Distanz zwischen dem Injektionsort und dem Pir von ca. 1,5 mm (Franklin & Paxinos, 1997) und das Zeitfenster zwischen der Injektion und der Jungtierexposition von drei Stunden lassen eine Diffusion des Anisomycins und damit die Inhibition der Proteinbiosynthese im Pir daher möglich erscheinen. Demzufolge ist es also wahrscheinlich, dass die signifikant verringerte c-Fos-Synthese im Pir nach der Injektion von

Anisomycin in den NAME durch die Diffusion des Anisomyocins in den Pir verursacht wurde. Außerdem geben diese Ergebnisse Grund zu der Annahme, dass auch die anderen, im Rahmen der Hauptversuche injizierten Substanzen über die Grenzen des NAME hinausdiffundierten und somit andere Hirnareale beeinflussen konnten.

An dieser Stelle sollen einige grundsätzliche Aspekte der anschließend zu diskutierenden Hauptversuche erörtert werden. Die Versuchstiere zeigten nach der Injektion der jeweiligen Substanzen in den beschriebenen Konzentrationen keine Auffälligkeiten im allgemeinen Verhalten. Daher ist davon auszugehen, dass die sich im Verhaltenstest widerspiegelnden Veränderungen des sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses ausschließlich durch die Effekte der Substanzen auf die an der neuronalen Verarbeitung dieses Gedächtnisses beteiligten Hirnstrukturen, insbesondere, da direkt in diesen injiziert wurde, auf den NAME, bedingt wurden.

Die Fähigkeit der Versuchstiere, eine Woche nach Abschluss der Injektionsexperimente zwischen J1 und J2 zu diskriminieren (Abb. 19 C und Abb. 21 C), weist auf die Reversibilität der Substanzeffekte hin. Aufgrund der sehr kurzen Wirkdauer der injizierten Lidocain-Konzentration wurde von einem entsprechenden Kontrolltest nach den Injektionsexperimenten mit Lidocain abgesehen. Jedes Versuchstier wurde (nur) vier Mal injiziert, um großen, durch die wiederholte Injektion verursachten Gewebeschäden vorzubeugen. Da das Sozialverhalten gegenüber Artgenossen zudem ein Indikator für das generelle Wohlbefinden von Nagetieren ist (Dantzer *et al.*, 1991) und die Versuchstiere in diesem abschließenden Test ein normales Verhalten zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass durch die Injektion kein permanenter Gewebeschaden entstanden ist.

Speziell Anisomycin wurde als Ribotoxin beschrieben, das in Konzentrationen, welche die Proteinbiosynthese noch nicht signifikant inhibieren, Apoptose-auslösende Signalkaskaden aktiviert (siehe: Rudy *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass eine im Vergleich zu der für die vorliegende Arbeit eingesetzte, mehr als dreifach so hohe Anisomycin-Konzentration, in den *Nucleus amygdalae basolateralis* injiziert, keinen neuronalen Zelltod auslöste (Desgranges *et al.*, 2008). Dies und die vorliegenden Ergebnisse geben Grund zu der Annahme, dass durch die Injektion von Anisomycin die Zellen des *Corpus amygdaloideum* nicht dauerhaft oder wenn, dann nur in geringem Ausmaß geschädigt wurden.

Im Rahmen der Vorversuche wurden die Voraussetzungen für die folgenden Hauptversuche geschaffen und optimiert. Es wurde nachgewiesen, dass sowohl männliche als auch weibliche Jungtiere als soziale, olfaktorische Stimuli im Verhaltenstest geeignet sind. Die Platzierung der Führungskanülen wurde fortlaufend kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert, um für jedes Versuchstier eine bestmögliche Injektionsposition zu gewährleisten. Die erforderliche Erholungszeit von sieben Tagen nach der OP wurde bestimmt und ein Einfluss der OP bzw. des Transportes und der Injektionsprozedur auf die Fähigkeit der Versuchstiere, ein Jungtier wiederzuerkennen, ausgeschlossen. Die Diffusionsstudien ergaben, dass die Zellen des NAME von den Substanzen erreicht und, zumindest anhand der Anisomycin-Injektion gezeigt, inhibiert wurden. Zudem wurde eine geeignete Muscimol-Konzentration für den Einsatz in den Hauptversuchen gefunden. Die damit etablierten Behandlungsbedingungen boten eine solide Grundlage für die Untersuchung der Versuchstiere im Verhaltenstest nach den verschiedenen Substanzinjektionen.

4.2 Hauptversuche

Aufgrund der komplexen Befunde dieser Studie werden zunächst die Ergebnisse der Injektionsexperimente für jede Substanz separat diskutiert. Dieser Diskussion liegt die Prüfung der Daten auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Untersuchungszeit gegenüber J1 und der gegenüber J2 während *Choice* mit dem t-Test für gepaarte Stichproben zugrunde. Anschließend folgt eine substanzübergreifende Diskussion.

4.2.1 Lidocain

Die Injektion von Lidocain in den NAME direkt vor dem *Sampling* oder drei Stunden nach dem *Sampling* hatte keinen hemmenden Einfluss auf das Wiedererkennungsgedächtnis der Versuchstiere für J1. Wurde den Versuchstieren das Lidocain jedoch direkt vor *Choice* in den NAME injiziert, so waren sie nicht in der Lage, zwischen J1 und J2 zu diskriminieren. Außerdem waren die Versuchstiere nach der Injektion von NaCl-Lösung in den NAME direkt vor dem *Sampling*, drei Stunden nach dem *Sampling* oder direkt vor *Choice* unfähig, während *Choice* zwischen J1 und J2 zu diskriminieren (Abb. 17 B).

Die Versuchstiere zeigten während des *Samplings* nahezu kein Aggressions- und Sexualverhalten, wenn ihnen Lidocain direkt vor dem *Sampling* injiziert wurde (Abb. 18). Dies deutet darauf hin, dass Lidocain die für diese Verhaltensweisen benötigte Informationsweiterleitung während des *Samplings* inhibierte und dass der durch die Inhibition

betroffene Hirnbereich an der Generierung des entsprechenden Verhaltens beteiligt ist. Da die Versuchstiere, trotz dieser Inhibition der Entstehung und Weiterleitung von Aktionspotentialen während des *Samplings*, J1 während *Choice* wiedererkennen konnten, scheint die Informationsweiterleitung im inhibierten Hirnbereich während der Akquisition der „olfaktorischen Signatur“ nicht notwendig zu sein. Außerdem scheint die Bildung des Gedächtnisses für einen Artgenossen nicht auf einer aggressiven und/oder sexuellen Motivation gegenüber diesem zu beruhen.

Nach der Injektion von NaCl-Lösung direkt vor dem *Sampling* war das Aggressions- und Sexualverhalten während des *Samplings* signifikant reduziert, jedoch nicht völlig unterdrückt (Abb. 18). NaCl-Lösung verursachte demnach keine vollständige Inhibition des NAME, dennoch konnten die Versuchstiere nicht zwischen J1 und J2 diskriminieren. Sowohl Na⁺- als auch Cl⁻-Ionen sind an der Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen an der Neuronenmembran involviert. Scheinbar beeinflusste die NaCl-Lösung das extrazelluläre Ionenmilieu derart, dass die Weiterleitung von Aktionspotentialen, und verbunden damit die Neurotransmitterfreisetzung, verändert wurde. Diese Art des Einflusses wird dadurch bestätigt, dass die Inhibition der Aktionspotentialweiterleitung durch Lidocain die negative Wirkung der NaCl-Lösung auf die soziale Diskriminierungsfähigkeit der Versuchstiere verhinderte. Wird die Informationsweiterleitung im Bereich des NAME also unterbrochen, so hat dies keinen Einfluss auf die Akquisition der olfaktorischen Informationen. Wird jedoch das Ionenmilieu gestört und dadurch die Aktivität der lokalen Neuronen verändert, so beeinflussen die dort generierten Aktionspotentiale möglicherweise die Funktion anderer Hirnareale mit Gedächtnis-relevanter Funktion.

Wenige Hinweise aus der Literatur zeigen, dass NaCl-Lösung, im Nanoliterbereich in neuronales Gewebe injiziert, die neuronale Aktivität entweder gar nicht oder nur für sehr kurze Zeit (zehn Sekunden) reduzierte (Malpeli & Schiller, 1979) bzw. 1 µl NaCl-Lösung, in den Kortex injiziert, zehn Minuten nach der Injektion nur eine sehr geringe funktionelle Inhibition von 11 bis 12,5 % in einem Radius von 240 bis 270 µm verursachte, welche aber auch auf die Gewebetraumatisierung durch die Injektionskanüle zurückgeführt werden könnte (Martin, 1991). Es kann dennoch nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die NaCl-Lösung durch Diffusion in einer gewissen Distanz zum Injektionsort noch Veränderungen im extrazellulären Milieu verursachte und somit auch andere Hirnareale als den NAME beeinflusste. Da es jedoch unwahrscheinlich ist, dass die NaCl-Lösung weiter als das Lidocain diffundierte und die Inhibition dieses Hirnbereiches durch Lidocain keine negativen Auswirkungen auf das Wiedererkennungsgedächtnis hatte, ist der Verlust der Diskriminie-

rungsfähigkeit der Versuchstiere, wie bereits postuliert, auf eine Störung anderer Hirnareale durch die am Injektionsort generierten Aktionspotentiale und nicht durch Veränderungen ihres lokalen extrazellulären Ionenmilieus zurückzuführen.

Vergleichbar mit der Situation nach der Injektion direkt vor dem *Sampling* schien NaCl-Lösung, drei Stunden nach dem *Sampling* injiziert, das Ionenmilieu und die Informationsweiterleitung und dadurch die Diskriminierungsfähigkeit der Versuchstiere zu stören (Abb. 17 B, mittlere Spalte). Obwohl im Test während *Choice* zwar noch ein Effekt auf das Aggressions- und Sexualverhalten, aber keine völlige Blockade dieser Verhaltensweisen erkennbar war, kann dennoch davon ausgegangen werden, dass Lidocain zum Zeitpunkt der Injektion drei Stunden nach dem *Sampling* die Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen derart blockierte, dass zu diesem Zeitpunkt kein Aggressions- und Sexualverhalten messbar gewesen wäre. Wie auch nach der Injektion direkt vor dem *Sampling*, hatte diese Blockade der Prozesse im NAME drei Stunden nach dem *Sampling* keinen Einfluss auf das Wiedererkennungsgedächtnis der Versuchstiere. Die Informationsweiterleitung im NAME scheint also während der Konsolidierungsprozesse nicht notwendig zu sein, wohingegen eine durch die Störung des extrazellulären Ionenmilieus erzeugte Änderung der Informationsweiterleitung im NAME und angrenzenden Hirnarealen die Konsolidierung des Gedächtnisses für J1 verhinderte. Zu diesem Zeitpunkt ist das soziale Wiedererkennungsgedächtnis insensitive für die Hemmung der Proteinbiosynthese durch systemisch appliziertes Anisomycin (Richter *et al.*, 2005), jedoch vulnerabel für Interferenzen mit olfaktorischen Informationen eines anderen Jungtieres (Engelmann, 2009). Denkbar ist, dass drei Stunden nach dem *Sampling* Konsolidierungsprozesse stattfanden, die nicht Proteinbiosynthese-abhängig waren und durch die Injektion von NaCl-Lösung und die daraus folgende Beeinflussung des Ionenmilieus gestört wurden bzw. sich der Einfluss der NaCl-Lösung auf die späteren, Proteinbiosynthese-abhängigen Konsolidierungsprozesse (Richter *et al.*, 2005; Wanisch *et al.*, 2008) ausdehnte. Die durch die injizierte NaCl-Lösung induzierten Effekte interferierten somit mit den laufenden Vorgängen der Konsolidierung des Gedächtnisses für J1. Zwar wurden keine Informationen einer neuen „olfaktorischen Signatur“ verarbeitet, dennoch ist ein Vergleich mit den Ergebnissen der oben genannten Interferenzstudie anzustellen: Da sowohl die Akquisition als auch die Konsolidierung des Gedächtnisses für ein Jungtier offenbar nicht die Weiterleitung von Informationen im NAME zur Bedingung haben, interferieren die Informationen eines neuen Jungtieres mit denen eines drei Stunden vorher präsentierten Jungtieres, neben der Kollision der beiden Gedächtnisspuren auf Ebene der Proteinbiosynthese, möglicherweise auch

auf der Ebene der elektrischen Informationsweiterleitung und dies in Hirnarealen außerhalb des NAME.

Obwohl NaCl-Lösung in vielen intrazerebralen Injektionsstudien als Kontrollsubstanz verwendet wurde, gibt es, soweit der Autorin bekannt ist, in der Literatur keinen Hinweis eines solchen Effektes auf das Verhalten der Versuchstiere (vgl.: Flood *et al.*, 1981; Tang *et al.*, 2005; Lewis & Gould, 2007; Fellini *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu anderen, in der Literatur geschilderten Verhaltenstests zur Untersuchung des Lernens und der Gedächtnisbildung (klassische oder operante Konditionierung, räumliches Lernen etc.) scheint das soziale Wiedererkennungsgedächtnis relativ empfindlich gegenüber Störungen des extrazellulären Ionenmilieus zu sein. Dies könnte damit erklärt werden, dass ein erregender (belohnender oder bestrafender) Stimulus, der zu einer länger anhaltenden Fähigkeit der Versuchstiere beiträgt, die erlernte Verhaltensantwort im Test zu demonstrieren und diese widerstandsfähiger gegenüber Störungen macht (Flood *et al.*, 1973; McGaugh, 2006), in diesem Test nicht eingesetzt wurde. Der Test auf die soziale Diskriminierungsfähigkeit nutzt vielmehr ein spontanes (unkonditioniertes) Verhalten von Nagetieren und weist ihre natürliche Fähigkeit nach, ein soziales Wiedererkennungsgedächtnis auszubilden.

Da Lidocain in NaCl-Lösung gelöst ist und in der injizierten Konzentration nur eine zehn- bis 20-prozentige funktionelle Inhibition bewirkt (Pereira de Vasconcelos *et al.*, 2006), ist es denkbar, dass es die störenden Effekte der NaCl-Lösung auf die elektrische Aktivität der Neuronen kompensiert, ohne jedoch die Weiterleitung sämtlicher Aktionspotentiale zu blockieren. Folglich wäre die verbleibende neuronale Aktivität für die Informationsweiterleitung als Grundlage der Akquisition olfaktorischer Informationen und der Bildung eines sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses ausreichend und eine Beteiligung des NAME an diesen Prozessen nicht gänzlich auszuschließen. Die eingesetzte Lidocain-Konzentration und die damit erzeugte funktionelle Inhibition reichte in anderen Tests jedoch aus, die definierten Verhaltensantworten zu blockieren (Middei *et al.*, 2004; Pereira de Vasconcelos *et al.*, 2006). Zudem verhinderte Lidocain in dem für die vorliegende Arbeit durchgeführten Verhaltenstest die Generierung von aggressivem Verhalten/Sexualverhalten gegenüber den Jungtieren (Abb. 18). Es ist daher davon auszugehen, dass Lidocain in der injizierten Konzentration auch die Diskriminierungsfähigkeit der Versuchstiere inhibiert hätte, wäre eine Beteiligung des inhibierten Hirnbereiches an der Informationsweiterleitung während der Akquisition/Konsolidierung des Gedächtnisses essentiell. Die trotz der Hemmung der Aktionspotentiale in Neuronen des NAME, angrenzender Hirnareale und in Neuronenfortsätzen, die durch den injizierten Hirnbereich hindurchziehen, bestehende Fähigkeit der

Versuchstiere, im Verhaltenstest ein soziales Gedächtnis für J1 zu demonstrieren, weist darauf hin, dass die Generierung und die Weiterleitung von Aktionspotentialen, als Folge der Akquisition der „olfaktorischen Signatur“ eines Jungtieres und während der Gedächtniskonsolidierung, in diesen Hirnarealen nicht ausschlaggebend für die Bildung des Gedächtnisses sind.

Die Injektionen von NaCl-Lösung oder Lidocain direkt vor *Choice* hatten auf das Aggressions- und Sexualverhalten vergleichbare Auswirkungen wie nach der Injektion direkt vor dem *Sampling* (Abb. 18). Jedoch waren die Versuchstiere nun auch nach der Injektion von Lidocain nicht in der Lage, zwischen J1 und J2 zu diskriminieren (Abb. 17 B, rechte Spalte). Zu diesem Zeitpunkt ist das soziale Wiedererkennungsgedächtnis bereits konsolidiert und nicht mehr empfindlich für retroaktive Interferenzen oder die Effekte systemisch injizierten Anisomycins (Richter *et al.*, 2005; Engelmann, 2009). Der fehlende Unterschied in den Untersuchungszeiten gegenüber J1 und J2 bedeutet daher nicht, dass kein Wiedererkennungsgedächtnis konsolidiert wurde. Vielmehr schienen die für das Abrufen des Gedächtnisses verantwortlichen Prozesse im beeinflussten Hirnbereich durch die Veränderung des Ionenmilieus (NaCl-Lösung) bzw. die Inhibition der Weiterleitung von Aktionspotentialen (Lidocain) gestört, woraufhin keine, dem vermutlich vorhandenen Gedächtnis entsprechende Verhaltensantwort messbar war.

Im Verhaltenstest auf die soziale Diskriminierung ist die Untersuchungszeit gegenüber dem einzelnen Jungtier (J1 oder J2) während *Choice* generell niedriger als die während des *Samplings* gegenüber J1, da sich die Gesamtuntersuchungsdauer während der vier Präsentationsminuten während *Choice* auf beide Jungtiere verteilt. Selbst unter Berücksichtigung dessen erschien die Untersuchungszeit gegenüber beiden Jungtieren während *Choice* nach der Injektion der Substanzen direkt vor *Choice* relativ gering. Dies lag mit hoher Wahrscheinlichkeit an einem Einfluss der so kurz vor dem Test erfolgten Injektionsprozedur auf das Verhalten, denn auch die Untersuchungszeit während des *Samplings* nach der Injektion direkt vor dem *Sampling* war leicht reduziert. Dennoch soll an dieser Stelle auf eine Arbeit verwiesen werden, in der eine andere interessante Möglichkeit der Interpretation gleich langer aber generell kürzerer Untersuchungszeiten gegenüber einem wiederholt präsentierten und einem neuen Objekt vorgestellt wird (McTighe *et al.*, 2010). Die Autoren gehen davon aus, dass in diesem Fall beide Objekte als „bekannt“ bewertet werden. Sie stellen die Hypothese auf, dass einzelne Hirnareale weniger verantwortlich für einen bestimmten Gedächtnistyp (z.B. Kurzzeit-, Langzeitgedächtnis) oder einen bestimmten Gedächtnisprozess (z.B. Enkodierung, Konsolidierung, Abrufen) sind, sondern dass in ihnen eher unterschiedlich komplexe Stimuluseigenschaften repräsentiert werden. Wird ein Hirnareal geschädigt, in dem eine hierarchisch hohe,

komplexe Stimulusrepräsentation stattfindet, so werden neue Objekte aufgrund einiger einfacher Merkmale, die sie mit anderen, bereits bekannten Objekten teilen, als „bekannt“ bewertet. Dies ist möglich, da andere Hirnareale, in denen einfache Stimulusmerkmale oder eine relativ unkomplexe Verknüpfung weniger Stimulusmerkmale repräsentiert werden, unbeschädigt bleiben.

Die für den Test auf die soziale Diskriminierung verwendeten Stimulusjungtiere teilen sich mit anderen Jungtieren allgemeine (olfaktorische) Eigenschaften. Eine komplexe, individuelle „olfaktorische Signatur“ entsteht entweder durch zusätzliche individuelle Duftstoffe und/oder eine individuelle Kombination von Duftstoffen (Brennan & Kendrick, 2006). Vorstellbar ist, dass durch die Injektion von Lidocain direkt vor *Choice* die Informationen der komplexen „olfaktorische Signatur“ nicht mehr verarbeitet bzw. abgerufen und stattdessen nur noch einfachere, allgemeine olfaktorische Eigenschaften in unbeeinflussten Hirnarealen „verglichen“ werden. Diese „universellen“ Merkmale wurden dabei wahrscheinlich während des *Samplings* am J1 gelernt; sie gelten für beide Jungtiere, wodurch beide Jungtiere während *Choice* vergleichbar lang aber generell relativ kurz untersucht und entsprechend dem vorgestellten Modell möglicherweise beide als „bekannt“ bewertet wurden.

Zunächst spricht dieses Modell gegen die dem Test auf soziale Diskriminierung zugrunde liegende Annahme, dass nur eine signifikant geringere Untersuchungszeit gegenüber dem bekannten J1 das Wiedererkennen dieses Jungtieres bedeutet und gleich lange Untersuchungszeiten gegenüber J1 und J2 die Bewertung beider Jungtiere als unbekannt repräsentieren. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeiten gegenüber beiden Jungtieren bedeutet jedoch weiterhin die Fähigkeit der Versuchstiere zur Diskriminierung zwischen einem bekannten und einem unbekanntem Jungtier.

Es ist also möglich, dass die Versuchstiere nach der Injektion von Lidocain direkt vor *Choice* beide Jungtiere als „bekannt“ bewerteten, weil ihr Gedächtnis für Merkmale, die beide Jungtiere tragen, durch die Inhibition des NAME nicht gestört wurde. Der durch Lidocain inhibierte Bereich des NAME spielt aber offenbar eine Rolle während des Abrufens des Wiedererkennungsgedächtnisses für das Individuum J1.

4.2.2 Muscimol

Um eine Beteiligung des NAME an der Informationsweiterleitung, ohne den störenden Effekt der direkt vor dem *Sampling* bzw. direkt vor *Choice* injizierten NaCl-Lösung, genauer zu untersuchen, wurde Muscimol eingesetzt, das, im Gegensatz zu Lidocain, über mehrere Stunden wirkt (Hikosaka & Wurtz, 1985; Martin & Ghez, 1993) und daher bereits drei

Stunden vor dem *Sampling* bzw. vor *Choice* injiziert werden konnte. Die Injektion von NaCl-Lösung hatte in diesem Fall keinen Einfluss auf die soziale Diskriminierungsfähigkeit (Abb. 19 B) und das Aggressions- und Sexualverhalten (Abb. 20) der Versuchstiere. Der Effekt der NaCl-Lösung nach Injektion direkt vor dem *Sampling* bzw. direkt vor *Choice* hielt demnach nicht über drei Stunden an. Im Verhaltenstest beobachtete Effekte nach der Injektion von Muscimol und später auch von Anisomycin sind daher mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit auf die Verum-Wirkung zurückzuführen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Wirkung des Muscimols, je nach injizierter Konzentration, 12 bis 24 Stunden anhält (Hikosaka & Wurtz, 1985; Martin & Ghez, 1993). Wie lange die Wirkung des Muscimols in der injizierten Konzentration bestand, ist nicht sicher, weshalb eine Maximalwirksamkeit von 24 Stunden nicht ausgeschlossen werden konnte. Da Muscimol, drei Stunden vor dem *Sampling* injiziert, keinen Einfluss mehr auf das Aggressions- und Sexualverhalten während *Choice* hatte (Abb. 20), kann jedoch von einem Abklingen der Muscimol-Wirkung noch vor *Choice* ausgegangen werden. Dies bedeutet, dass die betroffenen Neuronen, maßgeblich im NAME, durch das drei Stunden vor dem *Sampling* injizierte Muscimol wahrscheinlich nicht nur während der Akquisition, sondern auch während der Konsolidierungsphase und durch das drei Stunden vor *Choice* injizierte Muscimol ausschließlich während des Abrufens inhibiert waren.

Offenbar führte die durch die Aktivierung der GABA-Rezeptoren bedingte Inhibition während des *Samplings* und darüber hinaus dazu, dass die Versuchstiere im Verhaltenstest nicht zwischen J1 und J2 diskriminieren konnten (Abb. 19 B, linke Spalte). Daraus kann geschlossen werden, dass die Akquisition und/oder die Konsolidierung der olfaktorischen Informationen gestört wurde. Die adäquate Informationsweiterleitung innerhalb des NAME und zu anderen Hirnarealen und/oder auch die Verarbeitung der olfaktorischen Informationen im NAME schien zunächst für eine erfolgreiche Akquisition und/oder Konsolidierung des sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses erforderlich zu sein.

Neben der Hyperpolarisation der Neuronenmembran durch die Aktivierung von GABA-Rezeptoren wird die Aktivität der Neuronen jedoch weiterhin von exzitatorischen Signalen beeinflusst. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass die neuronale Aktivität unter Muscimol-Wirkung nicht vollständig gehemmt wurde. Muscimol hat, in hohem Maße konzentrationsabhängig, also eher einen modulierenden Einfluss auf die Aktivität der Neuronen und die Informationsweiterleitung. Da infolge der Injektion von Muscimol das Aggressions- und Sexualverhalten (Abb. 20) vergleichbar signifikant reduziert, aber nicht vollständig gehemmt war, wie nach der Injektion von NaCl-Lösung (direkt vor dem *Sampling* bzw. direkt vor

Choice injiziert, Abb. 18), könnte die Wirkung einer verstärkten GABA-Rezeptor-Aktivierung also auch vergleichbar mit der Wirkung des gestörten Ionenmilieus (NaCl-Lösung) auf die Informationsweiterleitung sein. Die Informationsübertragung wurde dementsprechend nicht komplett inhibiert, sondern verändert und die in dem durch die Injektion betroffenen Hirnbereich so generierten Aktionspotentiale könnten die Aktivität anderer Hirnareale unspezifisch beeinflusst haben. Dies bedeutet jedoch nicht automatisch, dass die Informationsweiterleitung im Bereich des NAME eine Voraussetzung für die Akquisition/Konsolidierung des Gedächtnisses ist, sondern nur, dass pharmakologisch induzierte Signale eine störende Wirkung entweder auf tatsächlich im NAME stattfindende Informationsübertragungsvorgänge und/oder auf Vorgänge in anderen, für das Wiedererkennungsgedächtnis wichtigen Hirnarealen haben. Aufgrund des Fehlens einer vollständigen Inhibition der Neuronen kann daher anhand dieser Experimente die Frage nicht sicher beantwortet werden, ob der betroffene Hirnbereich an der Akquisition/Konsolidierung des sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses beteiligt ist.

Obwohl das Aggressions- und Sexualverhalten auch nach der Injektion von Muscimol drei Stunden vor *Choice* reduziert war (Abb. 20), wurde das Abrufen des Gedächtnisses für J1 durch die Effekte des Muscimols nicht gestört (Abb. 19 B, rechte Spalte). Die Informationsweiterleitung spielt in dem beeinflussten Hirnbereich also entweder für das Abrufen des Gedächtnisses keine ausschlaggebende Rolle oder die möglicherweise verbleibende neuronale Aktivität und die dem Zweck des Vergleiches des Gedächtnisinhaltes mit der erneut präsentierten „olfaktorischen Signatur“ dienenden Informationen waren ausreichend, um erfolgreich das Gedächtnis für J1 abzurufen und im Verhaltenstest zu demonstrieren.

4.2.3 Anisomycin

Anders als nach der Injektion von NaCl-Lösung waren die Versuchstiere nach der Injektion von Anisomycin in den NAME sowohl drei Stunden vor dem *Sampling* als auch drei Stunden vor *Choice* nicht in der Lage, zwischen J1 und J2 zu diskriminieren (Abb. 21 B).

Viele Autoren gehen davon aus, dass die Konsolidierung und Langzeitspeicherung gelernter Informationen von der *De-novo*-Proteinbiosynthese abhängt und daher mit Hilfe von Proteinbiosynthese-Inhibitoren blockiert werden kann (siehe: Davis & Squire, 1984). Bekannt ist, dass das soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis auf zwei Anisomycin-sensitiven Konsolidierungsphasen beruht, aufgrund derer geschlussfolgert wurde, dass die Langzeitspeicherung dieses Gedächtnisses zwei Phasen der Proteinbiosynthese erfordert (Richter *et al.*, 2005; Wanisch *et al.*, 2008; Engelmann, 2009). Die erste Phase geht dabei einher mit der

Synthese des c-Fos-Proteins in verschiedenen Hirnarealen des HOS und des AOS, einschließlich des NAME (Abb. 16; Ferguson *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2005).

Wird Anisomycin (20 µg/0,5 µl) lokal in Hirngewebe injiziert, inhibiert es die Proteinbiosynthese für mehr als sechs, aber nicht länger als neun Stunden, wobei die maximale Inhibition nach drei Stunden erreicht wird (Wanisch & Wotjak, 2008). Tatsächlich unterdrückte die Injektion von Anisomycin in den NAME drei Stunden vor der Jungtierexposition die lokale c-Fos-Synthese (Abb. 16). Dies bedeutet für die hier durchgeführten Experimente, dass die Proteinbiosynthese im NAME während des *Samplings* bzw. während *Choice* maximal inhibiert war und bis mindestens drei Stunden nach der jeweiligen Exposition anhielt. Bekannt war, dass Mäuse nach der systemischen Applikation von Anisomycin 20 Minuten vor dem *Sampling* nicht mehr in der Lage waren, zwischen J1 und J2 zu diskriminieren (Richter *et al.*, 2005). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigten und spezifizierten dieses Resultat und lassen zunächst die Vermutung zu, dass Proteinbiosynthesevorgänge im NAME während der Akquisition und der ersten Stunden der Konsolidierung des sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses eine Rolle spielen.

Das soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis ist bis zu 15 Stunden, aber nicht länger als 18 Stunden, nach dem Lernereignis sensitiv gegenüber sowohl einer retroaktiven Interferenz als auch der systemischen Behandlung mit Anisomycin. (Richter *et al.*, 2005; Wanisch *et al.*, 2008; Engelmann, 2009). Aufgrund dieser Ergebnisse wird davon ausgegangen, dass die Proteinbiosynthese-abhängigen Konsolidierungsprozesse zur Bildung eines Langzeitgedächtnisses für einen Artgenossen nach spätestens 18 Stunden abgeschlossen sind. Eine Bedeutung der Proteinbiosynthese, speziell im NAME, für das Abrufen des Wiedererkennungsgedächtnisses (21 bis 24 Stunden nach dem Lernereignis) scheint daher unwahrscheinlich. Diesbezüglich ist jedoch anzumerken, dass die Dauer einer induzierten Amnesie sowohl vom experimentellen Ansatz als auch von der Art, Dauer und Dosis bzw. Intensität der inhibierenden Behandlung abhängig ist (Zusammenfassung siehe: Gold, 2006). Der zeitliche Verlauf einer experimentell ausgelösten Amnesie ist also mit Vorsicht zu interpretieren, da er nicht unbedingt den zeitlichen Verlauf der Gedächtnis-bildenden Prozesse reflektieren muss. Im Gegensatz zur systemischen Behandlung hat die lokale Injektion von Anisomycin offenbar eine stärkere Gedächtnis-störende Wirkung, die möglicherweise durch die im Folgenden beschriebenen, anderen Effekte des Anisomycins erklärbar ist.

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Anisomycin offenbar nicht nur die Proteinbiosynthese inhibiert, sondern auch andere Wirkungen hat, die das Lernen und die Gedächtnisbildung beeinflussen und eine Amnesie auslösen können. Es wurde beispielsweise gezeigt,

dass Anisomycin die Tyrosin-Hydroxylase und dadurch vor allem die Synthese von Dopamin und Noradrenalin sowie die Noradrenalin-Freisetzung inhibiert (Squire *et al.*, 1974; Flexner & Goodman, 1975; Freedman *et al.*, 1982). Katecholamine scheinen wiederum eine Rolle während des Lernens und der Gedächtnisbildung zu spielen (Randt *et al.*, 1971; Dismukes & Rake, 1972; Cohen & Hamburg, 1975; Gozzani & Izquierdo, 1976). Insbesondere noradrenerge Mechanismen im *Corpus amygdaloideum* sind offenbar wichtig für die Gedächtnisbildung (Ferry *et al.*, 1999; McGaugh, 2004), auch während des sozialen Wiedererkennens (Dluzen & Kreutzberg, 1993). Speziell die für dieses Gedächtnis wichtigen Effekte des Oxytocins im NAME werden möglicherweise durch Noradrenalin moduliert (Ferguson *et al.*, 2002). Eine Störung des Gedächtnisses könnte also aus der Beeinflussung zentraler, katecholaminerger Mechanismen durch Anisomycin resultieren. Jedoch gibt es auch Hinweise darauf, dass diese nichtspezifischen Effekte des Anisomycins nicht dessen amnestische Wirkung erklären, da die Injektion von α -Methyl-p-Tyrosin, welches kompetitiv die Tyrosin-Hydroxylase hemmt, keinen Einfluss auf das Langzeitgedächtnis hat (Squire *et al.*, 1974; Davis & Squire, 1984). Im Gegensatz dazu wurde in einer neueren Studie mittels Mikrodiyalyse gezeigt, dass die Freisetzung von Dopamin, Noradrenalin und Serotonin nach der Injektion von Anisomycin in das *Corpus amygdaloideum* bis zu drei Stunden erhöht war. Die extrazellulären Konzentrationen von Dopamin und Noradrenalin lagen daraufhin für mehr als acht Stunden unter ihrem Normalwert (Canal *et al.*, 2007). Sowohl die Blockade beta-adrenerger Rezeptoren direkt vor der Anisomycin-Injektion als auch die Aktivierung dieser während der späteren Phase verringerter Katecholaminkonzentrationen vermindern die durch Anisomycin ausgelösten amnestischen Effekte ohne die Inhibition der Proteinbiosynthese zu beeinflussen. Darüber hinaus zeigten sich nach der Injektion von Noradrenalin in das *Corpus amygdaloideum* amnestische Effekte vergleichbar mit denen nach der Injektion von Anisomycin (Canal *et al.*, 2007).

Zudem aktiviert Anisomycin verschiedene Kinase-Kaskaden, induziert, steigert und verlängert normalerweise transiente Signalantworten wie die Phosphorylierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (unter anderem CREB) und anderer Proteine und stimuliert somit die Transkription verschiedener IEGs, darunter auch *c-fos* und *c-jun* (Mahadevan & Edwards, 1991; Mahadevan *et al.*, 1991; Edwards & Mahadevan, 1992; Hazzalin *et al.*, 1998; Bebien *et al.*, 2003; Shafer & Slice, 2005). Dies ist von besonderer Bedeutung, da die CREB-vermittelte Transkription für die Ausbildung eines sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses wichtig ist (Kogan *et al.*, 2000) und unter Normalbedingungen die c-Fos-Synthese nach einer Exposition eines Artgenossen in definierten Hirnarealen nachweisbar ist (Ferguson *et al.*,

2001; Richter *et al.*, 2005). Andere Autoren gehen sogar davon aus, dass die Proteinbiosynthese *per se* keine Rolle für die Langzeitgedächtnisbildung spielt, sondern eher posttranslationale Modifikationen bereits vorhandener Proteine und deren kontinuierliche Aktualisierung durch endogene Aktivität dafür verantwortlich sind (Routtenberg & Rekart, 2005; Routtenberg, 2008). Laut dieser Hypothese ist die Proteinbiosynthese lediglich für das Wiederauffüllen der Proteinspeicher vonnöten. Es ist also möglich, dass Anisomycin eher einen störenden Effekt auf andere Prozesse hat, als nur aufgrund der Proteinbiosynthese-Inhibition für die fehlende Gedächtnisbildung verantwortlich zu sein (Gold, 2006). Zudem bleibt die Unterscheidung zwischen Defiziten im Verhaltenstest und einem Gedächtnisverlust schwierig (Silva *et al.*, 1998). Das fehlende Diskriminierungsverhalten im Test bedeutet nicht zwangsläufig, dass das Gedächtnis für J1 nicht existent war. Möglicherweise war das Gedächtnis nur zeitlich begrenzt unzugänglich (Lattal & Abel, 2004; Power *et al.*, 2006).

Ob durch Anisomycin der Prozess des Abrufens inhibiert oder ein Prozess des Vergessens und damit des Verlustes gespeicherter Informationen induziert wurde, kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden. Unklar bleibt aufgrund der vielschichtigen Effekte des Anisomycins weiterhin, welche die biochemischen Mechanismen sind, die durch Anisomycin sowohl während des *Samplings* als auch während *Choice* beeinflusst wurden und somit, im Zusammenhang mit dem Ausbleiben der Verhaltensantwort im Test, möglicherweise die Grundlage des „Gedächtnisses“ darstellen. Nach der Injektion von Anisomycin war das Aggressions- und Sexualverhalten zwar nicht signifikant, aber sichtbar reduziert (Abb. 22). Dies könnte, ähnlich wie nach der Injektion von NaCl-Lösung (direkt vor dem *Sampling* bzw. vor *Choice*) und Muscimol, ein zusätzlicher Hinweis darauf sein, dass der störende Effekt des Anisomycins auf die Diskriminierungsfähigkeit der Versuchstiere durch dessen Einfluss auf lokale neurochemische Funktionen verursacht wurde und den Unterschied zwischen den Ergebnissen dieser Studie und denen mit systemisch injiziertem Anisomycin erklären. Auch hier gilt aber: Die Störung der neurochemischen Mechanismen im Bereich des NAME durch pharmakologische Effekte und dadurch generierte/veränderte und in andere Hirnareale weitergeleitete Aktionspotentiale bedeutet nicht, dass der NAME im unbeeinflussten Tier an der Informationsverarbeitung während der Akquisition/Konsolidierung und/oder am Abrufen des Gedächtnisses beteiligt sein muss.

Die Abhängigkeit des sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses von verschiedenen Phasen der Proteinbiosynthese im NAME war aufgrund der diversen Effekte des Anisomycins also nicht beweisbar. Da dies bereits mit einer relativ niedrigen Anisomycin-Konzentration der Fall war, bleibt auch die Interpretation von veränderten Gedächtnisleistun-

gen in Verhaltenstests als Konsequenz der Inhibition der Proteinbiosynthese durch die intrazerebrale Injektion von höherer Dosen von Anisomycin in anderen Studien (z.B.: Schafe & LeDoux, 2000; Maren *et al.*, 2003; Huff & Rudy, 2004; Desgranges *et al.*, 2008) schwierig. Neben einer weiteren Diffusion und deren Auswirkungen, und einer längeren Wirkdauer, ist zu berücksichtigen, dass die anderen Effekte des Anisomycins mit steigender Dosis möglicherweise verstärkt werden. Verhaltensantworten, die allein nach der Injektion hoher Dosen Anisomycin verändert sind, können mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Nebeneffekte und/oder die Diffusion zurückführbar sein, da die Proteinbiosynthese auch durch niedrige Dosen effektiv inhibiert wird (Wanisch & Wotjak, 2008).

4.2.4 c-Fos-Synthese nach Präsentation der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ im VFC

Die Kontrolltiere untersuchten die ihnen per Luftstrom präsentierte Raumluft kaum. Sie wurden demnach auch kaum durch die taktile Wahrnehmung der Luftbewegung dazu motiviert, am Luftstrom zu schnüffeln. Dies lässt vermuten, dass die signifikant höhere Untersuchungszeit gegenüber der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ das Interesse an einem sozial relevanten Stimulus reflektiert.

Die c-Fos-Synthese war sowohl im NAME als auch im Pir nach der Präsentation der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ signifikant erhöht (Abb. 23). Dies entspricht dem Aktivierungsmuster nach der Präsentation der gesamten „olfaktorischen Signatur“ bei Mäusen (Richter *et al.*, 2005). Es wurde weiterhin bereits gezeigt, dass nach der Präsentation der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“ eines Jungtieres die c-Fos-Synthese sowohl im AOB als auch im MOB erhöht war (Noack *et al.*, 2010). Die Aktivierung des NAME und des Pir durch volatile Bestandteile eines sozialen Stimulus ist ein weiterer Hinweis dafür, dass sowohl das AOS als auch das HOS an der Verarbeitung von volatilen Duftstoffen beteiligt sind. Da Mäuse allein auf der Basis der Präsentation der volatilen Bestandteile der „olfaktorischen Signatur“ ein soziales Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis zeigen (Noack *et al.*, 2010), wäre es einerseits möglich, dass die Aktivierung des NAME, als Ort der Integration von Informationen aus beiden Systemen, und des Pir wichtig für die Ausbildung dieses Gedächtnisses ist. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass diese Aktivität keine Relevanz für die Gedächtnisbildung hat, sondern ein neuronales Korrelat für eine emotionale Reaktion (Aufmerksamkeit, Motivation zu untersuchen/soziales Interesse, sexuelles Interesse, Aggression, Stress) auf den Stimulus ist und eine Inhibition der c-Fos-Synthese nicht zwingend für

das Ausbleiben der Demonstration des Wiedererkennungsgedächtnisses im Verhaltenstest verantwortlich sein muss.

4.2.5 Substanzübergreifende Betrachtungen

Während der Akquisition einer „olfaktorischen Signatur“ eines Artgenossen entsteht vermutlich ein spezifisches, topographisches Muster neuronaler Aktivität, eine neuronale Repräsentation der „olfaktorischen Signatur“ des Artgenossen in den beteiligten Hirnarealen, zumindest aber auf der Ebene des *Bulbus olfactorius* (Uchida & Mainen, 2003). Dieses wird bei einer zweiten Präsentation derselben „olfaktorischen Signatur“ möglicherweise erneut aktiviert. Wird dieses spezifische neuronale Aktivierungsmuster während der Akquisition der olfaktorischen Informationen durch die Injektion definierter Substanzen gestört, so kann die Information über die wiederzuerkennende „olfaktorische Signatur“ nicht gespeichert und folglich während des Abrufens nicht mit der erneut präsentierten „olfaktorischen Signatur“ verglichen werden. Resultiert die Injektion der Substanzen während des *Samplings* in einem Ausbleiben der Reduktion der Untersuchungszeit gegenüber J1 während *Choice*, kann demzufolge davon ausgegangen werden, dass kein soziales Gedächtnis für diesen Artgenossen etabliert wurde und der NAME an der Informationsweiterleitung zu Orten der Gedächtnisspeicherung beteiligt und/oder selbst ein Ort dieser ist.

Wird die „olfaktorische Signatur“ jedoch während einer störungsfreien Akquisition/Konsolidierung auf neuronaler Ebene korrekt repräsentiert und gespeichert und werden die Substanzen erst zur Inhibition der Mechanismen während *Choice* eingesetzt, so könnte das Ausbleiben des Diskriminierungsverhaltens mehrere Ursachen haben. Ist das Zielareal maßgeblich an der Speicherung der Informationen beteiligt, so könnte die injizierte Substanz einerseits den Verlust des dort gespeicherten Gedächtnisinhaltes bedingen. Da während *Choice* dieselbe „olfaktorische Signatur“ des J1 zum Vergleich mit der gespeicherten Information erneut präsentiert wird, könnte andererseits dieser Prozess des Abrufens gestört werden. Dies setzt nicht voraus, dass das Gedächtnis für das bekannte J1 nicht mehr existiert, sondern bedeutet vielmehr, dass die erneut präsentierten Informationen nicht richtig weitergeleitet werden und/oder die Mechanismen des Abrufens der gespeicherten Informationen gestört sind, wodurch ein Abgleich beider Informationen nicht mehr möglich ist. Wird im NAME also die neuronale Aktivität während *Choice* inhibiert, so könnte dadurch ein Teil des für den Vergleichszweck zu aktivierenden Musters ausfallen. Dies würde wiederum bedeuten, dass der NAME direkt an der Speicherung der Informationen beteiligt ist und seine Aktivierung dem direkten Abrufen der Informationen entspricht. Alternativ könnte durch die Injektion auch nur

der Informationsfluss durch den NAME hindurch inhibiert werden. Er wäre demzufolge primär an der Weiterleitung und/oder der Verteilung von Informationen in andere Hirnareale beteiligt. Obwohl die Informationen über die „olfaktorische Signatur“ also gespeichert sind, wäre im Falle einer Inhibition der Informationsweiterleitung ein Abrufen nicht möglich.

Diesen Schlussfolgerungen liegt die Annahme der optimalen Funktion und Anwendbarkeit der gewählten Methode zugrunde: Die injizierten Substanzen bewirken eine vollständige und spezifische Inhibition, die ausschließlich auf das Zielareal begrenzt ist, und die Kontrollsubstanz hat weder einen Einfluss auf das Zielareal noch auf angrenzende Hirnareale. Tatsächlich waren diese Voraussetzungen in der vorliegenden Arbeit, wie auch prinzipiell bei derartigen Studien, nicht gegeben.

Da Lidocain die Generierung des aggressiven Verhaltens/Sexualverhaltens unterdrückte, kann nur von dieser Substanz angenommen werden, dass sie eine Inhibition der Neuronenaktivität auslöste. Die Injektion von NaCl-Lösung und Muscimol beeinflusste zwar sowohl das Aggressions- und Sexualverhalten als auch die Diskriminierungsfähigkeit der Versuchstiere, jedoch handelte es sich dabei eher um eine Störung als um eine Inhibition. Anisomycin inhibierte zwar nachweislich die Proteinbiosynthese im NAME, jedoch könnten auch die anderen, oben beschriebenen Wirkungen des Anisomycins eine Störung im Nervengewebe verursacht haben, vergleichbar mit der durch NaCl-Lösung oder Muscimol. Möglich ist einerseits, dass durch die Injektion dieser Substanzen tatsächlich während des Lernens, der Konsolidierung, des Abrufens des Gedächtnisses stattfindende Vorgänge im NAME beeinflusst wurden und dies zu einem Verlust der Diskriminierungsfähigkeit im Verhaltenstest führte. Andererseits kann ebenso nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Substanzen Aktionspotentiale im nicht notwendigerweise an den Gedächtnisvorgängen beteiligten NAME induziert wurden, die weitergeleitet an andere Hirnareale, deren potentiell Gedächtnis-relevante Funktion oder die Verhaltensleistung allgemein beeinflussen und damit stören konnten. Neben den Effekten der Diffusion der Substanzen in andere Hirnareale, können aufgrund dieser methodischen Einschränkungen keine endgültigen Aussagen über die Beteiligung des NAME am sozialen Wiedererkennungsgedächtnis getroffen werden. Einzig die Ergebnisse nach der Injektion von Lidocain ließen Rückschlüsse auf eine Beteiligung des inhibierten Hirnbereiches an den Gedächtnisvorgängen zu.

Wurde Lidocain vor dem *Sampling* bzw. drei Stunden nach dem *Sampling* injiziert, so wurden die störenden Effekte der NaCl-Lösung offenbar kompensiert. Die Informationen der „olfaktorischen Signatur“ konnten trotz der Inhibition der Informationsweiterleitung erfolgreich gelernt und das soziale Gedächtnis konsolidiert und abgerufen werden. In dem inhibier-

ten Bereich des NAME finden demnach während der Akquisition und der Konsolidierung (zumindest drei Stunden nach dem Lernen) keine Gedächtnis-relevanten Prozesse statt. Weder scheint die Informationsweiterleitung durch diesen Hirnbereich zu anderen Hirnarealen zwingend erforderlich, noch scheint die Aktivierung der Neuronen dieses Hirnbereiches ein Teil der neuronalen Repräsentation der „olfaktorischen Signatur“ zu sein, die für die Ausbildung des sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses notwendig ist. Dass Lidocain, direkt vor *Choice* injiziert, die Fähigkeit der Versuchstiere zur sozialen Diskriminierung inhibieren konnte, weist darauf hin, dass die Informationsweiterleitung im Bereich des NAME während des Abrufens notwendig ist. Da der inhibierte Hirnbereich offenbar nicht an der neuronalen Repräsentation und der Speicherung der „olfaktorischen Signatur“ beteiligt ist, scheint die Beteiligung, insbesondere des NAME, während des Abrufens in der Weiterleitung/Verteilung der in anderen Hirnarealen gespeicherten Informationen zu liegen. Denkbar ist aber auch, dass die Speicherung der Informationen im NAME nicht notwendig ist, erfolgt sie dort jedoch (während eines störungsfreien *Samplings*), so werden die gespeicherten Informationen für das Abrufen benötigt.

Da die Versuchstiere, nachdem ihnen Muscimol drei Stunden vor dem *Sampling* injiziert wurde, während *Choice* nicht zwischen J1 und J2 diskriminieren konnten, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass durch diese Behandlung während der Akquisition keine korrekte neuronale Repräsentation der „olfaktorischen Signatur“ des Artgenossen entstanden ist. Die Ergebnisse aus den Lidocain-Experimenten sprechen gegen eine Beteiligung der inhibierten Neuronen (NAME-Neuronen) an der Informationsweiterleitung während des Lernens und der Gedächtniskonsolidierung. Die adäquate Aktivierung von Neuronen anderer beeinflusster Hirnareale während der Akquisition/Konsolidierung scheint daher eine Grundvoraussetzung für die Informationsweiterleitung zu Orten der Gedächtnisspeicherung und/oder aber ein direkter Teil der neuronalen Repräsentation der „olfaktorischen Signatur“ zu sein und damit der Speicherung dieser zu dienen. Wurden die Informationen der „olfaktorischen Signatur“ korrekt gelernt und konsolidiert, so konnte die Fähigkeit der Versuchstiere, J1 wiederzuerkennen, durch die Modulation der Informationsweiterleitung in den beeinflussten Hirnarealen durch Muscimol während *Choice* nicht mehr gestört werden. Interessant ist, dass im Gegensatz dazu die Ergebnisse aus den Lidocain-Injektionsexperimenten auf eine Beteiligung der durch Lidocain beeinflussten Neuronen (NAME-Neuronen) an den Prozessen des Abrufens hinweisen. Möglicherweise wurde nach der Injektion von Muscimol vor *Choice* nur ein Teil der an der neuronalen Musterrepräsentation der bekannten „olfaktorischen Signatur“ beteiligten Neuronen aktiviert bzw. nur ein Teil der benötigten Informationen an weitere Hirnareale

geleitet. Dieser war aber ausreichend, um das Jungtier wiederzuerkennen. Mit anderen Worten: Es wurden, trotz der Störung durch Muscimol, ausreichend Informationen geliefert, um diese mit den gespeicherten Informationen über die „olfaktorische Signatur“ des J1 abzugleichen und damit eine Wiedererkennung zu ermöglichen. Der Einfluss des Muscimols auf die Informationsweiterleitung war offenbar weniger störend als der Einfluss der NaCl-Lösung bzw. des Anisomycins.

Die Ergebnisse der sozialen Diskriminierungstests nach der Injektion von Anisomycin in den NAME lassen darauf schließen, dass durch Anisomycin Prozesse der Informationsverarbeitung gestört wurden, die an der Bildung und dem Abrufen des sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses beteiligt sind. Die Gedächtnis-inhibierende Wirkung des Anisomycins konnte sowohl auf die Unterdrückung der Proteinbiosynthese (auch in anderen Hirnarealen: 4.2.6) als auch auf die genannten anderen Effekte zurückzuführen sein, wodurch die Art seiner Beteiligung mit Hilfe der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig zu klären ist. Eine Gemeinsamkeit zwischen den störenden Effekten des Anisomycins und des Muscimols auf die Akquisition/Konsolidierung könnte jedoch darin bestehen, dass beide Substanzen einen Einfluss auf das noradrenerge System haben. Das GABAerge System, dessen Effekte durch Muscimol imitiert und verstärkt werden, moduliert beispielsweise über noradrenerge Mechanismen die Gedächtnisleistung in einem Test des Vermeidungslernens (Introini-Collison *et al.*, 1994). Der Einfluss von Anisomycin auf noradrenerge Mechanismen und den resultierenden Auswirkungen auf Lern- und Gedächtnisvorgänge wurde bereits diskutiert (4.2.3). Da die systemische Applikation von Anisomycin während *Choice* auch die Proteinbiosynthese im NAME inhibiert (Wanisch *et al.*, 2008), das Wiedererkennungsgedächtnis jedoch nicht mehr blockiert (Richter *et al.*, 2005), scheint die Inhibition der Proteinbiosynthese durch Anisomycin nicht für die Störung des Gedächtnisabrufens verantwortlich zu sein. Daher ist davon auszugehen, dass die Injektion von Anisomycin direkt in den NAME eine Wirkung hat, die sich von der nach systemischer Injektion unterscheidet. Naheliegender ist, dass auch das Abrufen des Gedächtnisinhaltes durch die anderen diskutierten Effekte des Anisomycins gestört wurde.

Die hier vorgestellten Ergebnisse liefern Hinweise dafür, dass die Informationsweiterleitung in dem durch Lidocain beeinflussten Bereich des NAME für die Akquisition und die Konsolidierung des sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses keine notwendige Rolle spielt, eine Bedeutung der Proteinbiosynthese aber nicht ausgeschlossen werden kann. Während des Abrufens des zuvor ohne Störung gelernten Gedächtnisinhaltes ist die adäquate Informationsweiterleitung im Bereich des NAME offenbar essentiell.

Bezüglich der Analyse des Aggressions- und Sexualverhaltens gegenüber den Jungtieren im Verhaltenstest soll hier zudem angemerkt werden, dass den neuronalen Verbindungen zwischen NAME, NIST und APM eine Bedeutung für das Sexualverhalten von männlichen Mäusen zugeschrieben wird (Baum *et al.*, 1994). Nach erfolgreicher Kopulation war die c-Fos-Synthese in diesen Hirnarealen erhöht und c-Fos-*knock-out*-Mäuse zeigten Defizite im Sexualverhalten (Baum *et al.*, 1994). Betrachtet man nun die erhöhte c-Fos-Synthese im NAME nach der Präsentation eines Jungtieres und die Reduktion in der Dauer des Aggressions- und Sexualverhaltens nach den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Injektionen der verschiedenen inhibitorisch wirkenden Substanzen in den NAME, so weisen auch diese Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen der Aktivität des NAME und dem Aggressions- und Sexualverhalten hin. Sowohl für das Sexualverhalten als auch für das Wiedererkennungsgedächtnis ist die Weiterleitung und Verarbeitung sozialer, olfaktorischer Informationen wichtig und könnte die Aktivität von NAME, NIST und APM nach sozialer Stimulation (Sexualpartner, Jungtier) erklären. Baum und Kollegen (1994) vermuteten, dass die Aktivität (c-Fos-Synthese) in diesen Hirnarealen zur Aufrechterhaltung der sexuellen Erregung beiträgt. Vereinbar damit könnte die Verarbeitung olfaktorischer Informationen in diesen Hirnarealen der Motivation/der Aufrechterhaltung sozialen Interesses an einem Artgenossen im Allgemeinen und somit auch im hier durchgeführten Verhaltenstest dienen.

4.2.6 Der Cortex piriformis und das hauptolfaktorische System

Anhand der Inhibition der c-Fos-Synthese im Pir (Abb. 16) konnte zumindest für Anisomycin gezeigt werden, dass die verabreichten Substanzen über größere Distanzen diffundierten und Gewebe außerhalb des NAME erreichten. Obwohl unklar ist, ob die Substanzkonzentration im Pir für eine sich auf das Verhalten auswirkende, funktionelle Inhibition ausreichend war und von einer stärkeren und spezifischeren Inhibition des NAME durch seine Nähe zur Injektionskanüle ausgegangen werden muss, ist eine Beteiligung des Pir, als Teil des HOS, am sozialen Wiedererkennungsgedächtnis wahrscheinlich, wie die folgenden Hinweise aus der Literatur zeigen: Durch die „olfaktorische Signatur“ eines Artgenossen wird, unter anderem auch im Pir, die Synthese des c-Fos-Proteins induziert (Ferguson *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2005). Dies weist auf eine Beteiligung der Neuronen des Pir an der Verarbeitung der „olfaktorischen Signatur“ hin, da die IEG-Expression nicht nur ein reiner Marker für neuronale Aktivität, sondern vielmehr mit Prozessen des Lernens und der Gedächtnisbildung assoziiert ist, die zu lang anhaltenden Veränderungen neuronaler Funktionen führen (siehe: Brennan & Keverne, 1997). Zudem wurde am Goldhamster gezeigt, dass der

entorhinale Kortex, aktiviert durch das HOS - entweder über direkte Afferenzen vom HOB oder über einen indirekten Informationseingang vom Pir - an der individuellen sozialen Wiedererkennung und der NAME vorwiegend an der Klassifizierung des Stimulusgeschlechtes und der Motivation, diesen sexuellen Stimulus zu erreichen, beteiligt ist (Petruilis, 2009).

An männlichen Goldhamstern wurde gezeigt, dass die Unterscheidung zwischen einem neuen und einem bekannten Weibchen im Zusammenhang mit dem Coolidge-Effekt über die Stimulusdetektion durch das Riechepithel und nicht durch das OVN vermittelt wird (Johnston & Rasmussen, 1984). An Mäusen konnte die durch artgleiche und artfremde Stimuli erhöhte c-Fos-Expression im NAME nach einer bilateralen Läsion des OVN nicht mehr beobachtet werden (Pankevich *et al.*, 2006; Samuelsen & Meredith, 2009b). Dennoch waren sowohl diese Tiere als auch Mäuse mit einer bilateralen Läsion des AOB in der Lage, zwischen den volatilen Bestandteilen des Urins männlicher und weiblicher Artgenossen zu diskriminieren (Pankevich *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 2006; Pankevich *et al.*, 2006; Jakupovic *et al.*, 2008). Die Autoren schlussfolgerten, dass diese Teile des AOS nicht für die Unterscheidung des Geschlechtes und des endokrinen Status anhand der volatilen Bestandteile des Urins notwendig sind. Andererseits werden Neuronen des AOB nach direktem Kontakt mit einem Stimulustier selektiv durch das Geschlecht und den Stamm des Stimulustieres aktiviert (Luo *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass die Detektion der nicht-volatilen Komponenten des Urins über das AOS der Motivation dient, die Nähe von Artgenossen zu suchen und damit den direkten Kontakt zwischen den Individuen zu verlängern (Pankevich *et al.*, 2004; Pankevich *et al.*, 2006; Baum & Kelliher, 2009). Über die verstärkte Aufmerksamkeit wird anscheinend die Identifikation des Geschlechtes und des reproduktiven Status des Artgenossen über das HOS erleichtert und gewährleistet damit den reproduktiven Erfolg.

Die Voraussetzung für die Bildung eines Langzeitgedächtnisses für einen Artgenossen könnte aber auch die Integration der von beiden Systemen verarbeiteten Informationen sein. Der NAME ist, durch die intra-amygdaloide Verbindung mit dem NACo aber auch über die direkte Innervation durch den HOB und den AOB, ein Hirnareal mit der Aufgabe der Integration von Signalen des HOS und des AOS (Brennan & Kendrick, 2006; Baum, 2009). Bekannt ist, dass Mäuse die Fähigkeit besitzen, einen Artgenossen ausschließlich über die volatilen Bestandteile der „olfaktorischen Signatur“ wiederzuerkennen (Noack *et al.*, 2010). Wie auch durch die gesamte „olfaktorische Signatur“, wird durch die volatilen Bestandteile die c-Fos-Synthese sowohl im HOB als auch im AOB (Noack *et al.*, 2010) und, wie hier gezeigt, im NAME und im Pir (Abb. 23) induziert, was für eine Einbeziehung beider Systeme in das Wiedererkennungsgedächtnis sprechen könnte. Die Demonstration eines gravierenden Einflusses

von Oxytocin im NAME von Mäusen während der Akquisition der olfaktorischen Informationen in einem Test über das Kurzzeit-Wiedererkennungsgedächtnis für einen Artgenossen (Ferguson *et al.*, 2001) lieferte einen Hinweis für eine herausragende Rolle, die dieses Hirnareal für das soziale Wiedererkennungsgedächtnis spielt. Die vorliegenden Resultate können diese Annahme in Zusammenhang mit dem sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis jedoch nicht bekräftigen. Zumindest während der Akquisition der olfaktorischen Informationen scheint, den Inhibitionsexperimenten mit Lidocain zufolge, die Aktivierung des NAME nicht essentiell für ein erfolgreiches Wiedererkennen zu sein. Hingegen zeigen die Ergebnisse, dass die Inhibition des NAME (und der Neuronen angrenzender Hirnareale) die Generierung von aggressivem Verhalten und/oder von Sexualverhalten verhindert. Zudem war die generelle Untersuchungsdauer gegenüber den Jungtieren während dieser Inhibition vermindert. Die Aktivierung des NAME könnte, wie bereits erwähnt, ein neuronales Korrelat einer emotionalen Reaktion auf den sozialen Stimulus und Bestandteil der neuronalen Steuerung von Motivation, aggressivem Verhalten und/oder Sexualverhalten sein. Es ist also denkbar, dass sich das Anisomycin und möglicherweise auch die im injizierten Hirnbereich pharmakologisch veränderten, neurochemischen Mechanismen über einen Einfluss auf die Funktion des Pir negativ auf das soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis auswirkten.

4.2.7 Beteiligung anderer Hirnareale

Potentielle Mechanismen der Verarbeitung des sozialen Langzeitgedächtnisses von Mäusen in anderen Hirnarealen sind noch nicht eindeutig geklärt, jedoch liegen Hinweise auf folgende Kandidaten vor: Offenbar ist der Hippokampus an der Verarbeitung des sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses beteiligt, da Mäuse mit einer bilateralen Hippokampusläsion nicht zur sozialen Kurzzeit-Wiedererkennung in der Lage waren (Kogan *et al.*, 2000). Zwar konnte im dorsalen Hippokampus nach der Präsentation eines sozialen, olfaktorischen Stimulus keine erhöhte c-Fos-Synthese nachgewiesen werden (Ferguson *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2005), jedoch war sie dort bei OTKO-Mäusen, möglicherweise als kompensatorischer Ausgleich für die Defizite im NAME-System, signifikant erhöht. Letzteres trug jedoch nicht zu einem verbesserten Wiedererkennungsvermögen dieser Tiere bei (Ferguson *et al.*, 2001). Offensichtlich kann weder der NAME noch der Hippokampus den Ausfall des jeweils anderen Hirnareals kompensieren. Offenbar besteht eine für das soziale Wiedererkennungsgedächtnis relevante Verbindung zwischen dem NAME, dem NSL und möglicherweise auch dem Hippokampus, da das in den Neuronen des NAME und des NIST synthetisierte Vasopressin im NSL von Mäusen unabdingbar für die soziale Wiedererkennung ist (Koolhaas *et al.*, 1998; Bielsky

et al., 2005). Ferner wurde gezeigt, dass Vasopressin und Oxytocin im Hippokampus von Ratten eine Rolle für das soziale Kurzzeit-Wiedererkennungsgedächtnis spielen (van Wimersma Greidanus & Maigret, 1996). Für die Erklärung der fehlenden soziale Diskriminierungsfähigkeit der Versuchstiere im Verhaltenstest der vorliegenden Arbeit könnte die Beeinflussung/Störung der Aktivität dieser Hirnareale durch die im injizierten Hirnbereich pharmakologisch induzierten Aktionspotentiale von Bedeutung sein.

4.3 Zukünftige experimentelle Ansätze

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass die Untersuchung der dem sozialen Wiedererkennungsgedächtnis zugrunde liegenden, neurobiologischen Mechanismen auf intra- und interzellulärer Ebene, auf der Ebene lokaler neuronaler Netzwerke und auf überregionaler Ebene der beteiligten Hirnstrukturen zu überraschenden und in neue Denkkonzepte mündenden Befunde führt. Damit bestätigt sich nicht nur die Annahme, dass das Modell der sozialen Diskriminierung einen privilegierten Zugang zu Prozessen des Wiedererkennungsgedächtnisses ermöglicht, sondern auch, dass, ausgehend von den hier vorgestellten Ergebnissen, weitere Studien folgen müssen. Ein Ausblick auf einige dafür notwendige Experimente soll in diesem Abschnitt gegeben werden.

4.3.1 Substanzwahl für Injektionsexperimente

Aufgrund der Erfahrungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bezüglich der schwer bestimmbareren Substanzdiffusion, Inhibitionsdauer und –effektivität gewonnen wurden, müssten in künftigen experimentellen Ansätzen zunächst permanente Läsionen durchgeführt werden. Diese könnten, im Zusammenhang mit dem Verhaltenstest auf die soziale Diskriminierungsfähigkeit, primär Aufschluss über die Beteiligung verschiedener Hirnareale an der Verarbeitung und der Speicherung der sozialen, olfaktorischen Informationen geben. Dies ist besonders interessant für die notwendige Dissoziation der Bedeutung einzelner Hirnareale des HOS und des AOS, wie dem Pir und dem NAME, und auch des Hippokampus für das soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis.

Eine Beteiligung einzelner Hirnareale an verschiedenen zeitlichen Prozessen, also der Akquisition, Konsolidierung und/oder dem Abrufen des Gedächtnisses und die Art ihrer Beteiligung, kann jedoch nur mit temporären, lokalen Inhibitionen geklärt werden. Für diese gilt es, den inhibierten Hirnbereich durch die genaue Analyse der Diffusion zu charakterisieren und durch möglicherweise notwendige Korrekturen der Substanzkonzentrationen und

Injektionsvolumina einzugrenzen. Darüber hinaus müssten zusätzliche Substanzen appliziert werden. Da bereits die NaCl-Lösung einen störenden Effekt auf die zellulären Vorgänge hatte, welcher sich in der Konsequenz negativ auf das Verhalten auswirkte, sollte zukünftig eine Kontrollsubstanz gewählt werden, die keine solchen Effekte bedingt. Auch die bilaterale Injektion von Ringer-Lösung in den Hippokampus von Mäusen hatte einen ähnlich störenden Einfluss auf das soziale Wiedererkennungsgedächtnis (Monique Radscheidt, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg; unveröffentlicht), weshalb auch diese als Kontrollsubstanz ungeeignet ist. Dem extrazellulären Ionenmilieu im Gehirn am ähnlichsten ist künstliche zerebrospinale Flüssigkeit, welche keinen so gravierenden Effekt auf das Ionenmilieu erwarten lässt und sich möglicherweise als geeignet erweist.

Der zukünftige Einsatz von Proteinbiosynthese-Inhibitoren sollte immer mit der Frage verknüpft sein, ob diese die besten experimentellen Mittel zur Untersuchung der temporalen und lokalen Bedeutung der Proteinbiosynthese für das Lernen und die Gedächtnisbildung sind (Bekinschtein *et al.*, 2007; Routtenberg, 2008). Um mit Hilfe der Injektion von Proteinbiosynthese-Inhibitoren, trotz ihrer diffusen Wirkungen, Aussagen über Proteinbiosynthese-abhängige Vorgänge treffen zu können, sollte in Zukunft eine Auswahl verschiedener Inhibitoren injiziert werden. Zwar haben sie alle vielfältige Nebenwirkungen, jedoch besteht ihre Gemeinsamkeit in der Inhibition der Proteinbiosynthese, wodurch gemeinsame Effekte der Substanzen auf diese bezogen werden könnten (Davis & Squire, 1984). Natürlich müsste es das Ziel sein, die genauen intra- und extrazellulären Angriffspunkte der Substanzen zu charakterisieren, um nach ihrem Einsatz auf die Beteiligung verschiedener Systeme an den untersuchten neurobiologischen Vorgängen schließen zu können. Darüber hinaus bleibt zu klären, ob das vor *Choice* injizierte Anisomycin das Abrufen des sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses inhibierte oder ob es einen Verlust des Gedächtnisses für das bekannte Jungtier auslöste. Denkbar wäre diesbezüglich eine dritte vierminütige Exposition entsprechend *Choice* neun Stunden nach der Injektion von Anisomycin, während der dem Versuchstier das bekannte J1 mit einem dritten, unbekanntem Jungtier präsentiert wird.

Eine elegante Möglichkeit der räumlich und zeitlich regulierbaren Inhibition der neuronalen Funktion des NAME könnte die Nutzung konditionaler *Knock-out*-Mäuse im Verhaltenstest sein, bei denen unter einem regionspezifischen Promotor (Zirlinger *et al.*, 2001) beispielsweise die Synthese eines lernrelevanten Moleküls wie CREB oder von Rezeptoren exzitatorischer Neurotransmitter unterdrückt wird. Auch der lokale Einsatz von siRNA gegen die mRNA solcher Moleküle wäre denkbar, birgt aber wiederum eine möglicherweise schwer kontrollierbare Diffusion in sich. Spezifische gentechnische bzw. molekularbiologische

Manipulationen innerhalb verschiedener Neurotransmitter-/Neuromodulatorsysteme könnten darüber hinaus Aufschluss über die Relevanz verschiedener Neuronentypen in bestimmten Hirnarealen für das soziale Wiedererkennungsgedächtnis geben. Naheliegender wäre hier die weitere Untersuchung der Bedeutung des oxytocinergen Systems, vor allem im NAME, für das soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis von Mäusen.

4.3.2 Verhaltensstudien

Mit einem zusätzlichen Test über die Fähigkeit der Versuchstiere, verschiedene volatile Duftstoffe bzw. nicht-soziale Objekte zu diskriminieren, sollte zudem geklärt werden, ob die Substanzinjektionen einen Einfluss auf die Wahrnehmung und Verarbeitung nicht-sozialer, olfaktorischer Stimuli bzw. auf die generelle Entscheidung zwischen bekanntem und unbekanntem Stimulus hat. Zu erwarten ist, dass die Inhibition des NAME zumindest auf die Wahrnehmung nicht-sozialer Duftstoffe keinen Einfluss hat, da die c-Fos-Synthese nach der Präsentation von Carvon im NAME nicht erhöht war (Richter *et al.*, 2005). Derartige Versuche würden jedoch Aufschluss darüber geben, ob das inhibierte Hirnareal tatsächlich ausschließlich an der Verarbeitung der „olfaktorischen Signatur“ eines Artgenossen oder an der Gedächtnisbildung für einen Stimulus, unabhängig von dessen Natur, beteiligt ist.

Außerdem müssten weitere Studien näher untersuchen, worauf die anhand der c-Fos-Synthese nachgewiesene, neuronale Aktivität des NAME nach einer Jungtierexposition zurückzuführen und wofür sie verantwortlich ist. Wie bereits postuliert, könnte die erhöhte c-Fos-Synthese im NAME Bestandteil der emotionalen Reaktion (Stress, Aggression, Furcht) auf den sozialen Stimulus sein und keine Relevanz für die Gedächtnisbildung haben. Denn obwohl die Inhibition der Proteinbiosynthese im NAME und im Pir nicht zu einer signifikanten Reduktion des Aggressions- und Sexualverhaltens führte, so waren diese Verhaltensweisen doch nach der Injektion von Lidocain fast vollständig inhibiert, wohingegen die Akquisition und die Konsolidierung des Wiedererkennungsgedächtnisses unbeeinflusst blieben. In anderen Studien wurde gezeigt, dass der NAME in stressabhängige Aggressionsreaktionen involviert ist (Pawlak *et al.*, 2003; Gammie & Stevenson, 2006) und eine Rolle bei der Verarbeitung von Stress und Angst spielt (Amico *et al.*, 2004; Davern & Head, 2011). Beispielsweise ist die c-Fos-Synthese im NAME nach *Shaker*-Stress (Mantella *et al.*, 2004) oder *Restraint*-Stress (Nomura *et al.*, 2003) verändert, und auch hier scheint das oxytocinerge System regulierend involviert zu sein. Die Vasopressin (V1b)-Rezeptoren und Oxytocin-Rezeptoren im NAME sind zudem von Bedeutung während der Verarbeitung von chronischem Stress (Litvin *et al.*, 2011). Darüber hinaus zeigten weibliche Mäuse, denen

Antisense-Oligonukleotide gegen die Oxytocin-Rezeptor-mRNA in den NAME injiziert wurde, neben der Unfähigkeit zur sozialen Wiedererkennung ein verstärktes Streckverhalten gegenüber einem Stimulustier, welches als Risikobewertung interpretiert wurde und einen Hinweis auf verstärkte Angst dieser Mäuse gegenüber dem sozialen Stimulus lieferte (Choleris *et al.*, 2007). Die Verbindung zwischen dem NAME und dem *Hypothalamus* scheint außerdem wichtig für Reproduktions- und Verteidigungs-Verhaltensweisen zu sein (Canteras, 2002; Choi *et al.*, 2005). Tests zur Untersuchung von Furchtreaktionen bzw. Aggressionen gegenüber Eindringlingen nach einer Manipulation der NAME-Funktion könnten weiteren Aufschluss über die Aufgabe des NAME bei der Verarbeitung dieser Verhaltensweisen geben.

Um die hier präsentierten Ergebnisse zu vervollständigen und herauszufinden, ob und wann die neuronale Aktivität des NAME und des Pir eine notwendige Voraussetzung für das soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis ist, bedürfe es, auch im Zusammenhang mit dem Test im VFC, Inhibitionsexperimenten mit guter lokaler Eingrenzung der entsprechenden Hirnareale. Aufschluss über Mechanismen der Langzeitspeicherung eines sozialen Wiedererkennungsgedächtnisses würde weiterhin der Vergleich zu den Mechanismen bei Ratten geben, da diese im Verhaltenstest nur ein Kurzzeitgedächtnis für Artgenossen generieren und das HOS für die diesbezügliche Informationsverarbeitung keine Rolle zu spielen scheint (Noack *et al.*, 2010). Besonders interessant erscheint diesbezüglich auch die Untersuchung des Einflusses einer bilateralen OVN-Läsion auf die Aktivität verschiedener Hirnareale des HOS und des AOS und im Verhaltenstest auf das soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis.

Für die weitere Untersuchung von möglichen Unterschieden in der Bedeutung der Funktion des NAME (und anderer Hirnareale) für das Kurzzeit- bzw. für das Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis könnten lokale Inhibitionen dieser Hirnareale zu verschiedenen Zeitpunkten während des Verhaltenstests mit kurzem EI eingesetzt und mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit verglichen werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Fähigkeit, Artgenossen individuell wiederzuerkennen, ist eine Grundvoraussetzung für das Zustandekommen komplexer sozialer Verhaltensweisen in Tierpopulationen. Bei Nagern beruht diese soziale Wiedererkennung auf der Aufnahme und Verarbeitung, einschließlich Speicherung und Abrufen von olfaktorischen Informationen über den individuellen Körpergeruch, der „olfaktorischen Signatur“. Unter Laborbedingungen wird das unkonditionierte, soziale Wiedererkennungsgedächtnis mit dem Verhaltenstest auf die soziale Diskriminierung untersucht. Während einer ersten Exposition (*Sampling*) werden die Informationen über die „olfaktorische Signatur“ aufgenommen und gelernt. 24 Stunden später, während einer zweiten Exposition (*Choice*), wird das soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis für Artgenossen getestet, zu dem Mäuse verschiedener Laborstämme in der Lage sind. Wie mehrere Studien belegen, scheinen in die Verarbeitung der „olfaktorischen Signatur“ distinkte Hirnareale des olfaktorischen und des akzessorischen olfaktorischen Systems involviert zu sein – insbesondere aber der *Nucleus amygdalae medialis* (NAME). Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, anhand von bilateralen Injektionen der Substanzen Lidocain, Muscimol und Anisomycin in den NAME zu verschiedenen Zeitpunkten während des Verhaltenstest zu untersuchen, wie (Informationsweiterleitung, Informationsspeicherung) und wann (Akquisition, Konsolidierung, Abrufen) der NAME an den Prozessen des sozialen Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnisses beteiligt ist.

Im Rahmen der Dissertation durchgeführte Vorversuche schufen wichtige Voraussetzungen für die anschließend durchgeführten Hauptversuche. Sie ergaben, dass sowohl männliche als auch weibliche Jungtiere als olfaktorische Stimuli im Verhaltenstest geeignet sind. Weiterhin wurde ermittelt, dass sich die Versuchstiere sieben Tage nach der Implantation von Führungskanülen von der OP erholt hatten und im Verhaltenstest einsetzbar waren. Zudem hatten die Platzierung der Führungskanülen und die Injektionsprozedur keine Auswirkungen auf das Wiedererkennungsgedächtnis der Versuchstiere. Schließlich wurde nachgewiesen, dass die injizierten Substanzen die Zellen des NAME erreichten.

Eine immunhistochemische Analyse zeigte eine erhöhte c-Fos-Synthese sowohl im NAME als auch im *Cortex piriformis* (Pir) nach der Präsentation der volatilen Fraktion der „olfaktorischen Signatur“. Dies wies auf eine Beteiligung dieser beiden Hirnareale während der Verarbeitung olfaktorischer Stimuli hin. Es kann aber nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die c-Fos-Synthese ein neuronales Korrelat für die emotionale Reaktion auf den sozialen Stimulus war und keine Relevanz für das Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis hat.

Bereits die intraamygdaloidale Injektion von NaCl-Lösung, die als Kontrollsubstanz dienen sollte, hatte unter bestimmten Bedingungen einen negativen Effekt auf die Diskriminierungsfähigkeit der Versuchstiere im Verhaltenstest. Scheinbar veränderte die NaCl-Lösung das extrazelluläre Ionenmilieu, wodurch die adäquate Informationsweiterleitung gestört wurde. Muscimol blockierte die Diskriminierungsfähigkeit nur dann, wenn es drei Stunden vor dem *Sampling* injiziert wurde. Es modulierte offenbar die Informationsübertragung, die verbleibende neuronale Aktivität nach der Injektion drei Stunden vor *Choice* schien aber ausreichend, um das Gedächtnis abzurufen. Anisomycin störte die Diskriminierungsfähigkeit in beiden Fällen: nach der Injektion drei Stunden vor dem *Sampling* oder vor *Choice*. Eine Bedeutung der Proteinbiosynthese im beeinflussten Hirnbereich konnte nicht eindeutig ausgeschlossen werden, vor allem da die Injektion von Anisomycin in den NAME auch die Proteinbiosynthese im Pir blockierte. Wahrscheinlich ist, dass Anisomycin lokale neurochemische Mechanismen pharmakologisch verändert. Ähnlich wie die durch die Störung des extrazellulären Ionenmilieus durch NaCl-Lösung bzw. durch die pharmakologischen Effekte (unabhängig von der Wirkung der NaCl-Lösung) des Muscimols erzeugte Änderung der lokalen Informationsweiterleitung, hatte Anisomycin über diese Mechanismen möglicherweise einen störenden Einfluss auf andere Hirnareale und deren potentiell Gedächtnis-relevante Funktion. Aufgrund von Überlegungen und experimentellen Hinweisen bezüglich der genannten methodischen Einschränkungen erschienen die Ergebnisse nach den Injektionen von Lidocain am aussagekräftigsten: Lidocain störte die Diskriminierungsfähigkeit nur dann, wenn es direkt vor *Choice* injiziert wurde. Der durch Lidocain beeinflusste Bereich des NAME scheint demnach nicht während der Akquisition und Konsolidierung, jedoch während des Abrufens der Gedächtnisinhalte an der Informationsweiterleitung essentiell beteiligt zu sein.

6 ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG - ABSTRACT

Individual recognition of conspecifics is a prerequisite for complex behaviours in socially living animals. Rodents use “olfactory signatures” to recognize each other individually. Under laboratory conditions, non-conditioned social recognition memory is investigated with the social discrimination test. This task consists of two sessions. During the first session (sampling), the experimental subject is allowed to acquire the “olfactory signature”. 24 hours later, long-term social recognition memory is tested in a second session (choice). Mice of different laboratory strains are able to form a long-term recognition memory for conspecifics. As described in a number of studies, processing of “olfactory signatures” seems to involve several brain areas linked to both the main and the accessory olfactory system – but in particular the *Nucleus amygdalae medialis* (NAME). The present study was designed to investigate how (propagation and/or processing of signals/information) and when (during acquisition, consolidation, recall) the NAME is involved in social recognition memory. This was intended to be achieved by bilateral injections of lidocaine, muscimol and anisomycin into the NAME at different defined points in time during the social discrimination test.

An initial series of tests proved that important preconditions are given. At first, both male and female juveniles are similarly suitable as stimulus conspecifics. Furthermore, experimental subjects fully recovered from the surgery for the implantation of guide cannulae at postoperative day seven and thus could be used for behavioural testing. Additionally, neither the placement of the guide cannulae nor the injection procedure influenced the recognition memory of the experimental subjects. Finally, the substances injected during the main experiments reached the cells of the NAME.

Moreover, an immunohistochemical analysis revealed an increase of c-Fos synthesis in both the NAME and the *Cortex piriformis* (Pir) after the presentation of the volatile fraction of the “olfactory signature” indicating a role of both brain areas for the processing of olfactory stimuli. This does not rule out the possibility that the c-Fos synthesis is a neuronal correlate for an emotional response upon the social stimulus having no relevance for long-term recognition memory.

Already the injection of the control substance NaCl-solution into the NAME under defined conditions impaired long-term recognition memory. NaCl-solution might have influenced the extracellular ion composition and thus disturbed the adequate propagation of information. The injection of muscimol three hours before sampling impaired long-term recognition memory. Muscimol might have had a modulatory effect upon the propagation of

information, however, the remaining neuronal activity seemed to be sufficient for memory recall after the injection three hours before choice. Anisomycin injection into the NAME both three hours before sampling or three hours before choice impaired long-term recognition memory. One can not exclude the relevance of protein synthesis in the affected brain area, especially as the injection of anisomycin into the NAME also inhibited the protein synthesis in the Pir. Nevertheless, it is more likely that anisomycin pharmacologically influenced local neurochemical mechanisms. Thus, anisomycin, similar to NaCl-solution and muscimol respectively, generated changes in the local propagation of information thereby probably affecting the function of other brain areas relevant for recognition memory. Due to experimental results and theoretical considerations indicating experimental limitations, the data obtained with injections of lidocaine seemed to be the most reliable: Long-term recognition memory was impaired only when lidocaine was injected directly before choice. Thus, the affected area, in particular the NAME, is seemingly not involved in the propagation of signals during the acquisition or consolidation of olfactory information important for recognition memory, but likely to act as an essential relay station for information during recall of long-term social recognition memory.

7 LITERATUR

- Albert DJ & Madryga FJ. (1980). An examination of the functionally effective spread of 4 microliters of slowly infused lidocaine. *Behav Neural Biol* 29, 378-384.
- Allen TA, Narayanan NS, Kholodar-Smith DB, Zhao Y, Laubach M & Brown TH. (2008). Imaging the spread of reversible brain inactivations using fluorescent muscimol. *J Neurosci Methods* 171, 30-38.
- Amico JA, Mantella RC, Vollmer RR & Li X. (2004). Anxiety and stress responses in female oxytocin deficient mice. *J Neuroendocrinol* 16, 319-324.
- Arikan R, Blake NM, Erinjeri JP, Woolsey TA, Giraud L & Highstein SM. (2002). A method to measure the effective spread of focally injected muscimol into the central nervous system with electrophysiology and light microscopy. *J Neurosci Methods* 118, 51-57.
- Aylward EH, Minshew NJ, Goldstein G, Honeycutt NA, Augustine AM, Yates KO, Barta PE & Pearlson GD. (1999). MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. *Neurology* 53, 2145-2150.
- Barbacid M, Fresno M & Vazquez D. (1975). Inhibitors of polypeptide elongation on yeast polysomes. *J Antibiot (Tokyo)* 28, 453-462.
- Barbacid M & Vazquez D. (1974). (3H)anisomycin binding to eukaryotic ribosomes. *J Mol Biol* 84, 603-623.
- Barbacid M & Vazquez D. (1975). Ribosome changes during translation. *J Mol Biol* 93, 449-463.
- Baron-Cohen S, Ring HA, Bullmore ET, Wheelwright S, Ashwin C & Williams SC. (2000). The amygdala theory of autism. *Neurosci Biobehav Rev* 24, 355-364.
- Baum MJ. (2009). Sexual differentiation of pheromone processing: links to male-typical mating behavior and partner preference. *Horm Behav* 55, 579-588.
- Baum MJ, Brown JJ, Kica E, Rubin BS, Johnson RS & Papaioannou VE. (1994). Effect of a null mutation of the c-fos proto-oncogene on sexual behavior of male mice. *Biol Reprod* 50, 1040-1048.
- Baum MJ & Kelliher KR. (2009). Complementary roles of the main and accessory olfactory systems in mammalian mate recognition. *Annu Rev Physiol* 71, 141-160.
- Bebien M, Salinas S, Becamel C, Richard V, Linares L & Hipskind RA. (2003). Immediate-early gene induction by the stresses anisomycin and arsenite in human osteosarcoma cells involves MAPK cascade signaling to Elk-1, CREB and SRF. *Oncogene* 22, 1836-1847.

- Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I & Medina JH. (2007). Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF- dependent phase in the hippocampus. *Neuron* 53, 261-277.
- Bielsky IF, Hu SB, Ren X, Terwilliger EF & Young LJ. (2005). The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study. *Neuron* 47, 503-513.
- Bielsky IF, Hu SB, Szegda KL, Westphal H & Young LJ. (2004). Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 29, 483-493.
- Binns KE & Brennan PA. (2005). Changes in electrophysiological activity in the accessory olfactory bulb and medial amygdala associated with mate recognition in mice. *Eur J Neurosci* 21, 2529-2537.
- Bluthe RM, Gheusi G & Dantzer R. (1993). Gonadal steroids influence the involvement of arginine vasopressin in social recognition in mice. *Psychoneuroendocrinology* 18, 323-335.
- Boehnke SE & Rasmusson DD. (2001). Time course and effective spread of lidocaine and tetrodotoxin delivered via microdialysis: an electrophysiological study in cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 105, 133-141.
- Bowers JM & Alexander BK. (1967). Mice: individual recognition by olfactory cues. *Science* 158, 1208-1210.
- Brennan PA & Kendrick KM. (2006). Mammalian social odours: attraction and individual recognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 2061-2078.
- Brennan PA & Keverne EB. (1997). Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. *Prog Neurobiol* 51, 457-481.
- Brennan PA & Zufall F. (2006). Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 444, 308-315.
- Broad KD, Levy F, Evans G, Kimura T, Keverne EB & Kendrick KM. (1999). Previous maternal experience potentiates the effect of parturition on oxytocin receptor mRNA expression in the paraventricular nucleus. *Eur J Neurosci* 11, 3725-3737.
- Buijs RM, Swaab DF, Dogterom J & van Leeuwen FW. (1978). Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tissue Res* 186, 423-433.
- Bullitt E. (1990). Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 296, 517-530.

- Burman OH & Mendl M. (2000). Short-term social memory in the laboratory rat: its susceptibility to disturbance. *Appl Anim Behav Sci* 67, 241-254.
- Caffe AR & van Leeuwen FW. (1983). Vasopressin-immunoreactive cells in the dorsomedial hypothalamic region, medial amygdaloid nucleus and locus coeruleus of the rat. *Cell Tissue Res* 233, 23-33.
- Caffe AR, van Leeuwen FW & Luiten PG. (1987). Vasopressin cells in the medial amygdala of the rat project to the lateral septum and ventral hippocampus. *J Comp Neurol* 261, 237-252.
- Cammarota M, Bevilacqua LR, Ardenghi P, Paratcha G, Levi de Stein M, Izquierdo I & Medina JH. (2000). Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res Mol Brain Res* 76, 36-46.
- Canal CE, Chang Q & Gold PE. (2007). Amnesia produced by altered release of neurotransmitters after intraamygdala injections of a protein synthesis inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12500-12505.
- Canteras NS. (2002). The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacol Biochem Behav* 71, 481-491.
- Canteras NS, Simerly RB & Swanson LW. (1995). Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* 360, 213-245.
- Carr WJ, Yee L, Gable D & Marasco E. (1976). Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. *J Comp Physiol Psychol* 90, 821-828.
- Chinenov Y & Kerppola TK. (2001). Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 20, 2438-2452.
- Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T & Karin M. (1988). The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 54, 541-552.
- Choi GB, Dong HW, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Swanson LW & Anderson DJ. (2005). Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron* 46, 647-660.
- Choleris E, Gustafsson JA, Korach KS, Muglia LJ, Pfaff DW & Ogawa S. (2003). An estrogen-dependent four-gene micronet regulating social recognition: a study with oxytocin and estrogen receptor-alpha and -beta knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6192-6197.

- Choleris E, Little SR, Mong JA, Puram SV, Langer R & Pfaff DW. (2007). Microparticle-based delivery of oxytocin receptor antisense DNA in the medial amygdala blocks social recognition in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4670-4675.
- Choleris E, Ogawa S, Kavaliers M, Gustafsson JA, Korach KS, Muglia LJ & Pfaff DW. (2006). Involvement of estrogen receptor alpha, beta and oxytocin in social discrimination: A detailed behavioral analysis with knockout female mice. *Genes Brain Behav* 5, 528-539.
- Cohen RP & Hamburg MD. (1975). Evidence for adrenergic neurons in a memory access pathway. *Pharmacol Biochem Behav* 3, 519-523.
- Cooke B, Hegstrom CD, Villeneuve LS & Breedlove SM. (1998). Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 19, 323-362.
- Corcoran KA, Desmond TJ, Frey KA & Maren S. (2005). Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. *J Neurosci* 25, 8978-8987.
- Corcoran KA & Maren S. (2004). Factors regulating the effects of hippocampal inactivation on renewal of conditional fear after extinction. *Learn Mem* 11, 598-603.
- Critchley HD, Daly EM, Bullmore ET, Williams SC, Van Amelsvoort T, Robertson DM, Rowe A, Phillips M, McAlonan G, Howlin P & Murphy DG. (2000). The functional neuroanatomy of social behaviour: changes in cerebral blood flow when people with autistic disorder process facial expressions. *Brain* 123 (Pt 11), 2203-2212.
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H & Watson SJ. (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64, 477-505.
- Curran T & Franza BR, Jr. (1988). Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 55, 395-397.
- Daenen EW, Wolterink G, Gerrits MA & Van Ree JM. (2002). The effects of neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus on social behaviour later in life. *Behav Brain Res* 136, 571-582.
- Dantzer R, Bluthé RM & Kelley KW. (1991). Androgen-dependent vasopressinergic neurotransmission attenuates interleukin-1-induced sickness behavior. *Brain Res* 557, 115-120.
- Dantzer R, Bluthé RM, Koob GF & Le Moal M. (1987). Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. *Psychopharmacology (Berl)* 91, 363-368.

- Dantzer R, Koob GF, Bluthé RM & Le Moal M. (1988). Septal vasopressin modulates social memory in male rats. *Brain Res* 457, 143-147.
- Davern PJ & Head GA. (2011). Role of the medial amygdala in mediating responses to aversive stimuli leading to hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 38, 136-143.
- Davis HP & Squire LR. (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull* 96, 518-559.
- de Vries GJ & Buijs RM. (1983). The origin of the vasopressinergic and oxytocinergic innervation of the rat brain with special reference to the lateral septum. *Brain Res* 273, 307-317.
- de Vries GJ & Miller MA. (1998). Anatomy and function of extrahypothalamic vasopressin systems in the brain. *Prog Brain Res* 119, 3-20.
- Depaulis A & Vergnes M. (1983). Induction of mouse-killing in the rat by intraventricular injection of a GABA-agonist. *Physiol Behav* 30, 383-388.
- Desgranges B, Levy F & Ferreira G. (2008). Anisomycin infusion in amygdala impairs consolidation of odor aversion memory. *Brain Res*.
- Dismukes RK & Rake AV. (1972). Involvement of biogenic amines in memory formation. *Psychopharmacologia* 23, 17-25.
- Dluzen DE & Kreutzberg JD. (1993). 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) disrupts social memory/recognition processes in the male mouse. *Brain Res* 609, 98-102.
- Dragunow M. (1996). A role for immediate-early transcription factors in learning and memory. *Behav Genet* 26, 293-299.
- Dulac C & Torello AT. (2003). Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nat Rev Neurosci* 4, 551-562.
- Ebbinghaus H. (1885). *Über das Gedächtnis: Untersuchungen zur experimentellen Psychologie*. Duncker & Humber, Leipzig.
- Edeline JM, Hars B, Hennevin E & Cotillon N. (2002). Muscimol diffusion after intracerebral microinjections: a reevaluation based on electrophysiological and autoradiographic quantifications. *Neurobiol Learn Mem* 78, 100-124.
- Edwards DR & Mahadevan LC. (1992). Protein synthesis inhibitors differentially superinduce c-fos and c-jun by three distinct mechanisms: lack of evidence for labile repressors. *EMBO J* 11, 2415-2424.
- Eichenbaum H, Yonelinas AP & Ranganath C. (2007). The medial temporal lobe and recognition memory. *Annu Rev Neurosci* 30, 123-152.

- Engelmann M. (2009). Competition between two memory traces for long-term recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 91, 58-65.
- Engelmann M, Hadicke J & Noack J. (2011). Testing declarative memory in laboratory rats and mice using the nonconditioned social discrimination procedure. *Nat Protoc* 6, 1152-1162.
- Engelmann M & Landgraf R. (1994). Microdialysis administration of vasopressin into the septum improves social recognition in Brattleboro rats. *Physiol Behav* 55, 145-149.
- Engelmann M, Wotjak CT & Landgraf R. (1995). Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiol Behav* 58, 315-321.
- Everts HG & Koolhaas JM. (1997). Lateral septal vasopressin in rats: role in social and object recognition? *Brain Res* 760, 1-7.
- Fellini L, Florian C, Courtney J & Roulet P. (2009). Pharmacological intervention of hippocampal CA3 NMDA receptors impairs acquisition and long-term memory retrieval of spatial pattern completion task. *Learn Mem* 16, 387-394.
- Fenton AA & Bures J. (1994). Interhippocampal transfer of place navigation monocularly acquired by rats during unilateral functional ablation of the dorsal hippocampus and visual cortex with lidocaine. *Neuroscience* 58, 481-491.
- Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR & Young LJ. (2001). Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *J Neurosci* 21, 8278-8285.
- Ferguson JN, Young LJ, Hearn EF, Matzuk MM, Insel TR & Winslow JT. (2000). Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nat Genet* 25, 284-288.
- Ferguson JN, Young LJ & Insel TR. (2002). The neuroendocrine basis of social recognition. *Front Neuroendocrinol* 23, 200-224.
- Ferry B, Roozendaal B & McGaugh JL. (1999). Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. *Biol Psychiatry* 46, 1140-1152.
- Flexner LB & Goodman RH. (1975). Studies on memory: inhibitors of protein synthesis also inhibit catecholamine synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 4660-4663.
- Flood JF, Landry DW, Bennett EL & Jarvik ME. (1981). Long-term memory: disruption by inhibitors of protein synthesis and cytoplasmic flow. *Pharmacol Biochem Behav* 15, 289-296.
- Flood JF, Rosenzweig MR, Bennett EL & Orme AE. (1973). The influence of duration of protein synthesis inhibition on memory. *Physiol Behav* 10, 555-562.

- Franklin KBJ & Paxinos G. (1997). The mouse brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press, San Diego, USA*.
- Freedman LS, Judge ME & Quartermain D. (1982). Effects of cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, on mouse brain catecholamine biochemistry. *Pharmacol Biochem Behav* 17, 187-191.
- Gallagher JP, Nakamura J & Shinnick-Gallagher P. (1983). Effects of glial uptake and desensitization on the activity of gamma-aminobutyric acid (GABA) and its analogs at the cat dorsal root ganglion. *J Pharmacol Exp Ther* 226, 876-884.
- Gammie SC & Stevenson SA. (2006). Effects of daily and acute restraint stress during lactation on maternal aggression and behavior in mice. *Stress* 9, 171-180.
- Gheusi G, Bluthé R-M, Goodall G & Dantzer R. (1994). Social and individual recognition in rodents: Methodological aspects and neurobiological bases. *Behavioural Processes* 33, 59-87.
- Gillespie CF, Mintz EM, Marvel CL, Huhman KL & Albers HE. (1997). GABA(A) and GABA(B) agonists and antagonists alter the phase-shifting effects of light when microinjected into the suprachiasmatic region. *Brain Res* 759, 181-189.
- Gold PE. (2006). The many faces of amnesia. *Learn Mem* 13, 506-514.
- Gomez DM & Newman SW. (1992). Differential projections of the anterior and posterior regions of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster. *J Comp Neurol* 317, 195-218.
- Gozzani JL & Izquierdo I. (1976). Possible peripheral adrenergic and central dopaminergic influences in memory consolidation. *Psychopharmacology (Berl)* 49, 109-111.
- Gras-Vincendon A, Bursztejn C & Danion JM. (2008). [Functioning of memory in subjects with autism]. *Encephale* 34, 550-556.
- Greenberg ME & Ziff EB. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene. *Nature* 311, 433-438.
- Halem HA, Cherry JA & Baum MJ. (2001). Central forebrain Fos responses to familiar male odours are attenuated in recently mated female mice. *Eur J Neurosci* 13, 389-399.
- Hammock EA & Young LJ. (2006). Oxytocin, vasopressin and pair bonding: implications for autism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 2187-2198.
- Hazzalin CA, Le Panse R, Cano E & Mahadevan LC. (1998). Anisomycin selectively desensitizes signalling components involved in stress kinase activation and fos and jun induction. *Mol Cell Biol* 18, 1844-1854.

-
- Heldt SA & Ressler KJ. (2007). Forebrain and midbrain distribution of major benzodiazepine-sensitive GABAA receptor subunits in the adult C57 mouse as assessed with in situ hybridization. *Neuroscience* 150, 370-385.
- Herrera DG & Robertson HA. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 50, 83-107.
- Hikosaka O & Wurtz RH. (1985). Modification of saccadic eye movements by GABA-related substances. I. Effect of muscimol and bicuculline in monkey superior colliculus. *J Neurophysiol* 53, 266-291.
- Hille B. (1966). Common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerves. *Nature* 210, 1220-1222.
- Howard MA, Cowell PE, Boucher J, Broks P, Mayes A, Farrant A & Roberts N. (2000). Convergent neuroanatomical and behavioural evidence of an amygdala hypothesis of autism. *Neuroreport* 11, 2931-2935.
- Huff NC & Rudy JW. (2004). The amygdala modulates hippocampus-dependent context memory formation and stores cue-shock associations. *Behav Neurosci* 118, 53-62.
- Huff NC, Wright-Hardesty KJ, Higgins EA, Matus-Amat P & Rudy JW. (2005). Context pre-exposure obscures amygdala modulation of contextual-fear conditioning. *Learn Mem* 12, 456-460.
- Hughes P & Dragunow M. (1995). Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 47, 133-178.
- Hughes P, Lawlor P & Dragunow M. (1992). Basal expression of Fos, Fos-related, Jun, and Krox 24 proteins in rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 13, 355-357.
- Hupe JM, Chouvet G & Bullier J. (1999). Spatial and temporal parameters of cortical inactivation by GABA. *J Neurosci Methods* 86, 129-143.
- Ikeda J, Nakajima T, Osborne OC, Mies G & Nowak TS, Jr. (1994). Coexpression of c-fos and hsp70 mRNAs in gerbil brain after ischemia: induction threshold, distribution and time course evaluated by in situ hybridization. *Brain Res Mol Brain Res* 26, 249-258.
- Insel TR, Young L, Witt DM & Crews D. (1993). Gonadal steroids have paradoxical effects on brain oxytocin receptors. *J Neuroendocrinol* 5, 619-628.
- Introini-Collison IB, Castellano C & McGaugh JL. (1994). Interaction of GABAergic and beta-noradrenergic drugs in the regulation of memory storage. *Behav Neural Biol* 61, 150-155.

- Jakupovic J, Kang N & Baum MJ. (2008). Effect of bilateral accessory olfactory bulb lesions on volatile urinary odor discrimination and investigation as well as mating behavior in male mice. *Physiol Behav* 93, 467-473.
- Jasnow AM & Huhman KL. (2001). Activation of GABA(A) receptors in the amygdala blocks the acquisition and expression of conditioned defeat in Syrian hamsters. *Brain Res* 920, 142-150.
- Johnston GA. (1996). GABAA receptor pharmacology. *Pharmacol Ther* 69, 173-198.
- Johnston RE & Rasmussen K. (1984). Individual recognition of female hamsters by males: role of chemical cues and of the olfactory and vomeronasal systems. *Physiol Behav* 33, 95-104.
- Kang N, Baum MJ & Cherry JA. (2009). A direct main olfactory bulb projection to the 'vomeronasal' amygdala in female mice selectively responds to volatile pheromones from males. *Eur J Neurosci* 29, 624-634.
- Kang N, Baum MJ & Cherry JA. (2011a). Different profiles of main and accessory olfactory bulb mitral/tufted cell projections revealed in mice using an anterograde tracer and a whole-mount, flattened cortex preparation. *Chem Senses* 36, 251-260.
- Kang N, McCarthy EA, Cherry JA & Baum MJ. (2011b). A sex comparison of the anatomy and function of the main olfactory bulb-medial amygdala projection in mice. *Neuroscience* 172, 196-204.
- Keller M, Baum MJ, Brock O, Brennan PA & Bakker J. (2009). The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. *Behav Brain Res* 200, 268-276.
- Keller M, Perrin G, Meurisse M, Ferreira G & Levy F. (2004). Cortical and medial amygdala are both involved in the formation of olfactory offspring memory in sheep. *Eur J Neurosci* 20, 3433-3441.
- Keller M, Pierman S, Douhard Q, Baum MJ & Bakker J. (2006). The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *Eur J Neurosci* 23, 521-530.
- Keller M, Pillon D & Bakker J. (2010). Olfactory systems in mate recognition and sexual behavior. *Vitam Horm* 83, 331-350.
- Kelliher KR. (2007). The combined role of the main olfactory and vomeronasal systems in social communication in mammals. *Horm Behav* 52, 561-570.
- Kevetter GA & Winans SS. (1981a). Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the "vomeronasal amygdala". *J Comp Neurol* 197, 81-98.

- Kevetter GA & Winans SS. (1981b). Connections of the corticomedial amygdala in the golden hamster. II. Efferents of the "olfactory amygdala". *J Comp Neurol* 197, 99-111.
- Kogan JH, Frankland PW & Silva AJ. (2000). Long-term memory underlying hippocampus-dependent social recognition in mice. *Hippocampus* 10, 47-56.
- Koolhaas JM, Everts H, de Ruiter AJ, de Boer SF & Bohus B. (1998). Coping with stress in rats and mice: differential peptidergic modulation of the amygdala-lateral septum complex. *Prog Brain Res* 119, 437-448.
- Krogsgaard-Larsen P & Johnston GA. (1978). Structure-activity studies on the inhibition of GABA binding to rat brain membranes by muscimol and related compounds. *J Neurochem* 30, 1377-1382.
- Landgraf R, Gerstberger R, Montkowski A, Probst JC, Wotjak CT, Holsboer F & Engelmann M. (1995). V1 vasopressin receptor antisense oligodeoxynucleotide into septum reduces vasopressin binding, social discrimination abilities, and anxiety-related behavior in rats. *J Neurosci* 15, 4250-4258.
- Lattal KM & Abel T. (2004). Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4667-4672.
- Le Moal M, Dantzer R, Michaud B & Koob GF. (1987). Centrally injected arginine vasopressin (AVP) facilitates social memory in rats. *Neurosci Lett* 77, 353-359.
- Leinders-Zufall T, Lane AP, Puche AC, Ma W, Novotny MV, Shipley MT & Zufall F. (2000). Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature* 405, 792-796.
- Lewis MC & Gould TJ. (2007). Reversible inactivation of the entorhinal cortex disrupts the establishment and expression of latent inhibition of cued fear conditioning in C57BL/6 mice. *Hippocampus* 17, 462-470.
- Li CS, Kaba H, Saito H & Seto K. (1990). Neural mechanisms underlying the action of primer pheromones in mice. *Neuroscience* 36, 773-778.
- Licht G & Meredith M. (1987). Convergence of main and accessory olfactory pathways onto single neurons in the hamster amygdala. *Exp Brain Res* 69, 7-18.
- Litvin Y, Murakami G & Pfaff DW. (2011). Effects of chronic social defeat on behavioral and neural correlates of sociality: Vasopressin, oxytocin and the vasopressinergic V1b receptor. *Physiol Behav.*
- Luo M, Fee MS & Katz LC. (2003). Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science* 299, 1196-1201.

- Maaswinkel H, Baars AM, Gispen WH & Spruijt BM. (1996). Roles of the basolateral amygdala and hippocampus in social recognition in rats. *Physiol Behav* 60, 55-63.
- Mahadevan LC & Edwards DR. (1991). Signalling and superinduction. *Nature* 349, 747-748.
- Mahadevan LC, Willis AC & Barratt MJ. (1991). Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell* 65, 775-783.
- Malpeli JG. (1999). Reversible inactivation of subcortical sites by drug injection. *J Neurosci Methods* 86, 119-128.
- Malpeli JG & Schiller PH. (1979). A method of reversible inactivation of small regions of brain tissue. *J Neurosci Methods* 1, 143-151.
- Mantella RC, Vollmer RR, Rinaman L, Li X & Amico JA. (2004). Enhanced corticosterone concentrations and attenuated Fos expression in the medial amygdala of female oxytocin knockout mice exposed to psychogenic stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287, R1494-1504.
- Maras PM & Petrulis A. (2008). Functional interactions between sub-regions of the medial amygdala during the processing of sexual odors in male Syrian hamsters. *In: Society for Behavioral Neuroendocrinology XI*.
- Maras PM & Petrulis A. (2010). Anatomical connections between the anterior and posterodorsal sub-regions of the medial amygdala: integration of odor and hormone signals. *Neuroscience* 170, 610-622.
- Maren S, Ferrario CR, Corcoran KA, Desmond TJ & Frey KA. (2003). Protein synthesis in the amygdala, but not the auditory thalamus, is required for consolidation of Pavlovian fear conditioning in rats. *Eur J Neurosci* 18, 3080-3088.
- Markham CM & Huhman KL. (2008). Is the medial amygdala part of the neural circuit modulating conditioned defeat in Syrian hamsters? *Learn Mem* 15, 6-12.
- Markham CM, Taylor SL & Huhman KL. (2010). Role of amygdala and hippocampus in the neural circuit subserving conditioned defeat in Syrian hamsters. *Learn Mem* 17, 109-116.
- Martel KL & Baum MJ. (2007). Sexually dimorphic activation of the accessory, but not the main, olfactory bulb in mice by urinary volatiles. *Eur J Neurosci* 26, 463-475.
- Martel KL & Baum MJ. (2009). A centrifugal pathway to the mouse accessory olfactory bulb from the medial amygdala conveys gender-specific volatile pheromonal signals. *Eur J Neurosci* 29, 368-376.

- Martin JH. (1991). Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neurosci Lett* 127, 160-164.
- Martin JH & Ghez C. (1993). Differential impairments in reaching and grasping produced by local inactivation within the forelimb representation of the motor cortex in the cat. *Exp Brain Res* 94, 429-443.
- Martin JH & Ghez C. (1999). Pharmacological inactivation in the analysis of the central control of movement. *J Neurosci Methods* 86, 145-159.
- Martin SJ, Grimwood PD & Morris RG. (2000). Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 23, 649-711.
- Marwick K & Hall J. (2008). Social cognition in schizophrenia: a review of face processing. *Br Med Bull* 88, 43-58.
- Matochik JA. (1988). Role of the main olfactory system in recognition between individual spiny mice. *Physiol Behav* 42, 217-222.
- Mayes CR, Watts AG, McQueen JK, Fink G & Charlton HM. (1988). Gonadal steroids influence neurophysin II distribution in the forebrain of normal and mutant mice. *Neuroscience* 25, 1013-1022.
- McDonald AJ. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55, 257-332.
- McGaugh JL. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* 27, 1-28.
- McGaugh JL. (2006). Make mild moments memorable: add a little arousal. *Trends Cogn Sci* 10, 345-347.
- McTighe SM, Cowell RA, Winters BD, Bussey TJ & Saksida LM. (2010). Paradoxical false memory for objects after brain damage. *Science* 330, 1408-1410.
- Meredith M. (1991). Sensory processing in the main and accessory olfactory systems: comparisons and contrasts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39, 601-614.
- Meredith M. (1998). Vomeronasal, olfactory, hormonal convergence in the brain. Cooperation or coincidence? *Ann N Y Acad Sci* 855, 349-361.
- Meredith M & Westberry JM. (2004). Distinctive responses in the medial amygdala to same-species and different-species pheromones. *J Neurosci* 24, 5719-5725.
- Middei S, Restivo L, Sgobio C, Passino E & Ammassari-Teule M. (2004). Reversible inactivation of hippocampus and dorsolateral striatum in C57BL/6 and DBA/2 inbred mice failed to show interaction between memory systems in these genotypes. *Behav Brain Res* 154, 527-534.

- Morgan JI & Curran T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci* 14, 421-451.
- Muller J, Corodimas KP, Fridel Z & LeDoux JE. (1997). Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav Neurosci* 111, 683-691.
- Myers RD. (1966). Injection of solutions into cerebral tissue: Relation between volume and diffusion. *Physiology & Behavior* 1, 171-174, IN179.
- Nader K & Einarsson EO. (2010). Memory reconsolidation: an update. *Ann N Y Acad Sci* 1191, 27-41.
- Nader K, Schafe GE & LeDoux JE. (2000). The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci* 1, 216-219.
- Nicholson C. (1985). Diffusion from an injected volume of a substance in brain tissue with arbitrary volume fraction and tortuosity. *Brain Res* 333, 325-329.
- Noack J, Richter K, Laube G, Haghgoo HA, Veh RW & Engelmann M. (2010). Different importance of the volatile and non-volatile fractions of an olfactory signature for individual social recognition in rats versus mice and short-term versus long-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 94, 568-575.
- Nomura M, Saito J, Ueta Y, Muglia LJ, Pfaff DW & Ogawa S. (2003). Enhanced up-regulation of corticotropin-releasing hormone gene expression in response to restraint stress in the hypothalamic paraventricular nucleus of oxytocin gene-deficient male mice. *J Neuroendocrinol* 15, 1054-1061.
- Oliveira AM, Hawk JD, Abel T & Havekes R. (2010). Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learn Mem* 17, 155-160.
- Palacios JM, Wamsley JK & Kuhar MJ. (1981). High affinity GABA receptors- autoradiographic localization. *Brain Res* 222, 285-307.
- Pankevich DE, Baum MJ & Cherry JA. (2004). Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *J Neurosci* 24, 9451-9457.
- Pankevich DE, Cherry JA & Baum MJ. (2006). Effect of vomeronasal organ removal from male mice on their preference for and neural Fos responses to female urinary odors. *Behav Neurosci* 120, 925-936.
- Pawlak R, Magarinos AM, Melchor J, McEwen B & Strickland S. (2003). Tissue plasminogen activator in the amygdala is critical for stress-induced anxiety-like behavior. *Nat Neurosci* 6, 168-174.

- Pereira de Vasconcelos A, Klur S, Muller C, Cosquer B, Lopez J, Certa U & Cassel JC. (2006). Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by tetrodotoxin or lidocaine: a comparative study on cerebral functional activity and motor coordination in the rat. *Neuroscience* 141, 1649-1663.
- Petrulis A. (2009). Neural mechanisms of individual and sexual recognition in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Behav Brain Res* 200, 260-267.
- Pitkänen A. (2000). Connectivity of the rat amygdaloid complex. In: Aggleton, J.P. (ed.) *The Amygdala: a functional analysis*. Oxford University Press, 31-116.
- Popik P, Vetulani J, Bisaga A & van Ree JM. (1991a). Recognition cue in the rat's social memory paradigm. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2, 315-327.
- Popik P, Wolterink G, De Brabander H & van Ree JM. (1991b). Neuropeptides related to [Arg8]vasopressin facilitates social recognition in rats. *Physiol Behav* 49, 1031-1035.
- Power AE, Berlau DJ, McGaugh JL & Steward O. (2006). Anisomycin infused into the hippocampus fails to block "reconsolidation" but impairs extinction: the role of re-exposure duration. *Learn Mem* 13, 27-34.
- Randt CT, Quartermain D, Goldstein M & Anagnoste B. (1971). Norepinephrine biosynthesis inhibition: effects on memory in mice. *Science* 172, 498-499.
- Restrepo D, Arellano J, Oliva AM, Schaefer ML & Lin W. (2004). Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Horm Behav* 46, 247-256.
- Richter K, Wolf G & Engelmann M. (2005). Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. *Learn Mem* 12, 407-413.
- Routtenberg A. (2008). The substrate for long-lasting memory: if not protein synthesis, then what? *Neurobiol Learn Mem* 89, 225-233.
- Routtenberg A & Rekart JL. (2005). Post-translational protein modification as the substrate for long-lasting memory. *Trends Neurosci* 28, 12-19.
- Rudy JW, Biedenkapp JC, Moineau J & Bolding K. (2006). Anisomycin and the reconsolidation hypothesis. *Learn Mem* 13, 1-3.
- Sagar SM, Sharp FR & Curran T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240, 1328-1331.
- Sakamoto T & Endo S. (2010). Amygdala, deep cerebellar nuclei and red nucleus contribute to delay eyeblink conditioning in C57BL /6 mice. *Eur J Neurosci* 32, 1537-1551.
- Sam M, Vora S, Malnic B, Ma W, Novotny MV & Buck LB. (2001). Neuropharmacology. Odorants may arouse instinctive behaviours. *Nature* 412, 142.

- Samuelsen CL & Meredith M. (2009a). Categorization of biologically relevant chemical signals in the medial amygdala. *Brain Res* 1263, 33-42.
- Samuelsen CL & Meredith M. (2009b). The vomeronasal organ is required for the male mouse medial amygdala response to chemical-communication signals, as assessed by immediate early gene expression. *Neuroscience* 164, 1468-1476.
- Samuelsen CL & Meredith M. (2011). Oxytocin antagonist disrupts male mouse medial amygdala response to chemical-communication signals. *Neuroscience* 180, 96-104.
- Sanchez-Andrade G & Kendrick KM. (2009). The main olfactory system and social learning in mammals. *Behav Brain Res* 200, 323-335.
- Sandkuhler J, Maisch B & Zimmermann M. (1987). The use of local anaesthetic microinjections to identify central pathways: a quantitative evaluation of the time course and extent of the neuronal block. *Exp Brain Res* 68, 168-178.
- Sawyer TF, Hengehold AK & Perez WA. (1984). Chemosensory and hormonal mediation of social memory in male rats. *Behav Neurosci* 98, 908-913.
- Scalia F & Winans SS. (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 161, 31-55.
- Schafe GE & LeDoux JE. (2000). Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* 20, RC96.
- Schwende FJ, Wiesler D, Jorgenson JW, Carmack M & Novotny M. (1986). Urinary volatile constituents of the house mouse, *Mus musculus*, and their endocrine dependency. *Journal of Chemical Ecology* 12, 277-296.
- Shafer LM & Slice LW. (2005). Anisomycin induces COX-2 mRNA expression through p38(MAPK) and CREB independent of small GTPases in intestinal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1745, 393-400.
- Sheng M & Greenberg ME. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4, 477-485.
- Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW & Kida S. (1998). CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21, 127-148.
- Simerly RB. (1990). Hormonal control of neuropeptide gene expression in sexually dimorphic olfactory pathways. *Trends Neurosci* 13, 104-110.
- Singh PB, Brown RE & Roser B. (1987). MHC antigens in urine as olfactory recognition cues. *Nature* 327, 161-164.

- Sonnenberg JL, Macgregor-Leon PF, Curran T & Morgan JI. (1989). Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron* 3, 359-365.
- Spehr M, Spehr J, Ukhanov K, Kelliher KR, Leinders-Zufall T & Zufall F. (2006). Parallel processing of social signals by the mammalian main and accessory olfactory systems. *Cell Mol Life Sci* 63, 1476-1484.
- Squire LR & Barondes SH. (1974). Anisomycin, like other inhibitors of cerebral protein synthesis, impairs 'long term' memory of a discrimination task. *Brain Research* 66, 301-308.
- Squire LR, Kuczenski R & Barondes SH. (1974). Tyrosine hydroxylase inhibition by cycloheximide and anisomycin is not responsible for their amnesic effect. *Brain Res* 82, 241-248.
- Squires AS, Peddle R, Milway SJ & Harley CW. (2006). Cytotoxic lesions of the hippocampus do not impair social recognition memory in socially housed rats. *Neurobiol Learn Mem* 85, 95-101.
- Swanson LW & Petrovich GD. (1998). What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21, 323-331.
- Tang J, Ko S, Ding HK, Qiu CS, Calejesan AA & Zhuo M. (2005). Pavlovian fear memory induced by activation in the anterior cingulate cortex. *Mol Pain* 1, 6.
- Taylor GT. (1982). Urinary odors and size protect juvenile laboratory mice from adult male attack. *Dev Psychobiol* 15, 171-186.
- Tehovnik EJ & Sommer MA. (1997). Effective spread and timecourse of neural inactivation caused by lidocaine injection in monkey cerebral cortex. *J Neurosci Methods* 74, 17-26.
- Terranova ML, Laviola G, de Acetis L & Alleva E. (1998). A description of the ontogeny of mouse agonistic behavior. *J Comp Psychol* 112, 3-12.
- Thor DH. (1980). Testosterone and persistence of social investigation in laboratory rats. *J Comp Physiol Psychol* 94, 970-976.
- Thor DH & Holloway WR. (1982). Social memory of the male laboratory rat. *J Comp Physiol Psychol* 96, 1000-1006.
- Tischmeyer W & Grimm R. (1999). Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell Mol Life Sci* 55, 564-574.
- Trinh K & Storm DR. (2003). Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nat Neurosci* 6, 519-525.
- Uchida N & Mainen ZF. (2003). Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. *Nat Neurosci* 6, 1224-1229.

- van Leeuwen F & Caffe R. (1983). Vasopressin-immunoreactive cell bodies in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Cell Tissue Res* 228, 525-534.
- van Wimersma Greidanus TB & Maigret C. (1996). The role of limbic vasopressin and oxytocin in social recognition. *Brain Res* 713, 153-159.
- von Campenhausen H & Mori K. (2000). Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *Eur J Neurosci* 12, 33-46.
- Wanisch K & Wotjak CT. (2008). Time course and efficiency of protein synthesis inhibition following intracerebral and systemic anisomycin treatment. *Neurobiol Learn Mem* 90, 485-494.
- Wanisch K, Wotjak CT & Engelmann M. (2008). Long-lasting second stage of recognition memory consolidation in mice. *Behav Brain Res* 186, 191-196.
- Wersinger SR, Ginns EI, O'Carroll AM, Lolait SJ & Young WS, 3rd. (2002). Vasopressin V1b receptor knockout reduces aggressive behavior in male mice. *Mol Psychiatry* 7, 975-984.
- Wesson DW, Donahou TN, Johnson MO & Wachowiak M. (2008). Sniffing behavior of mice during performance in odor-guided tasks. *Chem Senses* 33, 581-596.
- Wixted JT. (2004). The psychology and neuroscience of forgetting. *Annu Rev Psychol* 55, 235-269.
- Xu F, Schaefer M, Kida I, Schafer J, Liu N, Rothman DL, Hyder F, Restrepo D & Shepherd GM. (2005). Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *J Comp Neurol* 489, 491-500.
- Yilmazer-Hanke DM. (2008). Morphological correlates of emotional and cognitive behaviour: insights from studies on inbred and outbred rodent strains and their crosses. *Behav Pharmacol* 19, 403-434.
- Yilmazer-Hanke DM, Roskoden T, Zilles K & Schwegler H. (2003). Anxiety-related behavior and densities of glutamate, GABAA, acetylcholine and serotonin receptors in the amygdala of seven inbred mouse strains. *Behav Brain Res* 145, 145-159.
- Yonelinas AP. (2001). Components of episodic memory: the contribution of recollection and familiarity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 1363-1374.
- Zirlinger M, Kreiman G & Anderson DJ. (2001). Amygdala-enriched genes identified by microarray technology are restricted to specific amygdaloid subnuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5270-5275.

8 ANHANG

8.1 Materialien

8.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller/Bezugsquelle
2-Methylbutan	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Anisomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex (Kit)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, U.S.A.
biotinylierte Sekundärantikörper (<i>goat anti rabbit</i> IgG, Verdünnung: 1:2000)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, U.S.A.
DAB (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DePeX	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Domitor [®]	Pfizer Pharmacia, Berlin
Einbettmedium	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch
Ethanol (96 %)	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken
Ethanol (100 %)	Zentralapotheke, Uniklinik Magdeburg
Gelatine	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
H ₂ O ₂ (30 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Heparin-Natrium (25000 IE/5 ml)	Ratiopharm GmbH, Ulm
Histoacryl	Aesculap AG, Tuttlingen
Immunmount	Thermo Electron GmbH, Dreieich
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Chemikalien	Hersteller/Bezugsquelle
Ketavet [®] (100 mg/ml)	Pfizer Pharmacia, Berlin
Kresylviolett	Merck KGaA, Darmstadt
Lidocain (Xylocitin [®] -loc 2 %)	Mibe Vertriebsgesellschaft mbH, Jena
Metacam [®] (Meloxicam, 5 mg/ml)	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim/Rhein
Methanol	VWR International GmbH, Darmstadt
Muscimol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Muscimol BODIPY TMR-X	Invitrogen, Eugene, U.S.A.
NaCl-Lösung (0,9 %)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumazid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Natrium-Borhydrid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Natronlauge (NaOH _(aq))	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
primärer Antikörper (<i>rabbit polyclonal IgG c-Fos sc-52</i> , Verdünnung: 1:5000)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, U.S.A.
Rinderserumalbumin (RSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Rompun [®]	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Salzsäure (HCl _(aq))	Merck KGaA, Darmstadt
Sucrose (Saccharose)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TRIS (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Triton-X-100	Ferak Berlin GmbH, Berlin
Xylol	VWR International GmbH, Darmstadt
Ziegennormalserum (ZNS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach

8.1.2 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Zubehör

Verbrauchsmaterialien, Geräte, Zubehör	Hersteller/Bezugsquelle
24-Well-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Augengel (Vidisic)	Dr. Mann Pharma und Bausch & Lomb GmbH, Berlin
Augenstäbchen (Pro-Ophta [®])	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf
Axio Imager.M1	Zeiss, Jena
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Edding (30, geruchsneutral)	Edding International GmbH, Ahrensburg
Einstreu	J. Rettenmayer & Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg
Futter	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Führungskanüle (0,55 x 0,08 x 9,00 mm)	Injecta GmbH, Klingenthal
Injektionskanüle (0,36 x 0,08 x 20,00 mm)	Injecta GmbH, Klingenthal
Insektennadeln (Stärke 0)	Ento Sphinx s.r.o., Pardubitz, Tschechische Republik
Isofluranverdampfer (Isotec 4)	Datex Ohmeda GmbH, Duisburg
Kanüle (23 G)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kaltlichtquelle	A. Krüss Optronik GmbH, Hamburg
Korkplättchen	VWR International GmbH, Darmstadt
Kryostat (Leica CM3050 S)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Kunststoffschlauch (Tygon [®] R3607, Innendurchmesser: 0,19 mm Wandstärke: 0,91 mm)	VWR International GmbH, Darmstadt
Mikroinjektionspumpe	CMA Microdialysis AB, Stockholm, Schweden
Narkosegerät (MLW Medimorph System)	VEB MLW, Leipzig
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Präparationsbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Schrauben (DIN 84, 1,0 x 2,0 mm)	Paul Korth GmbH & Co. KG, Lüdenscheidt

Verbrauchsmaterialien, Geräte, Zubehör	Hersteller/Bezugsquelle
Schüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Skalpellklingen (<i>Feather No. 11</i>)	Pfm Medical AG, Köln
Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Spritzen (Hamilton)	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
stereotaktischer Apparat	TSE Systems GmbH, Bad Homburg
Stieltupfer (Raucotupf)	Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf
SuperFrost [®] Plus-Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Typ II Käfig (Makrolon [®] , 22 x 16 x 14 cm)	E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel
Typ III Käfig (Makrolon [®] , 37 x 21 x 15 cm)	E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel
Ultraschallgerät	Bandelin Electronic GmbH & Co. KG, Berlin
VFC	Eigenbau durch Prof. Dr. M. Engelmann, Magdeburg
Vortex	Scientific Industries, Inc., Bohemia, U.S.A:
Wasserbad	Windaus Labortechnik, Clausthal-Zellerfeld
Zahnbohrer	VEB MLW Dentalfabrik, Treffurt
Zahnzement (lichthärtend, Dual [®] Cement <i>Base & Catalyst</i>)	Ivoclar Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein

8.1.3 Computerprogramme

Computerprogramm	Hersteller/Bezugsquelle
AxioVision (Release 4.8)	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
EVENTLOG (<i>Event Recorder</i> , Version 1.0, 1986)	Design: Robert Hendersen

Computerprogramm	Hersteller/Bezugsquelle
GB-STAT (Version 6.0, 1997)	Dynamic Microsystems, Inc., Silver Spring, U.S.A.
GraphPad Prism (Version 4)	GraphPad Software, Inc., San Diego, U.S.A.
WinRat (Version 2.30, 1995)	Copyright © by Dr.-Ing. H. Barthelmes, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

8.1.4 Puffer, Lösungen

Puffer, Lösungen	Zusammensetzung
Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex-Lösung (in PBS)	0,1 % Kit-Komponente A 0,1 % Kit-Komponente B 0,2 % RSA mindestens 30 Minuten rühren
Formaldehydlösung	4 % PFA in 0,1 M NaPi-Puffer, pH 7,4
gelatinierte Objektträger	0,5 g Gelatine 100 ml Aqua dest. unter Rühren erwärmen Objektträger kurz eintauchen anschließend trocknen lassen
Isofluran-Inhalationsnarkose	2 % Isofluran 100 % Sauerstoff
Kresylviolett	5 g Kresylviolett 100 ml Aqua dest. filtrieren und nach gewünschter Farbintensität verdünnen

Puffer, Lösungen	Zusammensetzung
Lösung für eine tiefe Narkose (OP)	2 ml Ketavet® 0,5 ml Rompun® 7,5 ml NaCl-Lösung
Metacam®-Lösung (0,5 mg/kg Körpergewicht)	0,05 ml Metacam® (0,25 mg Meloxicam) 4 ml NaCl-Lösung
Methanol-H ₂ O ₂ -Lösung	1:1 Methanol:PBS 1 % H ₂ O ₂ (30 %)
NaCl-Heparin-Lösung	1 ml Heparin-Natrium 500 ml NaCl-Lösung
NaCl-Lösung (0,9 % in Aqua dest.)	9 g NaCl/l
NaPi-Puffer (0,1 M in Aqua dest.)	Lösung I: 0,1 M Na ₂ HPO ₄ pH 7,4 einstellen mit: Lösung II: 0,1 M NaH ₂ PO ₄
PBS (nach Veh, in Aqua dest., pH 6,7)	140 mM NaCl 3 mM KCl 10 mM NaH ₂ PO ₄ 5 mM NaOH
RSA-Lösung (in PBS)	0,2 % RSA 0,1 % Triton-X-100 0,1 % Natriumazid
Sucroselösung	1 M in 0,1 M NaPi-Puffer

Puffer, Lösungen	Zusammensetzung
------------------	-----------------

TRIS-Puffer (0,5 M, pH 7,6)

30,25 g TRIS

500 ml Aqua dest.

ZNS-Lösung (in PBS)

10 % Ziegennormalserum

0,3 % Triton-X-100

0,1 % Natriumazid

8.2 Statistik

8.2.1 Injektion von Lidocain versus NaCl-Lösung

8.2.1.1 Randomisierte Block-ANOVA

Injektionszeitpunkt	Faktor	Freiheitsgrade	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
Direkt vor dem <i>Sampling</i>	Behandlung	1, 14	0,2814	0,6041	nein
	Jungtier	1, 14	5,4208	0,0354	ja
	Behandlung x Jungtier	1, 14	5,969	0,0284	ja
3 h nach dem <i>Sampling</i>	Behandlung	1, 13	0,0271	0,8718	nein
	Jungtier	1, 13	8,665	0,0114	ja
	Behandlung x Jungtier	1, 13	3,4458	0,0862	nein
Direkt vor <i>Choice</i>	Behandlung	1, 16	2,3603	0,144	nein
	Jungtier	1, 16	2,9608	0,1046	nein
	Behandlung x Jungtier	1, 16	0,1894	0,6692	nein

8.2.1.2 Einfaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen

Injektionszeitpunkt	Freiheitsgrade	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
Direkt vor dem <i>Sampling</i>	3, 42	3,5293	0,0228	ja
3 h nach dem <i>Sampling</i>	3, 39	2,9759	0,0432	ja
Direkt vor <i>Choice</i>	3, 48	1,8179	0,1565	nein

8.2.2 Injektion von Muscimol versus NaCl-Lösung

8.2.2.1 Randomisierte Block-ANOVA

Injektionszeitpunkt	Faktor	Freiheitsgrade	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
3 h vor dem <i>Sampling</i>	Behandlung	1, 18	0,2223	0,643	nein
	Jungtier	1, 18	6,8487	0,0175	ja
	Behandlung x Jungtier	1, 18	0,1438	0,7089	nein
3 h vor <i>Choice</i>	Behandlung	1, 14	4,0906	0,0627	nein
	Jungtier	1, 14	23,9707	0,0002	ja
	Behandlung x Jungtier	1, 14	0,5055	0,4888	nein

8.2.2.2 Einfaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen

Injektionszeitpunkt	Freiheitsgrade	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
3 h vor dem <i>Sampling</i>	3, 54	1,7081	0,1762	nein
3 h vor <i>Choice</i>	3, 42	8,1905	0,0002	ja

8.2.3 Injektion von Anisomycin versus NaCl-Lösung

8.2.3.1 Randomisierte Block-ANOVA

Injektionszeitpunkt	Faktor	Freiheitsgrade	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
3 h vor dem <i>Sampling</i>	Behandlung	1, 17	1,2849	0,2727	nein
	Jungtier	1, 17	3,7575	0,0694	nein
	Behandlung x Jungtier	1, 17	16,2414	0,0009	ja
3 h vor <i>Choice</i>	Behandlung	1, 16	18,437	0,0006	ja
	Jungtier	1, 16	2,5492	0,1299	nein
	Behandlung x Jungtier	1, 16	2,59743	0,1266	nein

8.2.3.2 Einfaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen

Injektionszeitpunkt	Freiheitsgrade	F-Wert	p-Wert	Signifikanz
3 h vor dem <i>Sampling</i>	3, 51	8,315	0,0001	ja
3 h vor <i>Choice</i>	3, 48	9,7271	< 0,0001	ja

DANKSAGUNG

An dieser Stelle ist es mir eine große Freude all jenen Menschen zu danken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Professor Dr. em. Gerald Wolf und Professor Dr. Klaus-Dieter Fischer gebührt mein Dank für die Möglichkeit, an ihrem Institut (ehemals Institut für Medizinische Neurobiologie, heute Institut für Biochemie und Zellbiologie) meine Experimente durchführen und meine Dissertation schreiben zu dürfen.

Ich danke allen Mitarbeitern für die freundliche Aufnahme im Institut und die angenehme Arbeitsatmosphäre, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ganz besonders großen Dank möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. Mario Engelmann aussprechen. Ich danke ihm für die Vergabe des interessanten Forschungsthemas, dessen Ergebnisse schließlich zu der vorliegenden Dissertation führten. Ohne sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit, seine unzähligen Ratschläge und seine konstruktive Kritik wäre meine Arbeit in ihrer endgültigen Form nicht zustande gekommen. Seine Erfahrungen und sein fundiertes Fachwissen brachten mir in unseren Diskussionen das wissenschaftliche Denken und Handeln näher. Danke für die gemeinsame Zeit, die mich in vielerlei Hinsicht positiv geprägt hat und die mir unvergessen bleiben wird.

Bei PD Dr. Carsten T. Wotjak, Anna Mederer, Dr. Yulia Golub, Dr. Christoph Thöringer und ihren Kollegen vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie bedanke ich mich herzlich dafür, dass sie mich freundlich in München empfingen und die intrazerebrale Implantation von Führungskanülen und Injektion von Substanzen lehrten. Vielen Dank auch für die Diskussion technischer und theoretischer Fragen über meinen Aufenthalt in München hinaus.

Professor Dr. Mike Ludwig und seiner Arbeitsgruppe in Edinburgh danke ich für die Zusammenarbeit, die erfolgreich in gemeinsamen Publikationen mündete.

Für die vielen hilfreichen Tipps bei der Immunhistochemie danke ich Dr. Karin Richter. Ihr, Dr. Peter Kreutzmann und Dr. Kristina Langnäse gebührt mein Dank dafür, dass sie stets ein offenes Ohr für mich hatten und mir mit zahlreichen Ratschlägen fachliche und moralische Unterstützung gaben.

Professor Dr. Gerburg Keilhoff gilt mein Dank für die Beantwortung so mancher Frage während der Beantragung von Fördermitteln für die zahlreichen Dienstreisen, die stets meinen wissenschaftlichen Horizont erweiterten.

Ganz besonders herzlich bedanke ich mich bei Rita Murau für ihre liebenswerte Art und natürlich ihr stetes Engagement bei der Organisation der Versuchstiere, bei den

Verhaltensexperimenten, bei der Histologie und der Immunhistochemie. Ich bedanke mich bei Gudrun Schmidt, die sich um die Haltung und Pflege der Labortiere kümmert. Für die vielen hilfreichen Hinweise im Labor möchte ich den technischen Assistentinnen Irmgard Leschka, Heike Baumann, Regina Dobrowolny, Andrea Mohrmann, Karla Klingenberg und Leona Bück danken.

Herzlicher Dank geht an Julia Czerney und Beate Zörner für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft und ihr Organisationstalent. Sie waren eine große Hilfe bei Anträgen, Verträgen, der Abwicklung von Dienstreiseangelegenheiten, Computerproblemen und Bestellungen. Sie organisierten erlebnisreiche Ausflüge und andere Unternehmungen, die das Miteinander im Institut bereicherten. Vor allem aber leisteten sie so manches Mal moralische Aufbauarbeit.

Ich danke meiner Freundin Nicole Stelzer, die den Duden verinnerlicht hat und sich der mühevollen Aufgabe annahm, meine Dissertation Korrektur zu lesen.

Meinen Kollegen und gleichwohl Freunden, Dr. M. Fahad Haroon, Dr. Kathleen Kupsch, Dr. Gabriella Orlando, Anna Fiedler, Josephine Pinkernelle, Nadine Sündermann und Stefan Wiegand danke ich für geteilte Freude und geteiltes Leid, für Aufmunterungen und Unterstützung und natürlich die grandiosen dienstlichen und außerdienstlichen Erlebnisse, die unsere gemeinsame Zeit des Doktorandendaseins zu einer ganz besonderen machten.

Dr. Ambrin Fatima und Ottó Pintér danke ich dafür, dass ich sie kennen lernen durfte. Ihre ehrlichen Charaktere, ihr Humor, ihre Intelligenz aber vor allem ihre Menschlichkeit und ihr Einfühlungsvermögen lassen mich dankbar sein, sie als meine Freunde bezeichnen zu dürfen.

Meiner Studienfreundin Ines Wolff danke ich für all die gemeinsam erlebten Jahre und für ihre fortwährende Freundschaft.

Tiefer Dank geht an meine liebe Freundin Dr. Anne Gieseler. Ihre Freundschaft und ihre große Empathie in allen Belangen ist eine Bereicherung für mein Leben. Ich danke ihr für ihren Glauben an mich, vor allem dann, wenn er mir fehlte. Es ist schön, dass es Dich gibt!

Mein größter Dank gilt den wichtigsten Menschen in meinem Leben, meinen Eltern Sabine und Walter Noack und meinem Bruder Christian Noack. Ich danke Euch aus tiefstem Herzen für Eure grenzenlose Unterstützung und Eure bedingungslose Liebe.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name	Julia Noack
Geburtsdatum	06.02.1981
Geburtsort	Lauchhammer
Staatsangehörigkeit	deutsch
Adresse	Bernburger Str. 7 39104 Magdeburg
E-Mail-Adresse	julia.noack@med.ovgu.de

Schulische und akademische Ausbildung

1987 – 2000	Grundschule und Gymnasium (Gymnasium Senftenberg); Abschluss: allgemeine Hochschulreife (Abitur)
2000 – 2002	Grundstudium Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main; Abschluss: Vordiplom
2002 – 2006	Hauptstudium Neurobiologie an der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg; Abschluss: Diplom
2005 – 2006	Diplomarbeit am Institut für Medizinische Neurobiologie, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg Thema: Ein organotypisches Zellkulturmodell des Rattenhypothalamus: strukturelle und funktionelle Untersuchungen
2006 – 2011	wissenschaftliche Mitarbeiterin und Promotionsstudentin am ZEBIK und Institut für Biochemie und Zellbiologie (ehemals Institut für Medizinische Neurobiologie), Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg
2006 – 2008	Stipendium des Magdeburger Forschungsverbundes „Neurowissenschaften“ & „Immunologie und molekulare Medizin der Entzündung“

PUBLIKATIONEN

- 1) Roychowdhury S, **Noack J**, Engelmann M, Wolf G & Horn TF. (2006). AMPA receptor-induced intracellular calcium response in the paraventricular nucleus is modulated by nitric oxide: calcium imaging in a hypothalamic organotypic cell culture model. *Nitric Oxide* 14, 290-299.
- 2) Tobin VA, Hashimoto H, Wacker DW, Takayanagi Y, Langnaese K, Caquineau C, **Noack J**, Landgraf R, Onaka T, Leng G, Meddle SL, Engelmann M & Ludwig M. (2010). An intrinsic vasopressin system in the olfactory bulb is involved in social recognition. *Nature* 464, 413-417.
- 3) **Noack J**, Richter K, Laube G, Haghgoo HA, Veh RW & Engelmann M. (2010). Different importance of the volatile and non-volatile fractions of an olfactory signature for individual social recognition in rats versus mice and short-term versus long-term memory. *Neurobiol Learn Mem* 94, 568-575.
- 4) Wacker DW, Tobin VA, **Noack J**, Bishop VR, Duzkiewicz AJ, Engelmann M, Meddle SL & Ludwig M. (2010). Expression of early growth response protein 1 in vasopressin neurones of the rat anterior olfactory nucleus following social odour exposure. *J Physiol* 588, 4705-4717.
- 5) Engelmann M, Hadicke J & **Noack J**. (2011). Testing declarative memory in laboratory rats and mice using the nonconditioned social discrimination procedure. *Nat Protoc* 6, 1152-1162.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zu dem Thema

**Die Konsequenzen temporärer Inhibitionen der *Nuclei amygdalae medialis* auf
das unkontingente, soziale Langzeit-Wiedererkennungsgedächtnis von Mäusen**

selbständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, den 14.10.2011

Julia Noack