

Aus dem Institut für Biochemie und Zellbiologie der
Medizinischen Fakultät der
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Zu den Auswirkungen von Modafinil auf das soziale
Wiedererkennungsgedächtnis und das dopaminerge System der
Maus

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)
an der Medizinischen Fakultät der
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Vorgelegt von Lennart Saß
aus Ludwigslust
Magdeburg 2024

Bibliografische Beschreibung:

Saß, Lennart

Zu den Auswirkungen von Modafinil auf das soziale Wiedererkennungsgedächtnis und das dopaminerge System der Maus. – 2024. – 97 Bl., 49 Abb., 12 Tab., 8 Anl.

Kurzreferat:

Das Wiedererkennen von Artgenossen spielt in der Gedächtnisforschung eine große Rolle. Das Wiedererkennungsgedächtnis, ein Teil des deklarativen Gedächtnisses, wird bei Mäusen vor allem über olfaktorische Reize gebildet. Dabei wird häufig die Zuwendung zum Unbekannten in Verhaltenstests genutzt, so auch im sozialen Diskriminationstest. Modafinil, ein Dopaminwiederaufnahmehemmer, wurde eingesetzt, um Engramme (Gedächtnisspuren) vor dem experimentell provozierten Vergessen zu schützen. Neben den verhaltensexperimentellen Daten wurden auch histologische Daten mittels c-Fos-Immunhistochemie in distinkten Hirnarealen gesammelt, die mit der Informationsverarbeitung für das soziale Wiedererkennungsgedächtnis im Zusammenhang stehen und Teil des zentralnervösen dopaminergen Systems sind. Es folgten Untersuchungen mit Antikörpern des dopaminergen Systems. Die Tyrosinhydroxylase und die D1-Dopaminrezeptoren kamen dafür in Frage. Zusätzlich wurden Hirnschnitte von Tieren ohne und mit Lernerfahrung mittels Fluoreszenzdoppelmarkierungen für c-Fos und Tyrosinhydroxylase hergestellt, um eine postulierte Beteiligung distinkter Teile des dopaminergen Systems für die Generierung der Gedächtnisspur anhand der *De-novo*-Proteinbiosynthese näher zu untersuchen. Sowohl die verhaltensexperimentellen als auch die mittels Immunhistochemie (c-Fos-Synthese) gewonnenen Ergebnisse ließen keine eindeutige Interpretation zu. Verschiedene mögliche Ursachen dafür (unter anderem die Konzentration von Modafinil) werden in der Arbeit diskutiert. Jedoch wurden im Rahmen der Arbeit die Grundlagen für weitere immunhistochemische Analysen für das dopaminerge System und die c-Fos-Synthese gelegt.

Schlüsselwörter

Modafinil, sozialer Diskriminationstest, deklaratives Gedächtnis, c-Fos, Tyrosinhydroxylase, Dopamin, Neuroenhancement

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung.....	6
1.1 Lernen und Gedächtnis	6
1.2 Soziales Gedächtnis in Mäusen	7
1.3 Relevante Hirnareale für die Generierung des sozio-olfaktorischen Gedächtnisses	8
1.4 Die Bedeutung der <i>De-novo</i> -Proteinbiosynthese für das Langzeitgedächtnis 10	
1.5 Dopaminerges System	11
1.6 Neuroenhancement.....	12
1.7 Modafinil	12
1.8 Zielsetzung der Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Tiere und Haltung.....	17
2.2 Herstellung der Placebos	17
2.3 Herstellung der Vera.....	18
2.4 Injektion von Verum und Placebo.....	18
2.5 Sozialer Diskriminationstest.....	19
2.6 Studie 1: Sozialer Diskriminationstest.....	21
2.6.1 Verhaltensversuche	21
2.6.2 Software und Statistik der Verhaltensversuche.....	22
2.7 Studie 2: c-Fos Immunohistochemie.....	23
2.7.1 Gewinnung von Hirnschnitten.....	23
2.7.2 Immunohistochemie und Auswertung.....	24
2.7.3 Software und Statistik der c-Fos-IHC	25
2.8 Studie 3: Dopaminerges System und Zellinduktion.....	26
2.8.1 Doppelfärbungen	26
2.8.2 Dopamin ₁ -Rezeptor-IHC	26
2.8.3 Anti-Tyrosinhydroxylase-IHC.....	26
2.8.4 Fluoreszenzmarkierung von c-Fos-AK und TH-AK..... und direkte Immunfluoreszenz	27
2.8.5 Doppelfärbung fluoreszierender TH-PAK und fluoreszierender c-Fos-SAK 27	
3 Ergebnisse	28
3.1 Studie 1: Sozialer Diskriminationstest.....	28
3.2 Studie 2: C-Fos-Immunohistochemie	35
3.3 Studie 3: Dopaminerges System und Zellinduktion.....	50
3.3.1 Immunhistochemische Färbung des Dopamin ₁ -Rezeptors	50

3.3.2	Immunhistochemischer Nachweis der Tyrosinhydroxylase	51
3.3.3	Fluoreszenzmarkierung von c-Fos und TH mittels PAK	52
3.3.4	Fluoreszenzmarkierung mittels TH-PAK und c-Fos-SAK	53
4	Diskussion	55
4.1	Methodische Überlegungen und Grenzen der Studie	55
4.2	Diskussion der Verhaltensergebnisse	57
4.3	Diskussion der c-Fos-Histologie	60
4.4	Diskussion der Doppelfärbungen	62
4.5	Verhalten und Histologie	62
4.6	Fazit und Ausblick	63
5	Zusammenfassung	65
6	Literaturverzeichnis	67
7	Abbildungsverzeichnis	75
8	Tabellenverzeichnis	76
9	Danksagung	77
10	Eidesstattliche Versicherungen	78
11	Darstellung des Bildungsweges	79
12	Anhang	80
12.1	Herstellung der Injektionslösungen der Verhaltensversuche	80
12.2	Protokoll für die c-Fos-IHC	81
12.3	Protokoll für die D1RD- und TH-IHC	82
12.4	Protokoll Labeling von c-Fos-AK und TH-AK	82
12.5	Protokoll für die c-Fos- und TH-IHC mit fluoreszierenden PAK	83
12.6	Protokoll Fluoreszenz-IHC von c-Fos und TH	84
12.7	Lichtmikroskopische Aufnahmen der D1RD-AK-IHC	85
12.8	Lichtmikroskopische Aufnahmen der TH-AK-IHC	97

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AOB	Akzessorischer Bulbus olfactorius
c-Fos	<i>cellular fibroblast osteogenic sarcoma</i>
DAB	3,3`-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIRD	Dopamin ₁ -Rezeptor
DMSO	Dimethylsulfoxid
IEG	<i>Immediate early gene</i>
IHC	Immunhistochemie
PAK	Primärer Antikörper
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PFC	Präfrontaler Kortex
NaCl	Natriumchlorid
Ncl. acc.	Nucleus accumbens
RT	Raumtemperatur
S	Sampling
SAK	Sekundärer Antikörper
SEM	Standardfehler
SDT	Sozialer Diskriminationstest
snPC	Substantia nigra, pars compacta
ST	Stimulustier
SWG	Soziales Wiedererkennungsgedächtnis
TH	Tyrosinhydroxylase
VNO	Vomeronasales Organ
VT	Versuchstier
VTA	Area tegmentalis ventralis
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Lernen und Gedächtnis

Lernen und Gedächtnis bilden eine untrennbare Einheit. Beim Lernen werden Informationen aufgenommen, verarbeitet und gespeichert, um in ähnlichen Situationen angepasst reagieren zu können. Dabei entscheidet die Qualität der Prozesse des Enkodierens, der Konsolidierung und des Abrufens der relevanten Information über die Gedächtnisqualität (Hoffmann und Engelkamp 2017). Das Gedächtnis ist die Fähigkeit, Information über das Gelernte über verschiedene Zeiträume zu speichern und bei Bedarf adäquat zur Verfügung zu stellen. Gedächtnis kann unterschiedlich klassifiziert werden, zum Beispiel, indem berücksichtigt wird, ob ein „bewusstes“ (explizites) oder „unbewusstes“ (implizites) Abrufen des Gedächtnisinhaltes zu vermuten ist. Im Jahr 1972 beschrieb Endel Tulving die Unterteilung des deklarativen (expliziten) Gedächtnisses in ein semantisches (Faktenwissen) und ein episodisches (autobiografisches) Gedächtnis (Tulving 2002). Zudem gibt es noch die Gedächtniskategorie nicht-deklaratives (implizites) Gedächtnis, welchem unter anderem die prozedurale (z.B. motorisch-koordinatorische) Speicherung von Fertigkeiten zugeordnet wird. Eine andere Gedächtnisklassifikation basiert auf der Berücksichtigung der Dauer, über die ein Gedächtnisinhalt abgerufen werden kann. So können Ultra-kurz-, Kurz-, Mittel- und Langzeitgedächtnis unterschieden werden. Zudem kann die für die Bildung eines (suffizienten) Gedächtnisinhaltes notwendige absolute Anzahl nötiger Wiederholungen von Lernsessions, für die Gedächtnisklassifikation genutzt werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung von explizitem Langzeitgedächtnis, welches durch eine einzige Lernsession gebildet werden sollte. Die Erforschung des Gedächtnisses spielt in den Geistes- und Naturwissenschaften eine zentrale Rolle. Auf die neuroanatomische Zuordnung bestimmter Gedächtnisleistungen wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen. In der Psychologie wurden seit Hermann Ebbinghaus' Selbstversuch (1880) Tests und Modelle zum Erkenntnisgewinn über das Gedächtnis genutzt (Murre und Dros 2015). Es wurden Versuche bei Menschen und Tieren mit Schädigungen in unterschiedlichen Bereichen des Gehirns durchgeführt, um einen Zusammenhang zwischen dem Ort der Schädigung und der daraus resultierenden Psychopathologie/Verhaltensänderung herstellen zu können. Dadurch konnten Tests entwickelt werden, die die Erforschung der normalen Funktionen des Gehirns ermöglichen (Winslow 1860). Zusätzlich ist die Arbeit der Nobelpreisträger Konrad Lorenz, Nikolaas Tinbergen und Karl von Frisch in Bezug auf die Organisation und Auslösung individueller und sozialer

Verhaltensmuster zu nennen. Deren Arbeiten ließen die Übertragung von Erkenntnissen aus Tierexperimenten auf den Menschen zu. Ein inzwischen etabliertes Testmodell bei Labornagern nutzt deren Fähigkeit, ein soziales Wiedererkennungsgedächtnis (SWG) auszubilden, um Rückschlüsse über die neurobiologischen Grundlagen für das deklarative Gedächtnis beim Menschen zu ziehen (Okuyama 2018).

1.2 Soziales Gedächtnis in Mäusen

Das SWG basiert auf der Fähigkeit bestimmter Labornager, zwischen „unbekannten“ und „bekannten“ Artgenossen zu unterscheiden; möglicherweise findet bei Mäusen unter definierten experimentellen Bedingungen sogar ein individuelles Wiedererkennen statt (Thor und Holloway 1982; Camats Perna und Engelmann 2016). Das SWG trägt dazu bei, dass Eltern-Kind-Beziehungen, Verteidigung von Gruppenmitgliedern und das Erkennen von Eindringlingen bei Hausmäusen beobachtet werden kann. Dies ist für sozial lebende Nager, wie Mäuse es sind, ein Selektionsvorteil. Die Fähigkeit zur Unterscheidung von bekannten und unbekanntem Artgenossen und die – in speziellen experimentellen Designs provozierte – daraus resultierende Zuwendung (= soziale Untersuchung: Beschnüffeln, Lecken, Putzen von Artgenossen) zum Unbekannten nutzen mehrere Tests zur Erforschung des SWG und darüber hinaus des deklarativen Gedächtnisses. Das Habituations-Dishabituation-Paradigma ist eines der einfachsten und am weitesten verbreiteten Lern-Gedächtnismodelle, bei dem Artgenossen als wiederzuerkennende Reize genutzt werden können (Arbuckle et al. 2015). Dabei wird einem Versuchstier (VT) ein Stimulustier (ST) repetitiv präsentiert. Während der wiederholten Präsentation des ST findet typischerweise eine sukzessive Verkürzung der Untersuchungszeit durch das VT statt. Zum Abschluss des Tests wird ein zweiter, unbekannter Artgenosse präsentiert. Bei diesem liegt die Untersuchungszeit wieder auf dem Niveau der ursprünglichen Untersuchungszeit. Ein darauf aufbauender, anspruchsvollerer Test zur Untersuchung des SWG stellt der soziale Diskriminationstest (SDT) dar, der als Erweiterung des sozialen Wiedererkennungstests von Thor und Holloway (1982) zu verstehen ist (Engelmann et al. 1995; Engelmann et al. 2011). Der SDT nutzt ebenfalls die Investigationsdauer, mit der das VT ein ST untersucht, als Verhaltensäquivalent für eine Wiedererkennung. Im SDT wird dem VT nach einer Lernsession (Sampling), bei der ein ST präsentiert wurde, in einer Gedächtnisabrufsession (Choice) das bereits präsentierte ST gemeinsam mit einem neuen, bislang nicht eingesetzten ST dargeboten. Es wird postuliert, dass im Choice die Untersuchung des neuen („unbekannten“) ST durch das VT länger dauert als bei dem bereits präsentierten („bekannten“) ST. Durch die „Wahlmöglichkeit“ im letzten Schritt werden deutlich

höhere Anforderungen an das VT gestellt. Dadurch ist dieser Test robuster als das Habituations-Dishabituations-Verfahren hinsichtlich einer möglichen Störung durch verhaltens-, nicht aber gedächtnisrelevanter Stimuli. Der SDT bietet eine Reihe von weiteren Vorteilen. So kann zum Beispiel der Test durch das Einfügen zusätzlicher Expositionen erweitert werden und erlaubt dadurch den experimentellen Zugriff auf Phänomene, die in der Lernpsychologie als „Interferenz“ bekannt sind (Dewar et al. 2007). Dabei wird ein Störelement während der dem Sampling folgenden SWG-Konsolidierungsphase eingeführt. Dieses muss eine gewisse Ähnlichkeit mit dem zu konsolidierenden Stimulus haben, um die Konsolidierung und/oder das Abrufen des vorher gelernten Gedächtnisinhaltes zu stören (Camats Perna und Engelmann 2016). Im Fall des SDT wird vor oder nach dem Sampling ein weiteres ST in gleicher Weise präsentiert (Engelmann 2009). Die Effektivität der Induktion der Interferenz zeigte sich darin, dass die VT im SDT die bereits präsentierten ST nicht signifikant wiedererkannten (Engelmann 2009).

1.3 Relevante Hirnareale für die Generierung des sozio-olfaktorischen Gedächtnisses

Anders als beim Menschen spielt bei vielen Labornagern der olfaktorische Sinn - und hier besonders die Duftstoffverarbeitung durch das vomeronasale Organ (VNO) - neben u.a. akustischem, optischem und Tastsinn, zur Bildung eines SWG eine dominierende Rolle. Über das VNO findet die Aufnahme der Signale für die non-volatile Kommunikation via Pheromone zwischen Artgenossen statt (Camats Perna und Engelmann 2016). Ausgangspunkt sind bipolare Neuronen im sensorischen Epithel in der Nasenscheidewand, wobei die Dendriten dieser Neuronen die Mikrovilli ausbilden (Chamero et al. 2012). Die Axone dieser Neuronen projizieren zum großen Teil in den akzessorischen olfaktorischen Bulbus (AOB) (Martinez-Marcos 2009; Camats Perna und Engelmann 2016) und werden in den vorderen und hinteren Glomeruli umgeschaltet. Eine detailliertere Darstellung der morphologischen Organisation findet sich bei Brignall und Cloutier (2015). Mitralzellen des AOB projizieren in den Hypothalamus und die mediale Amygdala (Martinez-Marcos 2009). Die tertiären Projektionen gehen unter anderem zum entorhinalen Kortex und Hippocampus (Camats Perna und Engelmann 2016). Curtis et al. (2001) zeigten, dass es bei fehlendem VNO bei weiblichen Präriewühlmäusen zu keiner Induktion des Östrus und keinem Einsetzen der Paarungsbereitschaft kam. Jungfräuliche Mäuseweibchen wiesen ein verringertes Apportierverhalten von Jungtieren bei beschädigtem VNO auf (Trouillet et al. 2021). Wegen der dominanten Rolle, die bei Labornagern die Geruchskomponente für das soziale Gedächtnis

und innerartliche Kommunikation spielt, wird in diesem Zusammenhang auch vom sozio-olfaktorischen Gedächtnis gesprochen. Um dieses zu generieren, wird bei der Begegnung mit einem Artgenossen eine neuronale Repräsentation, die „olfaktorische Signatur“, erstellt. Diese ist vermutlich für jedes Individuum einzigartig und steuert letztlich auch das Sozialverhalten (Noack et al. 2010). Die olfaktorische Signatur besteht aber nicht nur aus dem non-volatilen (pheromonalen), sondern auch aus einem volatilen Anteil, der über die Riechschleimhaut und den olfaktorischen Hauptbulbus weitergeleitet wird (Camats Perna und Engelmann 2016). Um diese olfaktorischen Informationen nutzen und das adäquate Verhalten daraus erzeugen zu können, benötigt es höhere neuronale Zentren. Die mediale Amygdala ist eines dieser Zentren und eine wichtige anatomische Struktur zur Ausbildung eines SWG (Noack et al. 2015). Es wird vermutet, dass hier die Signatur unter anderem mit einer emotionalen Komponente verbunden wird. Die mediale Amygdala projiziert zurück in den AOB und moduliert das „Annäherungs-Vermeidungsverhalten“ (Camats Perna und Engelmann 2016). Zum lateralen entorhinalen Kortex laufen Projektionen aus der Amygdala, dem olfaktorischen Hauptbulbus (über den primären olfaktorischen Kortex), dem perirhinalen Kortex, dem Thalamus und noch weiteren Regionen. Weiterhin entspringen dem entorhinalen Kortex seinerseits Projektionen, die zum Hippocampus führen. Dies legt nahe, dass der entorhinale Kortex aufgrund seiner integrativen Funktion einen Teil des sozioolfaktorischen Gedächtnisses generiert. Tatsächlich führt die Zerstörung dieses Hirnareals bei Mäusen zum Verlust des Geruchskurzzeitgedächtnis (Camats Perna und Engelmann 2016). Xing und Kollegen (2021) stellten fest, dass Subpopulationen des medialen präfrontalen Kortex (PFC) und deren Verbindungen zum Nucleus accumbens (Ncl. acc.) ebenfalls essenziell für ein intaktes SWG sind. Ploeger und Kollegen (1991) berichteten, dass es durch pharmakologische Inhibition des Ncl. acc. mittels Ergometrin zu einer Erhöhung der Untersuchungszeit eines schon präsentierten ST kam. In umgekehrter Weise verringerte eine Stimulation des Ncl. acc. mit 3,4-Dihydroxyphenylimino-2-Imidazolin die Untersuchungszeit. Aragona und Kollegen (2006) zeigten, dass das dopaminerge System im Ncl. acc. bei Präriemäusen ebenfalls entscheidend für das Paarbindungsverhalten und die artspezifische soziale Organisation wichtig ist. Auch der mediale PFC spielt eine entscheidende Rolle bei sozialer Interaktion und Wiedererkennen (Park et al. 2021).

1.4 Die Bedeutung der *De-novo*-Proteinbiosynthese für das Langzeitgedächtnis

Obwohl grundsätzlich beobachtbar, ist das sozio-olfaktorische Gedächtnis bei verschiedenen Labornagern bezüglich der Dauer seiner experimentell zugänglichen Abrufbarkeit unterschiedlich ausgeprägt. Anders als bei der Labormaus (*Mus musculus*, Stamm: C57BL/6J01aHsd) ein stabiles sozio-olfaktorisches Langzeitgedächtnis (Camats Perna und Engelmann 2016). Damit die für das soziale Wiedererkennen relevanten Informationen in das Langzeitgedächtnis überführt werden können, scheint eine *De-novo*-Proteinbiosynthese in definierten Hirnarealen erforderlich zu sein (Stork und Welzl 1999). Diese wird unter anderem durch elektrische Membrandepolarisation und chemische Prozesse (cAMP-Signal) oder aber durch Transkriptionsfaktoren wie den *serum response factor* angestoßen (Sheng und Greenberg 1990; Joo et al. 2016). Die sensorisch aufgenommenen Signale führen in der Postsynapse zu einem Kalziumeinstrom. Dieser induziert unter anderem die Expression von *immediate early genes* (IEG). IEG, wie das Protoonkogen *cellular fibroblast osteogenic sarcoma* (c-fos), spielen bei der *De-novo*-Proteinbiosynthese eine große Rolle. Sie sind in ruhenden Zellen nicht oder kaum nachweisbar und werden nach interner oder externer Stimulation sehr schnell transkribiert und translatiert. Grundsätzlich sind IEG-Proteinprodukte instabil und werden manchmal durch das Proteasom ohne vorherige Ubiquitinierung proteolytisch abgebaut (Gomard et al., 2008). Die IEG-Transkripte werden durch die eigene angestoßene Proteinbiosynthese und microRNA reguliert (Bahrami und Drabløs 2016). Die mRNAs der IEG werden schnell, bei c-fos innerhalb von 10–15 min, abgebaut (Sheng und Greenberg 1990). Das IEG c-fos gehört neben FosB, Fra-1 und Fra-2 zur Gruppe der Fos-Transkriptionsfaktoren (Milde-Langosch 2005). Sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Stimuli (Langzeitpotenzierung, Krampfanfall) konnte eine Induktion der Transkription von c-fos beobachtet werden (Flavell und Greenberg 2008). Das c-fos-Gen kodiert für das Fos-Protein, welches zusammen mit dem durch c-Jun, einem weiteren IEG, kodierten Protein, das Aktivator Protein 1 (AP-1) über einen Leucin-Zipper bildet. AP-1 wirkt als Transkriptionsfaktor nach Interaktion mit bestimmten Promotoren oder Enhancer-Regionen vor den zu transkribierenden Teilen der DNA (Chiu et al. 1988). Die IEG induzieren damit eine „zweite Phase“ der Transkription von Genen (Joo et al. 2016). Es wurde gezeigt, dass sowohl die frühe als auch die späte Phase für die Konsolidierung ins Langzeitgedächtnis nötig sind, da diese mit einem Proteinsyntheseinhibitor wie Anisomycin unterbrochen werden konnten und es darunter zu keiner suffizienten Bildung des Langzeitgedächtnisses kam (Frey et al. 1996; Richter et al. 2005; Wanisch et al. 2008).

1.5 Dopaminerges System

Dopamin ist ein Monoamin aus der Gruppe der Katecholamine und spielt eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung im zentralen Nervensystem (ZNS) und darüber hinaus bei der Induktion der c-fos-Transkription. Die Synthese von Dopamin wird zweistufig aus L-Tyrosin mithilfe der Tyrosin-Hydroxylase zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) und weiter über eine aromatische L-Aminosäuredecarboxylase katalysiert. Dopamin wirkt im peripheren Nervensystem unter anderem vasoaktiv. Weiterhin wirkt Dopamin als Neurotransmitter im ZNS, als Inhibitor für Prolaktin, als Synthesevorstufe für Noradrenalin, Adrenalin und auf weitere physiologische Vorgänge auch außerhalb des ZNS. In dieser Arbeit wird Augenmerk auf die ZNS-Wirkung als Neurotransmitter gelegt. Dopaminerge Neuronen befinden sich vor allem im Mittelhirn, genauer im ret-robrubralen Feld, der Substantia nigra pars compacta und der Area tegmentalis ventralis (VTA) (Alikaya et al. 2018). Die Substantia nigra pars compacta integriert dabei ihrerseits exzitatorische Afferenzen aus dem Nucleus subthalamicus, dem medialen PFC, der VTA, aus dem lateralen orbitofrontalen Kortex und lateralen Hypothalamus (Watabe-Uchida et al. 2012; Ogawa und Watabe-Uchida 2018). Weitere Afferenzen für diese dopaminergen Neuronen kommen vor allem aus dem Striatum, dem Pallidum, der Stria terminalis und dem lateralen Kern der Amygdala. Die dopaminergen Neuronen des VTA verschalten weiter auf den Ncl. acc. lateralis und medialis (Beier et al. 2015). Die Substantia nigra pars compacta projiziert mit ihren dopaminergen Neuronen vor allem ins Striatum. Im Ncl. acc. konnte durch die Dopaminwiederaufnahmehemmer ra-CE-123 und S-CE-123 eine Erhöhung der extrazellulären Dopaminkonzentration festgestellt werden (Camats-Perna et al. 2019). Dopamin stabilisiert vermutlich durch die Modulation der synaptischen Aktivität und Signalverstärkung die neuronale Signalübertragung (Shafiei et al. 2019). Zusätzlich entfaltet Dopamin über die nicht-synaptische Freisetzung eine Wirkung auf Gliazellen und Neuronen (Stevenson et al. 2020), indem es deren Sensitivität für andere Neurotransmitter verändert (Wise und Robble 2020). Tatsächlich scheint Dopamin die neuronale Plastizität von dopaminergen Neuronen (burst firing) zu verändern. Zusätzlich scheint es eine Modulation der Reaktion von striatalen, glutamatergen Inputs und GABAergen Outputs durch Dopamin zu geben (Wise und Robble 2020). Dopaminerge Neurone reagieren auf neue, intensive Reize, aber auch auf „Belohnung und Bestrafung“ mit einer Ausschüttung von Dopamin an den Synapsen. Damit könnten sie ein Teil des morphologischen Substrats für die Erzeugung der emotionalen Komponente des Lernens darstellen. Das wird durch Befunde unterstützt, nach denen VT mit Dopaminmangel keine

konditionierten Reflexe mehr lernten und keine neuen Antworten auf definierte Stimuli fanden (Wise und Robble 2020). Die Bedeutung von Dopamin für die Generierung von Emotionen scheint auch bedeutsam für die Entstehung von Sucht, Salienz, Angst, dem Arbeitsgedächtnis und der Bewegungskoordination zu sein (Beier et al. 2015).

1.6 Neuroenhancement

Die Effektivität der Generierung von explizitem Gedächtnis durch Lernen und das Abrufen der Gedächtnisleistung werden maßgeblich durch Konzentrationsfähigkeit, Aufmerksamkeit (Vigilanz) und die emotionale Konnotation dieser mentalen Leistungen bestimmt. Um in diesen Bereichen die individuellen Fähigkeiten zu steigern, wird immer häufiger von Gehirndoping oder Neuroenhancement (engl.: enhancement = Steigerung) gesprochen (Battleday und Brem 2015; Daubner et al. 2021). Neuroenhancement beschreibt den Versuch von mental gesunden Menschen mittels nicht indizierter Psychopharmaka (aber auch mittels invasiver Methoden wie tiefer Hirnstimulation und Gehirnimplantaten) eine Verbesserung der kognitiven, motorischen und sensorischen Hirnfunktionen zu erreichen (Franke und Lieb 2010; Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin 2015). Es besteht dabei aber die Gefahr, dass diese Psychopharmaka Neurotransmittersysteme, darunter das dopaminerge System, so beeinflussen, dass sie zu Sucht und/oder suchtähnlichen Phänomenen führen können. Im DAK-Gesundheitsreport von 2015 werden Neuroenhancern zusätzliche Wirkungen, wie der Abbau von Stress, Angst und Aufregung, zugeschrieben. Die Lebenszeitprävalenz für Neuroenhancement in Deutschland liegt laut diesem DAK-Gesundheitsreport bei 6,7%. Damit stieg die Lebenszeitprävalenz bei Erwerbstätigen im Vergleich zum Gesundheitsreport von 2009 um 2% (Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin 2015). In Amerika schwanken die Zahlen für die Lebenszeitprävalenz für nicht den medizinischen Gebrauch von verschreibungspflichtigen Medikamenten zwischen 5% und 35% (Daubner et al. 2021). Da die Lebenserwartung stetig steigt, gewinnen jedoch Maßnahmen zur Steigerung der Gedächtnisleistung oder solche, die einer Altersdemenz entgegenwirken, besondere gesellschaftliche Bedeutung.

1.7 Modafinil

Das Neuroleptikum Modafinil (Provigil®; 2-[(Diphenylmethyl)sulfinyl]acetamid) ist die Substanz die nach Methylphenidat in den USA am häufigsten für Neuroenhancement genutzt wird (Smith und Farah 2011). In Deutschland ist dieses Mittel seit 2011 nur

noch für die Behandlung von exzessiver Schläfrigkeit im Zusammenhang mit Narkolepsie mit oder ohne Kataplexie zugelassen. Zusätzlich wird es als *Off-label*-Medikament bei Depression und chronischem Erschöpfungssyndrom genutzt (Minzenberg und Carter 2008). In den USA wird es neben der Narkolepsie weiterhin bei starker Tagesschläfrigkeit als Folge des Schichtarbeiter-Syndroms und beim obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom (OSAS) verschrieben (U.S. Food and Drug Administration, FDA). Das Nebenwirkungsprofil von Modafinil ist sehr gering. Selten treten Nebenwirkungen wie Kopf- und Bauchschmerzen, Schwindel oder ein trockener Mund auf. Zudem scheint es keine abhängig machende Wirkung zu geben (Battleday und Brem 2015). Modafinil erhöht direkt die extrazelluläre Dopamin- und Noradrenalin-Konzentration im synaptischen Spalt durch Hemmung des Rücktransports in die Präsynapse (Qu et al. 2008). Durch diesen Effekt werden ebenfalls indirekt die Histamin-, Orexin-, Serotonin- und Glutamatkonzentrationen erhöht und die GABA-Konzentration gesenkt (Minzenberg und Carter 2008). Die gesteigerten extrazellulären Noradrenalin- und Dopaminkonzentrationen im Zusammenspiel mit der Orexin-Hypokretin-Achse führten zu erhöhten Aufmerksamkeits- und Erregungszuständen beim Menschen (Battleday und Brem 2015). Eine der postulierten Wirkungen von Modafinil, die Steigerung der neuronalen Aktivität, konnte in unterschiedlichen Teilen des Kortex nachgewiesen werden (Linda Scoriels et al. 2013). Gozzi und Kollegen (2012) zeigten in ihren Versuchen mit Ratten, dass die Gabe von Modafinil zur Erhöhung des relativen Hirnblutvolumen führt. Diese Erhöhung lässt eine gesteigerte neuronale Aktivität vermuten. Zu den betroffenen Hirnarealen zählten der PFC, der ventrale Hippocampus, das Septum, das Striatum und der Ncl. acc. Weitere Erkenntnisse über die Wirkung von Modafinil konnten mithilfe der funktionellen Magnetresonanztomographie und des Elektroenzephalogramms gewonnen werden. Eine Erhöhung der neuronalen Aktivität des frontoparietalen-dorsalen Aufmerksamkeitsfelds wurde auch im Resting-State-fMRT und im Diffusions-Tensor-MRT nach Modafinilgabe bei Probanden gezeigt (Esposito et al. 2013). Weiterhin konnte mit dem Resting-State-fMRT eine verstärkte funktionelle Konnektivität zwischen der rechten posterioren Insel und dem Putamen sowie dem Gyrus frontalis superior und dem anterioren cingulären Kortex erkannt werden (Cera et al. 2014). Die intravenöse Modafinilinjektion erhöhte bei Ratten, laut Gozzi und Kollegen (2012), das c-Fos-Protein im präfrontalen und cingulären Kortex, dem Septum, dem Striatum und dem Ncl. acc. Mithilfe der Elektroenzephalographie wurden ebenfalls Unterschiede zwischen placebo- und modafinilbehandelten gesunden Menschen dokumentiert. So stieg die Höhe der Alpha-, Beta- und Thetawellen in den parietalen und frontalen Elektroden (Minzenberg et al. 2014). Neben der bildgebenden und der neuropharmakologisch-physiologischen Forschung beschäftigte sich auch die

Psychologie mit dem Thema Gedächtnis im Zusammenhang mit Modafinil (Minzenberg et al. 2008). Dort wurde das Verhalten von Probanden während spezifischer Tests beobachtet und subjektiv beurteilt. (Battleday und Brem 2015) fanden bei ihren Untersuchungen mit einfachen psychologischen Tests keine Veränderungen der Aufmerksamkeit durch Modafinil. Ähnliches galt für die Exekutivfunktionen (Inhibitionskontrolle, Arbeitsgedächtnis). Bei der Überprüfung von Lernen und Gedächtnis zeigten sich einige positive Effekte nach Modafinilbehandlung (Makris et al. 2007), jedoch gab es auch hier kaum signifikante Veränderungen (Müller et al. 2013; Mohamed und Lewis 2014). Bei all diesen Untersuchungen wurden zwar gut validierte, jedoch einfache psychologische Tests angewendet, die ganz bestimmte Unterkategorien des Gedächtnisses in den Fokus nahmen (z. B. die Inhibitionskontrolle als Teil der Exekutivfunktion). Tests, die umfangreiche und komplexe Funktionen überprüften, zeigten ein ganz anderes Bild: Aufmerksamkeit, höhere Exekutivfunktionen sowie Lernen und Gedächtnis waren nach Modafinilgabe verbessert (Battleday und Brem 2015). Unter anderem wurde die *theory of visual attention* (Finke et al. 2010) genutzt, um zielgerichtete Tests für bestimmte Fragestellungen zu entwerfen (Geng et al. 2013). Dabei konnten nach Modafinilgabe Personen mit geringerer Ausgangsleistung ihre Ergebnisse signifikant verbessern. Finke und Kollegen (2010) schließen daraus, dass die Informationsaufnahme und Speicherkapazität in dieser Gruppe durch Modafinil erhöht werden konnte.

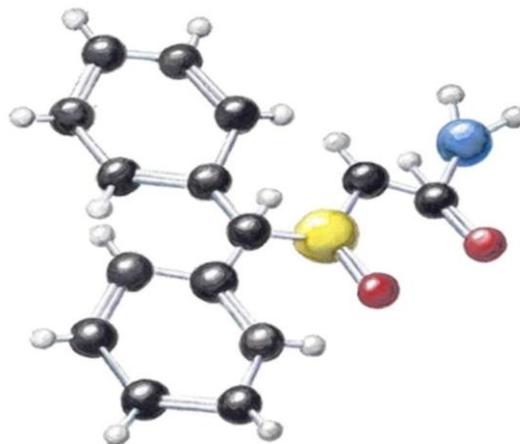


Abbildung 1: Darstellung des Modafinilmoleküls als Kugel-Stab-Modell nach Linda Scoriels, (Linda Scoriels et al., S. 169); weiß = Wasserstoff; schwarz = Kohlenstoff; gelb = Schwefel; blau = Stickstoff; rot = Sauerstoff

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Vor dem hier beschriebenen Hintergrund hatte diese Arbeit das Ziel, die Wirkung von Modafinil auf das deklarative Gedächtnis über das Modell des SDT im Tiermodell zu untersuchen. Modafinil, als bereits zugelassenes Pharmakon, könnte für die Behandlung der älter werdenden Bevölkerung aufgrund seiner potenziell positiven Effekte auf Gedächtnis und Lernen interessant sein. Für die Untersuchung des SWG wurde der SDT nach Engelmann et al. (1995) herangezogen (siehe Kap. 2.5). In diesem Zusammenhang wurden außerdem die *De-novo*-Proteinbiosynthese und das dopaminerge System in distinkten Hirnarealen, die mit dem SWG in Verbindung gebracht werden können, untersucht. So sollte eine Verbindung zwischen den verhaltensexperimentellen Tests und der immunhistochemischen Analyse im Sinne einer bildgebenden Kartierung auf zellulärer Ebene hergestellt werden. Da Analoga, wie rac-CE-123 und S-CE-123, zu einer erfolgreichen Blockierung der retroaktiven (nach der Lernsession) Interferenz führten, konzentrierten wir uns in dieser Studie auf das strukturell nahverwandte Modafinil, da dieses bereits beim Menschen Anwendung findet (Camats-Perna et al. 2019).

Um dies zu erreichen, wurde den VT Modafinil mit Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Koliphor als Vehikel zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach dem Sampling injiziert und das Verhalten im SDT unter den Bedingungen der experimentell erzeugten retroaktiven Interferenz beobachtet. Eine kürzere Untersuchungszeit des im Sampling präsentierten ST während der Choice-Session wurde dabei als Wiedererkennen gewertet. Es wurde erwartet, dass die Provokation einer retroaktiven Hemmung diese Wiedererkennung im Choice unterdrückt (Engelmann 2009). Für die zelluläre Bildgebung wurde mit VT, die zu definierten Zeitpunkten Modafinil oder DMSO erhielten, das Sampling durchgeführt. Anschließend wurden diese VT dekapitiert und von deren Gehirnen 25 µm dicke Frontalschnitte angefertigt. Mithilfe der c-Fos-Immunhistochemie (IHC) wurde die c-fos-Expression in folgenden Hirnarealen quantitativ untersucht: AOB (sowohl Körner- als auch Mitralzellen), Ncl. acc., Striatum und PFC. Das IEG c-Fos wurde dabei als „Aktivitätsmarker“ für neuerliche *De-novo*-Proteinbiosynthese der Zellen in diesen Hirnarealen angesehen, wodurch die aktivierten Hirnareale und Zelltypen identifiziert werden konnten. Um die Wirkung von Modafinil auf das dopaminerge System genauer zu untersuchen, wurden auf weiteren Hirnschnitten verschiedene Antikörper (AK) gegen die Tyrosinhydroxylase (TH) und den Dopamin₁-Rezeptor (D1RD) aufgetragen. Weiterhin wurden die TH-AK weiter modifiziert, um eine Doppelfärbung mit c-Fos zu ermöglichen. Dabei wurden die AK von TH und c-Fos mithilfe eines Labeling Kits an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt und anschließend eine direkte

Immunfluoreszenz-Analyse durchgeführt. Ein weiterer Versuch der Modifizierung stellte die Immunfluoreszenz-Analyse mit einem fluoreszierenden primären Antikörper (PAK) der TH und einem c-Fos-AK gekoppelt an einen fluoreszierenden sekundären Antikörper (SAK) dar. Die Untersuchung sollte zeigen, ob eine Verbindung von TH-markierten Präsynapsen und c-Fos markierten Nuclei von Neuronen erkennbar wird.

2 Material und Methoden

Das Tierschutzgesetz und die damit einhergehenden Auflagen wurden im Rahmen der Durchführung dieser Arbeit im Labor und dem Zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät vollumfänglich beachtet und eingehalten. Darunter fielen insbesondere die Zucht, Haltung und Pflege der Tiere, die vorgenommenen Eingriffe in die Unversehrtheit bis hin zur Tötung der Tiere. Alle Schritte und Einzelheiten der vorliegenden Untersuchungen waren beim Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, bei der zuständigen Veterinärbehörde sowie der Ethikkommission beantragt und sind genehmigt worden (Versuchsvorhaben 42502-2-1365 UniMD & 203.m-42502-2-1660 UniMD; Ausnahme genehmigung für den Autor: 203.m-42501-4-1032_UniMD_Saß_Erw.).

2.1 Tiere und Haltung

Bei den verwendeten Mäusen handelte es sich um Tiere des Stammes C57BL/6J01aHsd. Die VT entstammten der Zucht des Instituts für Biochemie und Zellbiologie der Universität Magdeburg. Die VT waren männlichen Geschlechts und zwischen 10 und 20 Wochen alt. Die ST waren zufällig ausgewählte Jungtiere des gleichen Stamms, 25–35 Tage alt und beiderlei Geschlechts. Alle Tiere wurden im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug 22 °C (± 2 °C), bei einer Luftfeuchtigkeit von 55 % (± 10 %). Außerdem wurde ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden eingeführt und beibehalten. Der Tag bei künstlicher Beleuchtung war definiert von 6 bis 18 Uhr. Die Tiere wurden in Gruppen von drei bis fünf Tieren gehalten. Die Bodenfläche der Gruppenkäfige betrug 806,25 cm² und die des Versuchskäfigs 371,25 cm². Alle Arbeiten wurden unter standardisierten, hygienischen Bedingungen durchgeführt. So wurde im Labor mit Schutzkleidung, Handschuhen, Mundschutz und Haarnetz gearbeitet. Alle Tiere hatten *ad libitum* Zugang zu Wasser und Pellet-Alleinfutter (gammabestrahlt bzw. autoklaviert).

2.2 Herstellung der Placebos

Für die Herstellung des ersten Placebos wurde 20 µl DMSO verwendet. Dafür wurde eine 0,9%ige Natriumchloridlösung schrittweise zugegeben und mithilfe eines Magnetrührers vermischt, bis eine klare, homogene Placebolösung mit einem Gesamtvolumen von 2,5 ml entstand. Als zweites Placebo wurde Kolliphor statt DMSO genutzt, da es immer noch im Verdacht steht neuronale Schäden auszulösen (Hanslick et al. 2008). Kolliphor ist ebenfalls ein amphiphiles Lösungsmittel. Für die Lösung wurden

1 ml Kolliphor und 9 ml Natriumchlorid (NaCl) angesetzt; die hohe Viskosität des Kolliphors erlaubte kein geringeres Volumenverhältnis. Dies geschah unter Verwendung eines Magnetrührers (500 U/min) und bei einer Temperatur 40 °C, bis eine homogene und klare Flüssigkeit entstand. In Kapitel 2.6 wird näher erläutert bei welchen Versuchen welches Placebo verwendet wurde. Die genauen Protokolle zur Herstellung des DMSO-Placebos befindet sich in Kapitel 12.1.

2.3 Herstellung der Vera

Modafinil wurde von der Medizinischen Privatuniversität Paracelsus, Salzburg, Österreich, zur Verfügung gestellt. Das Protokoll zur Herstellung der definierten Vera befindet sich im Anhang (Kap. 12.1). Für die Herstellung eines Verums wurde Modafinil zuerst mit DMSO im definierten Verhältnis vermengt. Unter Sicht wurden beide Stoffe so lange vermischt, bis sich das kristalline Modafinil vollständig aufgelöst hatte und eine klare Flüssigkeit entstand. Danach wurde schrittweise eine sterile NaCl-Lösung hinzugegeben. Unter kontinuierlichem Rühren (500 U/min) und unter gleichbleibender Temperatur von 40 °C konnten 2,5 ml Verum mit der Endkonzentration von 1 mg/ml Modafinil hergestellt werden.

Für das Verum eines weiteren Versuchs wurde Kolliphor statt DMSO verwendet. Dafür wurde ein Teil der bereits in Kapitel 2.2 beschriebenen 10%igen Kolliphorlösung genutzt und damit eine 1 mg/ml Modafinillösung hergestellt. Dies geschah unter Verwendung eines Magnetrührers (500 U/min) bei 50 °C, bis eine homogene, klare Flüssigkeit entstand.

2.4 Injektion von Verum und Placebo

Am Versuchstag wurden die VT am Schwanz aus ihrem Käfig gehoben, dann gewogen und anschließend mit Isofluran (*Baxter International*) in einem Anästhesiegefäß anästhesiert. In dieses Gefäß wurde, nachdem die Mäuse hineingesetzt worden waren, tröpfchenweise Isofluran zugegeben. Die Prozedur fand unter Gasabsaugung statt. Bei erkennbar ruhigen Atembewegungen (ca. 50 Atemzyklen je Minute) wurden die Tiere aus dem Gefäß genommen und auf den Behandlungstisch gelegt. Den noch narkotisierten Tieren wurde entweder Verum oder Placebo verabreicht. Das Volumen der Injektion richtete sich nach dem Gewicht des VT, sodass als Beispiel 10 g Körpergewicht einem Injektionsvolumen von 0,1 ml entsprachen. Für die Verhaltensversuche erfolgte die Verabreichung von Placebo oder Verum hälftig in randomisierter Reihenfolge. Nach dem ersten Versuch waren dann etwa 50 % der Mäuse mit Verum und 50

% mit Placebo behandelt. Für den zweiten Versuch wurde gewechselt, sodass jedes VT einmal mit Verum und einmal mit Placebo behandelt wurde. In einer Tabelle wurden Versuchstiernummer, Körpergewicht des VT, das Volumen der Injektion, sowie Placebo- oder Verumgabe vermerkt. Vor der Injektion wurden die Lösungen mit Verum und Placebo mit einer Heizdecke auf 37 °C erwärmt, um sie möglichst genau an die durchschnittliche Körpertemperatur einer Maus von 36,6 °C anzupassen (Doss und Ohnesorge 1966). In den Versuchen, in denen mit DMSO gearbeitet wurde, wurden Placebo und Verum subkutan (s. c.) in die Nackenfalte injiziert. Kolliphor ist deutlich visköser und wird laut Vorversuchen (F. Kopel, mündliche Mitteilung) subkutan langsamer resorbiert als DMSO, weswegen die Applikation der Kolliphorlösungen intraperitoneal (i. p.) erfolgte. Die Injektion wurde dann an der Grenze zwischen beiden rechten Quadranten des Bauchs durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, langsam zu injizieren, da Kolliphor ein hochvisköser Stoff ist. Nach der Injektion wurden die noch betäubten VT wieder zurück in ihre bekannten Versuchskäfige gesetzt. Die dann erfolgte kurze Aufwachphase wurde von einem Beobachter überwacht. Der Abstand zwischen den Injektionen der einzelnen VT betrug fünf Minuten, da pro VT im SDT vier Minuten Testzeit und eine Minute Zeit zum Umsetzen der Tiere, Narkose und Injektion benötigt wurden.

2.5 Sozialer Diskriminationstest

Der hier beschriebene SDT orientiert sich an der Arbeit von Engelmann und Kollegen (1995). Zur Vorbereitung wurden die VT zwei Stunden vor dem Beginn des Tests aus ihren Gruppenkäfigen gehoben und in kleinere Versuchseinzelkäfige gesetzt. Gleichzeitig wurden die ST in separaten Einzelkäfigen isoliert. Während des Versuchs wurde das Verhalten der Tiere durch einen geschulten Beobachter, welcher keine Kenntnis von der Art der Behandlung (Placebo oder Verum) hatte, beurteilt. Der Test begann mit dem Zusammensetzen des ST zum VT. Sobald das ST im Versuchseinzelkäfig des VT war, startete das „Sampling“. Nun begann eine vierminütige Beobachtung des Verhaltens des VT in Bezug zum ST. Ein Beobachter erfasste mittels einer Software (*Eventlog*) die Beobachtungen. Es wurden folgende zwei Verhaltenskategorien definiert: „Aggressivität und Sexualverhalten“ und „Untersuchen des ST“. „Aggressivität“ wurde als konkret beobachtbares Verhalten klassifiziert, nämlich Bisse und aggressive Verfolgung des ST durch das VT. Als „Sexualverhalten“ wurden offensichtliche Paarungsversuche durch das VT gewertet, z. B. das Aufreiten auf das ST. Das „Untersuchen des ST“ wurde als direkter Kontakt der Schnauze des VT am Körper des ST und dabei schnelle, verstärkte Flankenbewegungen des VT (Schnüffeln, Beschnuppeln) definiert.

Nach vier Minuten beendete die Software die Aufzeichnung automatisch und gewährleistet somit einheitliche Untersuchungszeiten. Das ST wurde daraufhin wieder in seinen Einzelkäfig gesetzt, sodass beide Tiere sich wieder getrennt voneinander befanden.

Eine Erweiterung des Tests stellte die Einführung einer „Interferenz“ dar. Diese begann drei Stunden nach Beginn des Samplings (induziert wurde retroaktive Interferenz). Dem VT wurde zu diesem Zeitpunkt ein bisher unbekanntes ST für 4 Minuten im Käfig dargeboten. Auch in dieser Exposition wurde das VT-Verhalten (wie beschrieben) dokumentiert.

Vierundzwanzig Stunden nach dem Sampling (21 h nach Interferenz) erfolgte der Choice-Test des SDT. Dabei wurden zum VT zwei ST simultan in den Käfig gesetzt. Ein ST war dem VT schon im Sampling präsentiert worden (= bekanntes ST). Das zweite ST war ein neues, dem VT weder in Sampling noch Interferenz präsentiertes ST (= unbekanntes ST). Der Beobachter erfasste nun, übereinstimmend mit dem Sampling- und Interferenzuntersuchungsabschnitt, die verschiedenen Verhaltenskategorien. Nach vier Minuten wurden die ST wieder aus dem Käfig des VT genommen. Sowohl ST als auch VT wurden anschließend in ihre Gruppenkäfige gesetzt, da das Langzeitgedächtnis und das Sozialverhalten in Einzelhaltung leidet (Engelmann et al. 2011). Die **Abbildung 2** zeigt den prinzipiellen Ablauf dieses Tests.

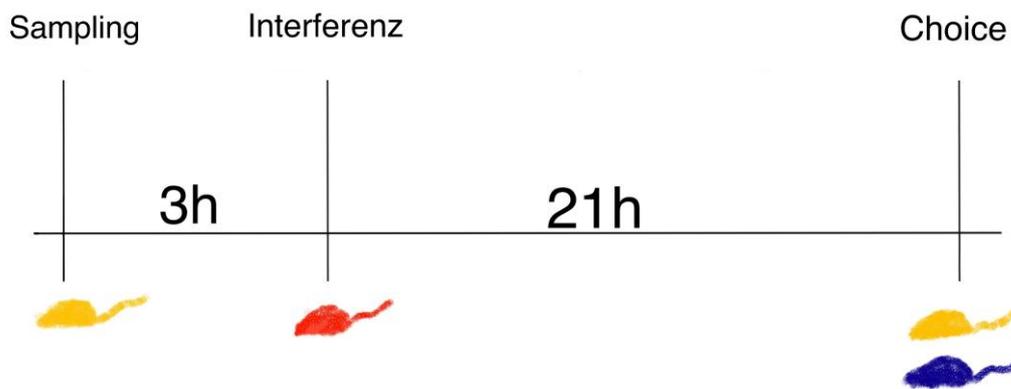


Abbildung 2: Darstellung des Ablaufs des sozialen Diskriminationstests mit Interferenz. Die unterschiedlichen Farben stellen unterschiedliche ST dar, die dem VT dargeboten wurden: gelb = „bekanntes“ ST, präsentiert während Sampling und Choice; rot = Interferenz-ST, nur während der Interferenz präsentiert; blau = neues, „unbekanntes“ ST, präsentiert nur während Choice

2.6 Studie 1: Sozialer Diskriminationstest

2.6.1 Verhaltensversuche

In der ersten Studie wurden drei Verhaltensversuche durchgeführt. Der Begriff „Versuch“ beschreibt in dieser Arbeit immer einen neuen Zeitpunkt der Injektion von Placebo oder Verum in Abhängigkeit vom Sampling. Die bereits beschriebene Durchführung änderte sich nur im letzten hier dargestellten Versuch (Versuch C). Dabei wurde, wie bereits beschrieben, Kolliphor statt DMSO verwendet. Alle neuen VT wurden zur Kontrolle vor den eigentlichen Versuchen getestet. Dabei durchliefen sie als Vortest den SDT, der ohne Interferenz und ohne Behandlung stattfand. Es wurde dabei vor allem auf aggressives Verhalten der VT geachtet, sodass besonders aggressive Tiere von den eigentlichen Versuchen ausgeschlossen wurden. Weiterhin sollten die VT in diesem Vortest auf ihre Gedächtnisleistung getestet werden. Es wurde erwartet, dass die VT im SDT ohne Interferenz das bekannte ST „wiedererkannten“. Die VT, die „wiedererkannt“ hatten, wurden einem weiteren Vortest in Form eines SDT mit Interferenz ohne zusätzliche Behandlung unterzogen. Es wurde erwartet, dass unter diesen Bedingungen das bekannte ST von dem VT nicht „wiedererkannt“ wurde. Nach diesen beiden Vortests wurden vier VT nicht für die weiteren Versuche eingesetzt, sodass insgesamt noch 22 VT in den Versuchen verblieben. In allen Versuchen wurden daraufhin zwei Gruppen mit jeweils 11 Tieren pro Gruppe verwendet. Bei den Versuchen mit Injektionen kam das balancierte Überkreuzmodell zum Einsatz. Das bedeutet, dass denselben Tieren, die im Versuch Placebo erhielten, eine Woche später im gleichen Versuch Verum injiziert wurde und *vice versa*. Laut Engelmann und Kollegen (2011) reicht ein Abstand von sieben Tagen zwischen zwei Versuchen aus, um mögliche vorherige Behandlungseffekte auszuschließen. Da in den Verhaltensexperimenten jedes VT sowohl Placebo als auch Verum erhielt und damit intern als „Kontrolle“ fungierte, konnte die Anzahl der VT auf 50 % im Vergleich zu denkbaren Experimenten, in denen zwei unabhängige Tiergruppen behandelt worden wären, verringert werden. Ein kompletter Durchlauf der Versuche dauerte aufgrund der laboreigenen Gegebenheiten vier Wochen, da jede Gruppe einzeln getestet werden musste.

Bei dem ersten Versuch (A) wurde der SDT an 22 VT durchgeführt. Für diesen Versuch wurde DMSO als Lösungsmittel verwendet. Verum oder Placebo wurden 30 Minuten vor dem Sampling s. c. in die Nackenfalte appliziert. Der zweite Versuch (B) beinhaltete die Injektion von Verum oder Placebo, ebenfalls mit DMSO, unmittelbar nach dem Sampling. Im dritten Versuch (C) wurde die Injektion eine Stunde vor dem Sampling durchgeführt. Dabei kam Kolliphor als Placebo und bei der Herstellung von Verum

zum Einsatz. Die Injektion fand bei diesem Versuch i. p. statt. Zum Abschluss aller Versuche wurden die Tiere einem Nachtest dem SDT ohne Interferenz und ohne Behandlung und anschließend einem Nachtest ohne Behandlung und mit Interferenz unterzogen. **Tabelle 1** zeigt die Verhaltensversuche (A-C) im Überblick.

Tabelle 1: Darstellung der eingesetzten Versuchsspezifika der Verhaltensversuche

	Versuch A	Versuch B	Versuch C
Zeitpunkt der Injektion	30 min vor Sampling	direkt nach Sampling	1 h vor Sampling
Injektionsort	s. c.	s. c.	i. p.
Träger-/Placebolösung	DMSO	DMSO	Kolliphor
Zahl der Versuchstiere	22	21	22

2.6.2 Software und Statistik der Verhaltensversuche

Für die digitale Protokollierung der Verhaltensbeobachtung und der Datenverarbeitung des SDT wurden institutseigene Computerprogramme auf Windowsbasis eingesetzt. Zur Protokollierung der Verhaltensbeobachtung wurde das Programm *Eventlog* genutzt. Mithilfe dieses Programms war es möglich, die Tastendruckdauer des Beobachters während des Versuchs genau (Millisekunden) aufzuzeichnen. Die damit generierte Datei wurde mit *Winrat 05* ausgewertet. *Winrat 05* extrahierte aus dem digitalen Verhaltensprotokoll jeweils 3 Parameter für die beiden Verhaltenskategorien, „Aggression und Sexualverhalten“ gegen das ST und „Untersuchung“ des ST. Zu diesen Parametern gehörten die Latenzzeit (Zeit zwischen Start des Beobachtungszeitraumes und Beginn des ersten Tastendrucks für die Protokollierung der definierten Interaktion), die Aktionszeit (Summe der Dauer der Tastendrucke, für eine der definierten Verhaltenskategorien) und Aktionsanzahl (Anzahl der Tastendrucke für eine definierte Verhaltenskategorie). Die mittels *Winrat 05* generierte Datentabelle wurde in *Microsoft Excel*[®] importiert und die Verblindung nach einem Versuch aufgehoben, sodass eine Zuordnung zu Behandlung und Verhalten möglich war.

Weiterhin wurden die Aktionszeiten der Verhaltenskategorien „Untersuchen des ST“ und „Aggressivität und Sexualverhalten“ des VT gegenüber dem ST ausgewertet. Die Untersuchungs- („Untersuchen des ST“) und Aktionszeiten (Aggressivität und Sexualverhalten“) wurden in Balkendiagrammen dargestellt. Weiter wurde der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet und dargestellt. Zur Auswertung, ob das ST wiedererkannt wurde oder nicht, wurden mittels des Wilcoxon-Tests die gemessenen Untersuchungszeiten während einer definierten Choice-Session verglichen. Das zweiseitige Signifikanzniveau wurde für $p < 0,05$ festgesetzt. Sowohl die Statistik als auch die

Diagramme wurden mit Version 9 von *GraphPad Prism* erstellt. Für die Auswertung der Aktionszeiten von Aggressivität und Sexualverhalten wurde der Friedman-Test herangezogen und die Aktionszeiten im Choice gegen das bekannte und unbekannte addiert wurden, da der Fokus auf der allgemeinen Änderung des Verhaltens lag.

2.7 Studie 2: c-Fos Immunohistochemie

2.7.1 Gewinnung von Hirnschnitten

Für die zweite Studie wurde mit separaten VT das Sampling des SDT durchgeführt und dabei – bis zum Ende des Sampling – das oben beschriebene Protokoll der Verhaltensversuche befolgt. Ziel war eine histologische Untersuchung der VT-Gehirne im Sinne einer zellulären Bildgebung. Eine halbe Stunde vor dem Sampling wurde den VT Verum oder Placebo s. c. injiziert. Als Kontrollgruppe dienten VT, die ebenfalls mit Verum oder Placebo behandelt wurden, jedoch kein Sampling durchlaufen hatten. **Tabelle 2** gibt einen Überblick über die Behandlung der verwendeten Tiere.

Tabelle 2: Behandlung der Mäuse für die immunhistochemische Aufarbeitung der Gehirne (Sampling = Lernsession).

Behandlung	Anzahl Versuchstiere
Placebo (DMSO) ohne Sampling (Gruppe A)	6
Placebo (DMSO) mit Sampling (Gruppe B)	6
Modafinil in DMSO ohne Sampling (Gruppe C)	6
Modafinil in DMSO mit Sampling (Gruppe D)	6

Siebzig Minuten nach erfolgtem Sampling wurden die VT mit Isofluran in tiefe Inhalationsnarkose versetzt und mit einer Mischung aus Ketamin (200 mg/kg KM) und Xylazin (16 mg/kg KM) noch tiefer anästhesiert. Unter dieser tiefen Narkose wurde das Gewebe durch Perfusion des großen Kreislaufs mit 4 % Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer fixiert. Dazu wurden die Mäuse zuerst sternotomiert und anschließend der linke Ventrikel sowie der rechte Vorhof des Herzens punktiert. Mit Hilfe einer Pumpe und einer im linken Ventrikel platzierten Kanüle wurde zunächst das Blut des großen Kreislaufs mit physiologischer NaCl-Lösung herausgespült. Anschließend wurde das Gewebe mit 100 ml der Paraformaldehydlösung perfundiert. Im direkten Anschluss an die Perfusion wurden die Mäuse dekapitiert und das Gehirn entnommen. Dazu wurden bis zu den Schädelknochen alle äußeren Bestandteile des Kopfes entfernt. Vom *Foramen occipitale magnum* ausgehend wurde entlang der Mittellinie das

Gehirn freigelegt. Nach Entfernung der Hirnhäute wurde das Gehirn abgesetzt und in Gänze entnommen, in einer 4%igen Formaldehydlösung über Nacht nachfixiert und anschließend in Saccharose überführt. Bei der Präparation konnten in Gruppe A drei und in Gruppe C ein *Bulbus* nicht ausreichend reseziert werden. Nach Absinken in der Saccharoselösung wurden die Gehirne schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Mittels Kryomikrotom (*Leica CM 3050 S*) wurden Frontalschnitte der Gehirne hergestellt; die Schnittdicke betrug 25 µm. Zur Orientierung bei der Schnittherstellung diente der Atlas von (Franklin und Paxinos 2008). Die Hirnschnitte wurden bis zur weiteren Verarbeitung in Saccharose bei -20 °C gelagert.

2.7.2 Immunhistochemie und Auswertung

Die dieses Kapitel betreffenden detaillierten Protokolle befinden sich im Anhang in Kapitel 12.2. Die Hirnschnitte wurden mithilfe von zimmerwarmer, phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) aufgetaut und die Saccharose ausgewaschen. Es wurde eine indirekte IHC mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) durchgeführt. Die polyklonalen c-Fos-AK stammten vom Kaninchen (Santa Cruz-52). Weiterhin wurden Kontrollschnitte hergestellt, die nur mit sekundären AK behandelt wurden. Anschließend wurden die Hirnschnitte auf Objektträger aufgezogen, getrocknet, mit Xylol und Entellan™ (*Sigma-Aldrich*) behandelt und mit einem Deckglas geschützt. Die Präparate wurden mithilfe eines Lichtmikroskops und einer daran angeschlossenen Kamera auf einen PC dargestellt (*Zeiss Axio Imager M1* mit *AxioCam 503 Color*). Mithilfe eines Computerprogramms von Zeiss (*Axio Zeiss Image Manager*) wurden die Schnitte weitergehend untersucht. Das Computerprogramm erlaubte es, Fotos von den Schnitten zu machen und diese entsprechend zu analysieren. Des Weiteren wurden die durch die IHC gefärbten Zellen in diesem Computerprogramm durch einen geschulten Beobachter verblindet ausgezählt. Dabei wurden stark gefärbte, zum Hintergrund deutlich abgesetzte Zellen, als „c-Fos positiv“ gewertet. Vier verschiedene Hirnareale wurden eingehender untersucht. Dazu zählte der AOB (wobei zwischen Körner- und Mitralzellen unterschieden wurde), der Ncl. acc., der PFC und das Striatum (Putamen + Nucleus caudatus). Pro zu untersuchendem Hirnareal eines VT fanden vier Zählungen in zwei verschiedenen Schnitten mit Wertung beider Hemisphären statt. Anschließend wurde daraus der Mittelwert gebildet. Zum Überblick wurde eine 5-fache Vergrößerung und für die genauere Auszählung der einzelnen Zellen eine 40-fache Vergrößerung benutzt. **Abbildung 3** zeigt beispielhaft eine histologische Aufnahme des *Bulbus olfac-*

torius in diesen Vergrößerungen. Die Fasern (dorsolateraler olfaktorischer Trakt) zwischen den Körner- und Mitralzellen im AOB wurden bei der Auswertung den Körnerzellen zugerechnet. **Abbildung 3** soll diese Unterteilung verdeutlichen.

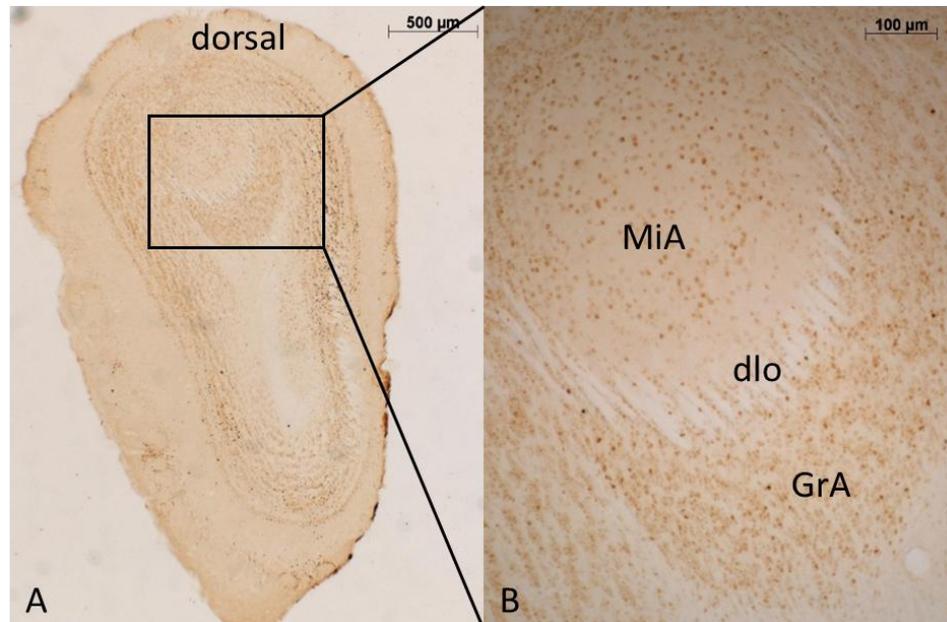


Abbildung 3: Repräsentativer Frontalschnitt der c-Fos-Immunhistochemie auf Höhe des akzessorischen Bulbus olfaktorius behandelt wurde; **A** Übersichtsaufnahme (2,5x/0,075 Objektiv); **B** Untersuchungsaufnahme (10x/0,3 ph1 Objektiv) mit Mitralzellen (MiA) und Körnerzellen (GrA) und den dazwischenliegenden Fasern des dorsolateralen olfaktorischen Trakts (dlo).

2.7.3 Software und Statistik der c-Fos-IHC

Neben der bereits genannten Software für die Aufnahme und Auswertung der Bilder unter dem Lichtmikroskop (*Axio Zeiss Image Manager*) wurden für die Auswertung der IHC von c-Fos weitere Computerprogramme verwendet. Für die Eintragung der gezählten Zellzahlen der Schnitte der IHC sowie zur Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurde ebenfalls *Microsoft Excel®* genutzt. Weiterhin wurden die erstellten Tabellen in das Statistikprogramm *GraphPad® Prism 9* eingepflegt. In diesem Programm wurde der nicht parametrische Kruskal-Wallis-Test für den Vergleich der Daten der verschiedenen Gruppen angewendet. Im Falle der Signifikanz schloss sich daran (*post-hoc*) der Dunn's Test an, um eine Aussage über Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne Lernsession innerhalb ihrer Behandlungsgruppe (Modafinil oder DMSO) zu erhalten. Das zweiseitige Signifikanzniveau wurde in dieser Arbeit auf $p < 0,05$ festgesetzt. Weiterhin wurden mit diesem Programm Diagramme mit individuellen Mittelwerten und SEM für jede Gruppe erstellt.

2.8 Studie 3: Dopaminerges System und Zellinduktion

2.8.1 Doppelfärbungen

In einer dritten Studie wurden, um bei der zellulären Bildgebung die c-Fos-exprimierenden Zellen gemeinsam mit denen des dopaminergen Systems darstellen zu können, eine Doppelfärbung durchgeführt. Hierfür wurden AK, die gegen das dopaminerge System gerichtet waren, zusammen mit dem bereits verwendeten c-Fos-AK genutzt. Die Tauglichkeit der definierten AK zur Markierung dopaminergischer Zellen wurde zuerst allein an Hirngewebeschnitten überprüft. Bei Erfolg sollten in einem zweiten Schritt diese dann zusammen mit dem c-Fos-AK in einer Doppelfärbung genutzt werden.

2.8.2 Dopamin₁-Rezeptor-IHC

Die IHC für den D1RD-AK wurde, in Kooperation mit der AG „Funktionelle Neuroanatomie und Kleintier-MRT des Leibniz-Instituts (LIN)“, durchgeführt. Zur Überprüfung der erhaltenen Antigenität wurde parallel eine Parvalbuminfärbung durchgeführt. Es handelte sich bei den in der IHC verwendeten AK um PAK von Kaninchen (Santa Cruz sc-14001) und Ziegen (Santa Cruz sc-1434 und sc-31478). Diese wurden in Verdünnungen 1:100, 1:250 und 1:500 getestet. Die Verdünnung der SAK betrug 1:200 (anti-rabbit, anti-goat, von *Dianova*). Bei der IHC mit D1RD-AK wurden Frontalschnitte, die das Striatum und den Hippocampus enthielten, gefärbt. Ein detailliertes Protokoll befindet sich im Anhang (Kapitel 12.3). Die Untersuchungen erfolgten mittels Lichtmikroskop in den gleichen Vergrößerungen wie bei den c-Fos-Untersuchungen (Kapitel 2.9).

2.8.3 Anti-Tyrosinhydroxylase-IHC

Ein zweiter Ansatz, um später das dopaminerge System mit den c-Fos markierten Arealen zu verbinden, wurde mit AK gegen die Tyrosinhydroxylase (TH) verfolgt. Für die Färbung der TH wurde ein polyklonaler PAK von Sigma-Aldrich (AB 152) in einer Verdünnung von 1:800 und 1:1000 verwendet. Es wurden Frontalschnitte in der Ebene des Striatums und des dritten Ventrikels gefärbt. Das Procedere orientierte sich am Protokoll für die IHC des D1RD-AK, mit dem Unterschied, dass nur der anti-Kaninchen-SAK verwendet wurde. Das Protokoll befindet sich im Anhang (Kapitel 12.3).

2.8.4 Fluoreszenzmarkierung von c-Fos-AK und TH-AK und direkte Immunfluoreszenz

Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit Hilfe der Labeling Kits von *Thermo Fisher* (Zenon Rabbit IgG Labeling Kits) an den PAK gebunden. Der c-Fos-AK wurde dabei mit dem Zenon Alexa Fluor 488 AK und der TH-AK mit dem Zenon Alexa 532 AK markiert (Kapitel 12.4). Danach wurde eine direkte IHC als Einzelmarkierung (sowohl für c-Fos als auch für TH) und eine Doppelmarkierung an Hirnschnitten durchgeführt, die die Commissura anterior und Teile des Ncl. acc. beinhalteten. Zusätzlich wurden Schnitte mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Anschließend wurden diese in einer Übersichtsaufnahme mit *Leica TIRF MC® - Life Cell Imaging System* als Kachelbild mit dem 10x Objektiv aufgenommen. Für eine fokussierte, nähere Aufnahme wurde das Konfokalmikroskop (*Leica SPE Confocal System DMI 4000 B*) mit 20x Objektiv eingesetzt. Ein detailliertes Protokoll für die IHC befindet sich im Anhang (Kapitel 12.5).

2.8.5 Doppelfärbung fluoreszierender TH-PAK und fluoreszierender c-Fos-SAK

In dieser IHC sollte eine Doppelfärbung von sekundär fluoreszierendem c-Fos-AK (c-Fos; 1:1000 + SAK anti rabbit cy 3; 1:500) und einem primär fluoreszierenden TH-AK (Alexa 647 TH AK mouse; 1:500) auf die Commissura anterior und den Ncl. acc. aufgetragen werden. Zusätzlich wurden die Schnitte mit DAPI behandelt. Die Aufnahmen wurden mit den im vorherigen Kapitel beschriebenen Systemen gemacht. Die detaillierten Protokolle befinden sich in Kapitel 12.6.

3 Ergebnisse

3.1 Studie 1: Sozialer Diskriminationstest

Im ersten Vortest wurden 26 VT mit dem SDT ohne Interferenz getestet. Abbildung 4 zeigt, dass während Choice die VT das bekannte ST signifikant kürzer untersuchten als das unbekannte ST. Der Wilcoxon-Test ergab ein p von 0,0036 für die Untersuchungszeiten während Choice.

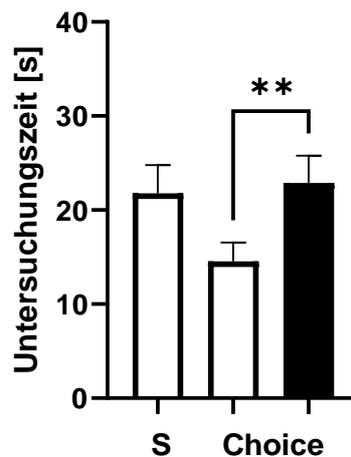


Abbildung 4: Darstellung der Untersuchungszeiten im Vortest im SDT ohne Interferenz und ohne Behandlung der VT (Mittelwert und SEM). Das bekannte ST wurde während Sampling (S) und Choice präsentiert (weiße Säule). Das unbekannte ST nur während Choice (schwarze Säule); $n = 26$, $**p < 0,01$

Abbildung 5 zeigt die Untersuchungszeiten im zweiten Vortest, bei dem der SDT mit Interferenz durchgeführt wurde. Dieser Test wurde an 26 Tieren durchgeführt. Der Wilcoxon-Test der Untersuchungszeiten während Choice ergab ein p von 0,751. Damit waren die Untersuchungszeiten des VT für das vorher präsentierte und das neue ST gleich.

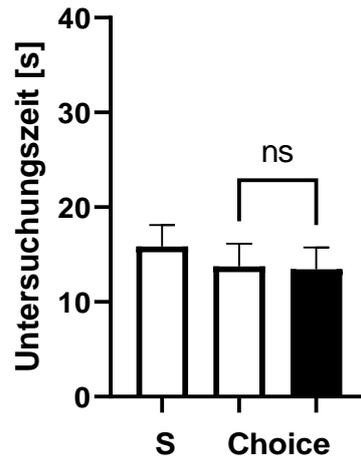


Abbildung 5: Darstellung der Untersuchungszeiten im Vortest im SDT mit Interferenz und ohne Behandlung der VT (Mittelwert und SEM). Das bekannte ST wurde während Sampling (S) und Choice präsentiert (weiße Säule). Das unbekannte ST nur während Choice (schwarze Säule); $n = 26$, ns = nicht signifikant

Die Abbildung 6A zeigt die Untersuchungszeit von 22 VT im SDT bei Injektion von Placebo 30 min vor dem SDT im **Versuch A** (siehe **Tabelle 1**). In Abbildung 6B sind die Untersuchungszeiten nach Verumbehandlung dargestellt. Die statistischen Analysen mittels Wilcoxon-Tests ergaben signifikante Unterschiede zwischen den Untersuchungszeiten für das bekannte und das unbekannte ST, sowohl für Placebo ($p = 0,013$), als auch für Verum ($p = 0,001$).

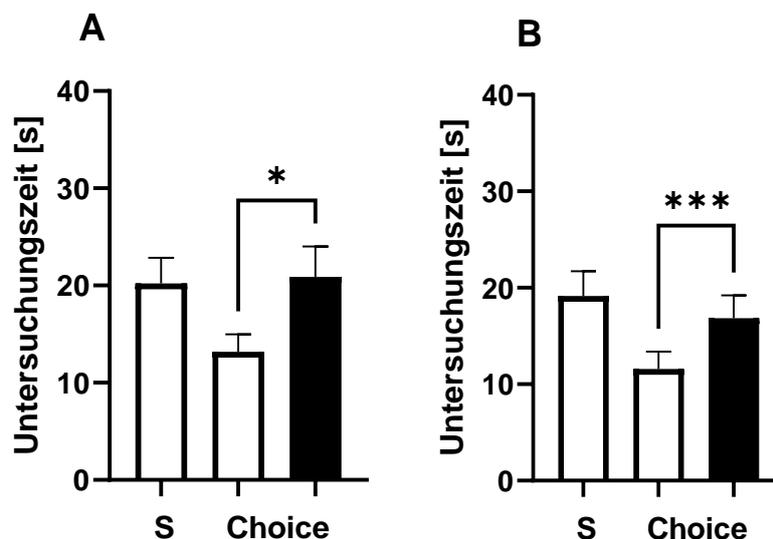


Abbildung 6: Darstellung der Untersuchungszeiten im Versuch A im SDT der VT (Mittelwert und SEM). Injektion von Placebo (= DMSO) (A) und Verum (= Modafinil in DMSO) (B) 30 min vor Sampling (S). Das bekannte ST wurde während Sampling und Choice präsentiert (weiße Säule). Das unbekannte ST nur während Choice (schwarze Säule); $n = 22$ * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

In Abbildung 7A ist die durchschnittliche Untersuchungsdauer im **Versuch B** (siehe **Tabelle 1**) von 22 VT für Sampling und Choice dargestellt. Dabei fand die Injektion unmittelbar nach dem Sampling statt. Abbildung 7B stellt die Untersuchungszeit von 21 VT während des SDT mit Verumbehandlung, dar. Ein Tier wurde aufgrund eines besonders aggressiven Verhaltens aus diesem Versuch ausgeschlossen. Der Wilcoxon-Test ergab für beide Versuchsgruppen keine Unterschiede hinsichtlich der Untersuchungszeiten (Verum $p = 0,111$; Placebo $p = 0,524$).

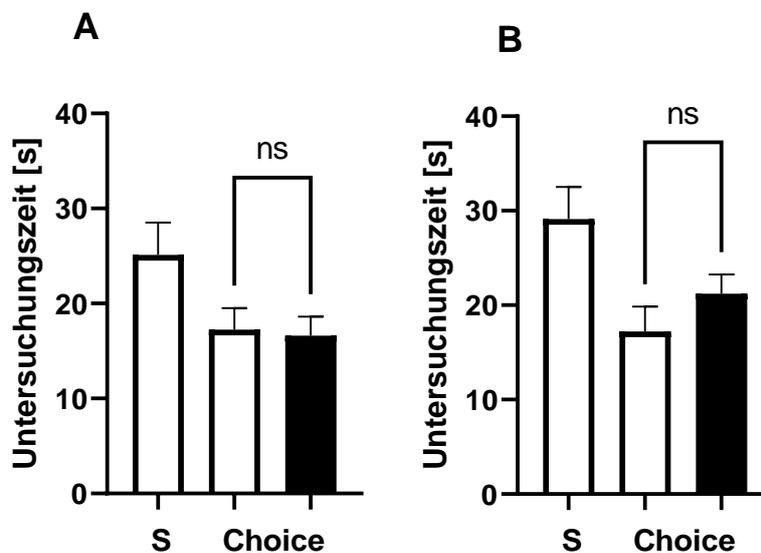


Abbildung 7: Darstellung der Untersuchungszeiten im Versuch B im SDT der VT (Mittelwert und SEM). Injektion von Placebo (= DMSO) (A) und Verum (= Modafinil in DMSO) (B) direkt nach dem Sampling (S). Das bekannte ST wurde während Sampling und Choice präsentiert (weiße Säule). Das unbekannte ST nur während Choice (schwarze Säule); 7A $n = 22$; 7B $n = 21$, ns = nicht signifikant

Im Folgenden werden die Ergebnisse von 22 VT für die Injektion eine Stunde vor dem Sampling präsentiert, wobei Abbildung 8A die Untersuchungszeiten bei Placebobehandlung mit Kolliphor darstellt (**Versuch C**, siehe **Tabelle 1**). Hierbei ermittelte der Wilcoxon-Test einen signifikanten Unterschied zwischen den Untersuchungszeiten ($p = 0,0002$). Abbildung 8B zeigt die Ergebnisse ($p = 0,483$) mit Verumbehandlung für diesen Versuch, bei dem kein signifikanter Unterschied vorlag.

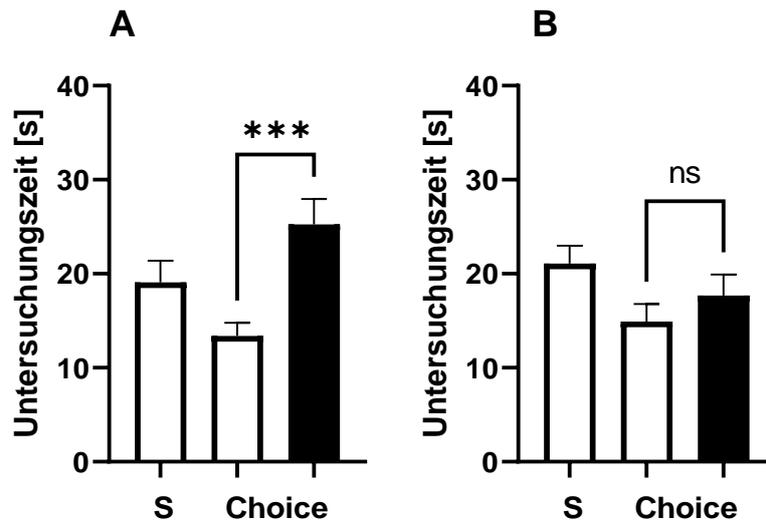


Abbildung 8: Darstellung der Untersuchungszeiten im Versuch C im SDT der VT (Mittelwert und SEM). Injektion von Placebo (= Kolliphor) (A) und Verum (= Modafinil in Kolliphor) (B) eine Stunde vor dem Sampling (S). Das bekannte ST wurde während Sampling und Choice präsentiert (weiße Säule). Das unbekannte ST nur während Choice (schwarze Säule); $n = 22$; ns = nicht signifikant, $***p < 0,001$

Nach Abschluss der Versuche wurden die VT erneut getestet. Abbildung 9 zeigt die Untersuchungszeiten im Nachtest ohne Interferenz. Mittels Wilcoxon-Tests wurde ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Untersuchungszeiten im Choice ermittelt ($p = 0,003$).

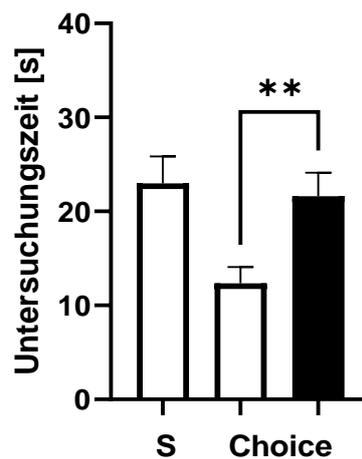


Abbildung 9: Darstellung der Untersuchungszeiten im Nachtest ohne Interferenz und ohne Behandlung im SDT der VT (Mittelwert und SEM). Das bekannte ST wurde während Sampling (S) und Choice präsentiert (weiße Säule). Das unbekannte ST nur während Choice (schwarze Säule); $n = 22$, $**p < 0,01$

In Abbildung 10 ist das Ergebnis des zweiten Nachttests (unbehandelt mit Interferenz) dargestellt. Laut Wilcoxon-Test gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Untersuchungszeiten während Choice ($p = 0,503$).

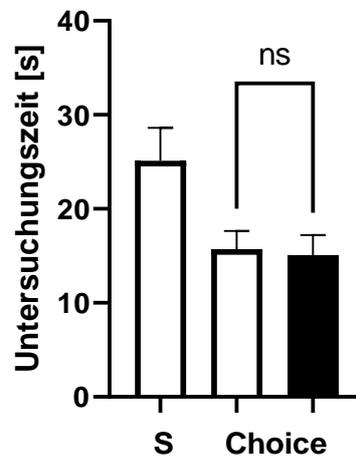


Abbildung 10: Darstellung der Untersuchungszeiten im Nachttest mit Interferenz und ohne Behandlung im SDT der VT (Mittelwert und SEM). Das bekannte ST wurde während Sampling (S) und Choice präsentiert (weiße Säule). Das unbekannte ST nur während Choice (schwarze Säule); $n = 22$; ns = nicht signifikant

Abbildung 11 zeigt die Aktionszeiten für die Verhaltenskategorie „Aggression und Sexualverhalten“ der Vorversuche (A = ohne Interferenz und ohne Behandlung; B = mit Interferenz und ohne Behandlung). Es wurden die Aktionszeiten von Sampling und die Summe der Aktionszeiten während Choice („bekanntes“ + „unbekanntes“ ST) ausgewertet. Die Aktionszeiten von Choice wurden addiert, da es um eine allgemeine Änderung der Aktionszeiten eines einzelnen VT gegen das bekannte und das unbekannte ST ging. Laut Wilcoxon-Test gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Aktionszeiten, sowohl für A ($p = 0,0501$) als auch für B ($p = 0,54$).

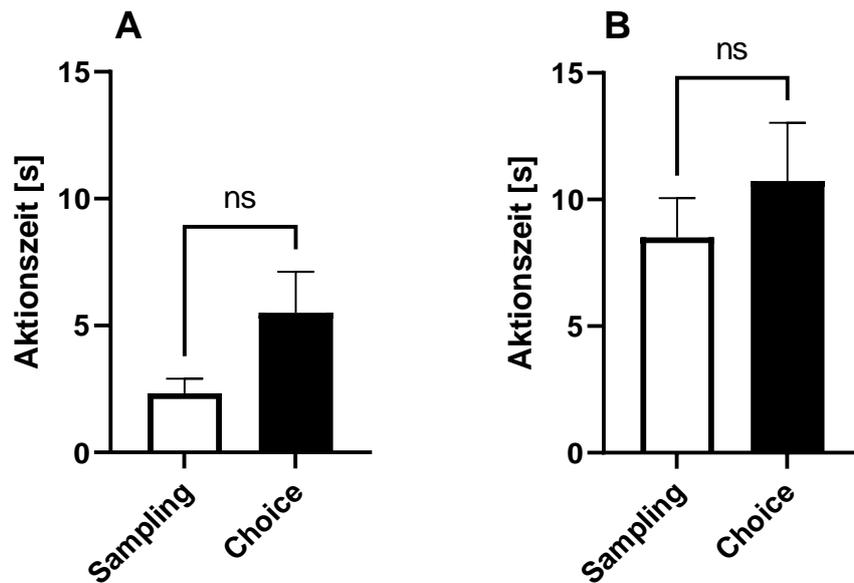


Abbildung 11: Darstellung der Aktionszeiten (Aggressivität und Sexualverhalten) in den Vortests. **A** = ohne Interferenz und ohne Behandlung. **B** = mit Interferenz und ohne Behandlung (Mittelwert und SEM). Die Aktionszeiten des VT für das bekannte und das unbekannte ST wurden für Choice addiert. $n = 26$, ns = nicht signifikant

Die Abbildung 12 zeigt die Aktionszeiten für die Kategorie „Aggressivität und Sexualverhalten“ in den Versuchen A-C (siehe **Tabelle 1**). Es wurden die Aktionszeiten von Sampling und die Summe während Choice („bekanntes“ + „unbekanntes“ ST) ausgewertet. Laut Friedman-Test kam es bei Versuch C (Injektion eine Stunde vor dem Sampling) zu einem signifikanten Unterschied ($p = 0,0094$) zwischen den Aktionszeiten, nicht aber bei Versuch A ($p = 0,264$) und Versuch B ($p = 0,081$). Die weiterführende Analyse wurde mittels des *Post-hoc*-Tests für den Versuch C geliefert. Dabei kam es nur zu einem signifikanten Unterschied zwischen der Aktionszeit während des Samplings des Placeboversuchs und der Aktionszeit während Choice im Verumversuch ($p = 0,0174$).

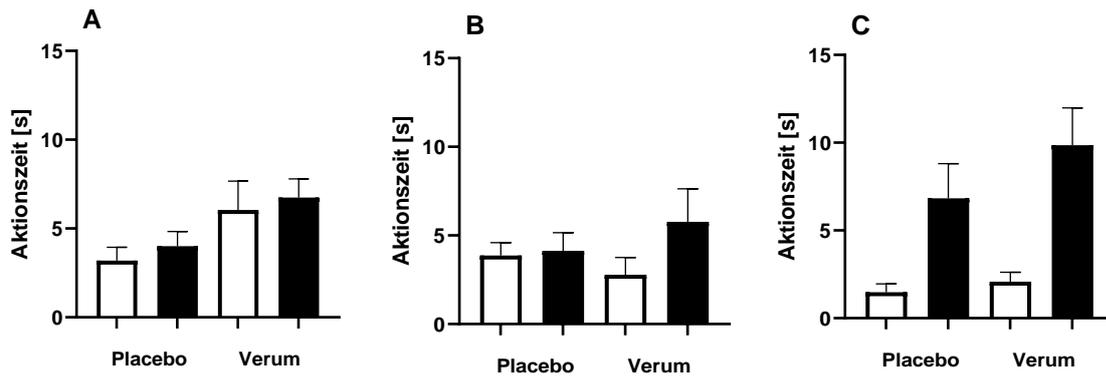


Abbildung 12: Darstellung der Aktionszeiten (Aggressivität und Sexualverhalten) in den Versuchen A (A), B (B) und C (C) im SDT der VT (Mittelwert und SEM). Die Aktionszeiten auf das bekannte und das unbekannte ST wurden für Choice (schwarze Säulen) addiert. Aktionszeit des Samplings wird durch die weißen Säulen dargestellt; $n = 22$

Abbildung 13 zeigt die Aktionszeiten für die Verhaltenskategorie „Aggression und Sexualverhalten“ der Nachversuche (A = ohne Interferenz und ohne Behandlung; B = mit Interferenz und ohne Behandlung). Es wurden die Aktionszeiten von Sampling und die Summe der Aktionszeiten während Choice („bekanntes“ + „unbekanntes“ ST) ausgewertet. Laut Wilcoxon-Test gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Aktionszeiten für den Nachversuch ohne Interferenz ($p = 0,5$), jedoch für den Nachversuch mit Interferenz ($p = 0,046$).

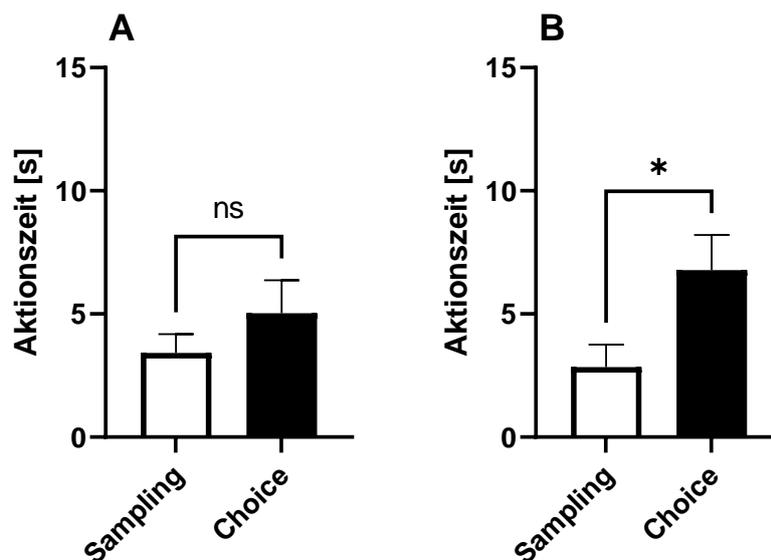


Abbildung 13: Darstellung der Aktionszeiten (Aggressivität und Sexualverhalten) in den Nachtests. A = ohne Interferenz und ohne Behandlung. B = mit Interferenz und ohne Behandlung (Mittelwert und SEM). Die Aktionszeiten auf das bekannte und das unbekannte ST wurden für Choice addiert. $n = 22$; ns = nicht signifikant, * $p < 0,05$

3.2 Studie 2: C-Fos-Immunhistochemie

Die Abbildung 14 zeigt die Anzahl der c-Fos positiven Nuclei im Bereich der Körnerzellschicht im AOB in den verschiedenen Gruppen (siehe **Tabelle 2**). Auffällig ist, dass es bei den mit Placebo behandelten Gruppen zu einem großen SEM kam, während bei den Verumgruppen nur ein sehr kleiner SEM auftrat. Der Kruskal-Wallis-Test errechnete einen signifikanten Unterschied zwischen den vier Gruppen ($p = 0,0058$). Daraufhin wurden die Daten mit dem Dunn-Test paarweise analysiert. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,99$) zwischen den Placebogruppen mit oder ohne Lernsession (Sampling). Dabei ist zu erwähnen, dass die AOB (Körner- und Mitralzellschicht) dreier Mäuse in Gruppe A und einer Maus in Gruppe C bei der Herstellung der Präparate beschädigt wurden und somit nicht mit in die Auswertung einfließen konnten. Die statistische *Post-hoc*-Analyse der Verumgruppen untereinander ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen Lernsession und Einzelhaltung ($p = 0,073$).

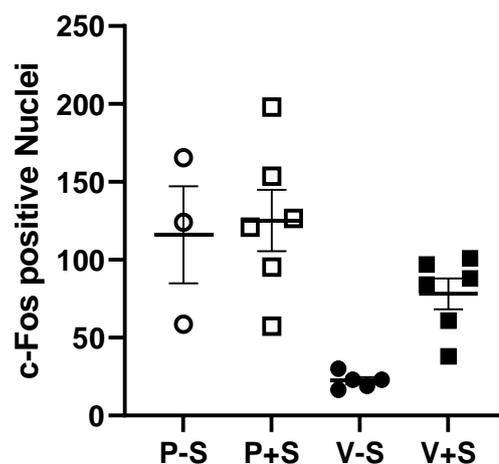


Abbildung 14: Zahl der c-Fos positiven Nuclei der Körnerzellschicht (Mittelwerte \pm SEM) von 3 VT der Gruppe A, 5 VT der Gruppe C und 6 Versuchstieren pro Gruppe B, D. -S = ohne Sampling; +S = mit Lernsession; P = Placebo; V = Verum

Die Abbildungen 15 und 16 zeigen mikroskopische Aufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des *akzessorischen Bulbus olfactorius* als Übersicht und Nahaufnahme in 5- und 40-facher Vergrößerung der Gruppen A-D (siehe **Tabelle 2**). Dabei wurde der Fokus auf die in der Körnerzellschicht (GrA) gelegenen dunkleren c-Fos positiven Nuclei gelegt. Diese liegt in Hakenform unterhalb des dorsolateralen olfaktorischen Trakts.

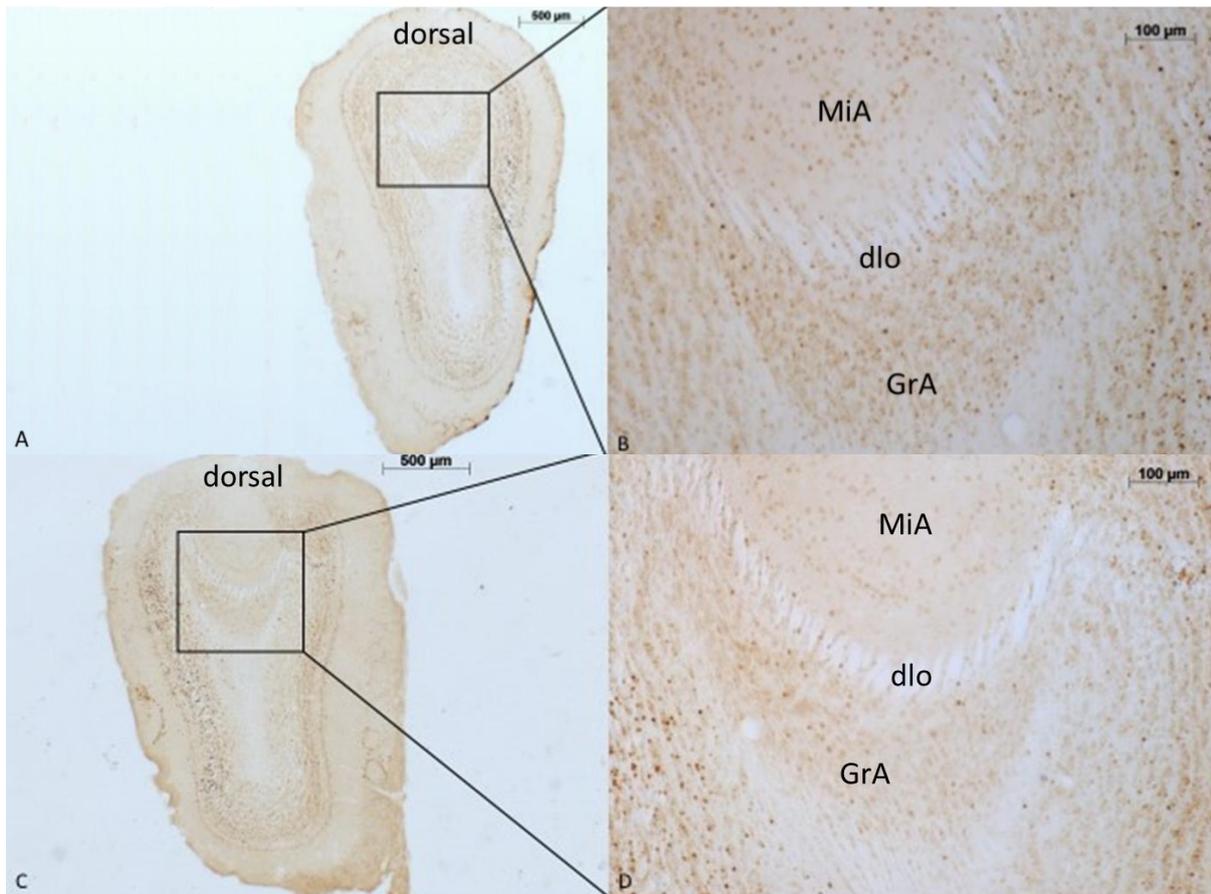


Abbildung 15: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des AOB, die immunhistochemisch auf ihre c-Fos-Synthese untersucht worden sind. (A, B) Placebobehandlung ohne Sampling; (C, D) Placebobehandlung mit Sampling. Dlo = dorsolateraler olfaktorischer Trakt; GrA = Stratum granulosum; MiA = Stratum mitrale

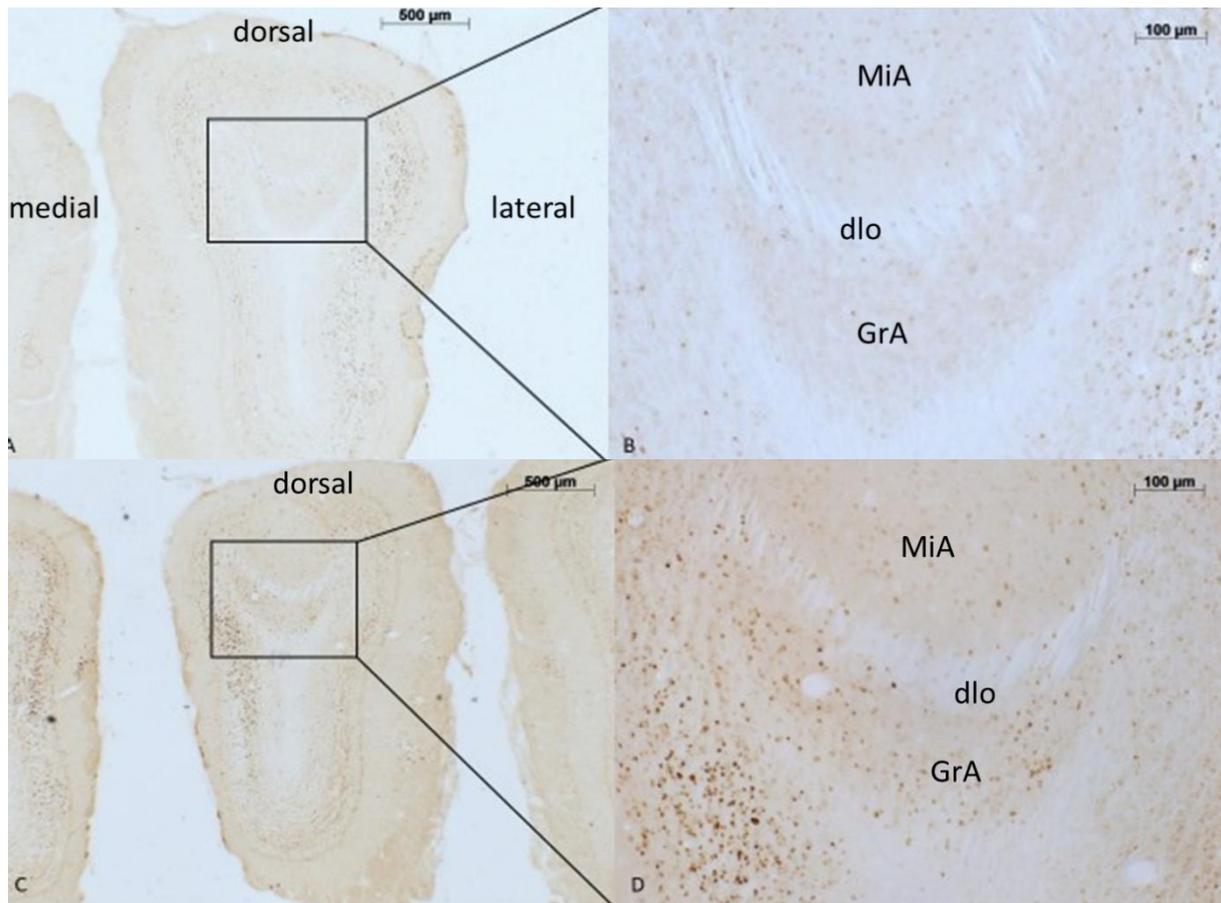


Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des AOB, die immunhistochemisch auf ihre c-Fos-Synthese untersucht worden sind. (A, B) Modafinilbehandlung ohne Sampling; (C, D) Modafinilbehandlung mit Sampling. Dlo = dorsolateraler olfaktorischer Trakt; GrA = Stratum granulosum; MiA = Stratum mitrale

Abbildung 17 stellt die statistische Auswertung der c-Fos positiven Nuclei im Bereich der Mitralzellschicht des AOB der verschiedenen Gruppen dar. Der p-Wert des Kruskal-Wallis-Tests betrug 0,005. Der anschließende *Post-hoc* Test lieferte ein p-Wert $> 0,99$ zwischen den Placebogruppen. Auch die Modafinilgruppen waren nicht signifikant ($p = 0,50$) voneinander verschieden. Jedoch ließ sich hier ein auffallender Unterschied zwischen der Größe der SEM der mit Placebo behandelten Gruppen erkennen, während die SEM unter Verumbehandlung kleiner ausfielen.

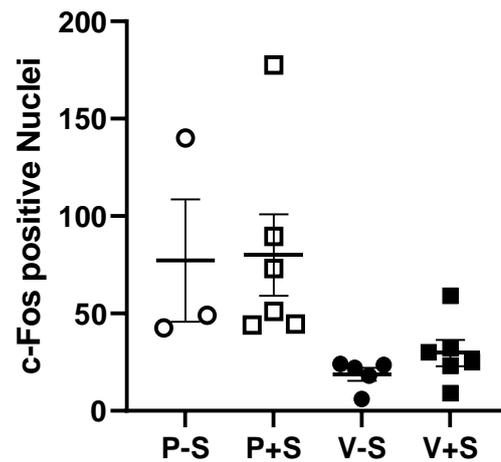


Abbildung 17: Zahl der c-Fos positiven Nuclei der Mitralzellschicht (Mittelwerte \pm SEM) von 3 VT der Gruppe A, 5 VT der Gruppe C und jeweils 6 VT der Gruppen B und D. -S = ohne Sampling; +S = mit Lernsession; P = Placebo; V = Verum

Die Abbildungen 18 und 19 zeigen repräsentativ Bilder von Frontalschnitten der einzelnen Gruppen des *akzessorischen Bulbus olfactorius* in 5- und 40-facher Vergrößerung der Gruppen A-D (siehe **Tabelle 2**). Dabei wurde der Fokus auf die in der Mitralzellschicht (MiA) gelegenen dunkleren c-Fos positiven Nuclei gelegt. Diese liegt eingefasst in den dorsolateralen olfaktorischen Trakt mittig im Bild.

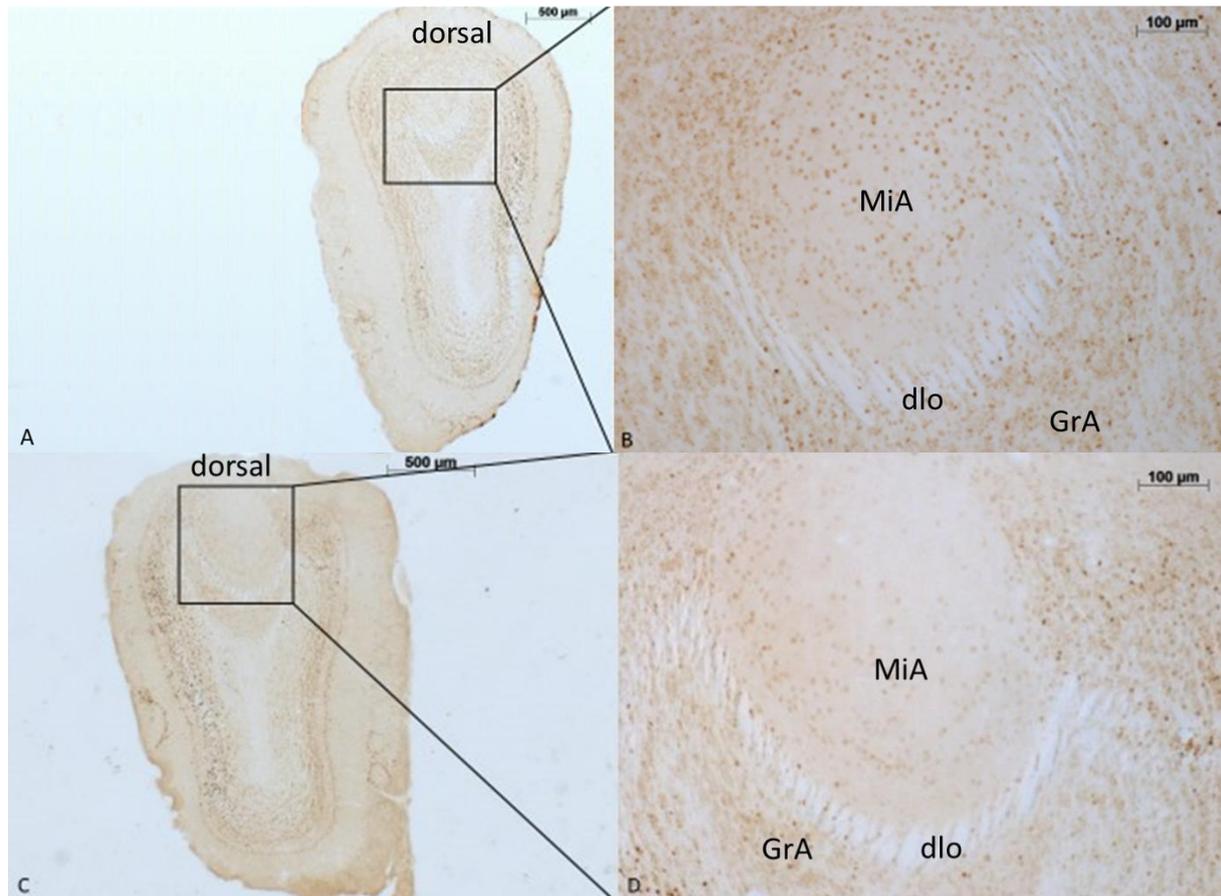


Abbildung 18: Mikroskopische Aufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des AOB, die immunhistochemisch auf ihre c-Fos-Synthese untersucht worden sind. (A, B) Placebobehandlung ohne Sampling; (C, D) Placebobehandlung mit Sampling. Dlo = dorsolateraler olfaktorischer Trakt; GrA = Stratum granulosum; MiA = Stratum mitrale

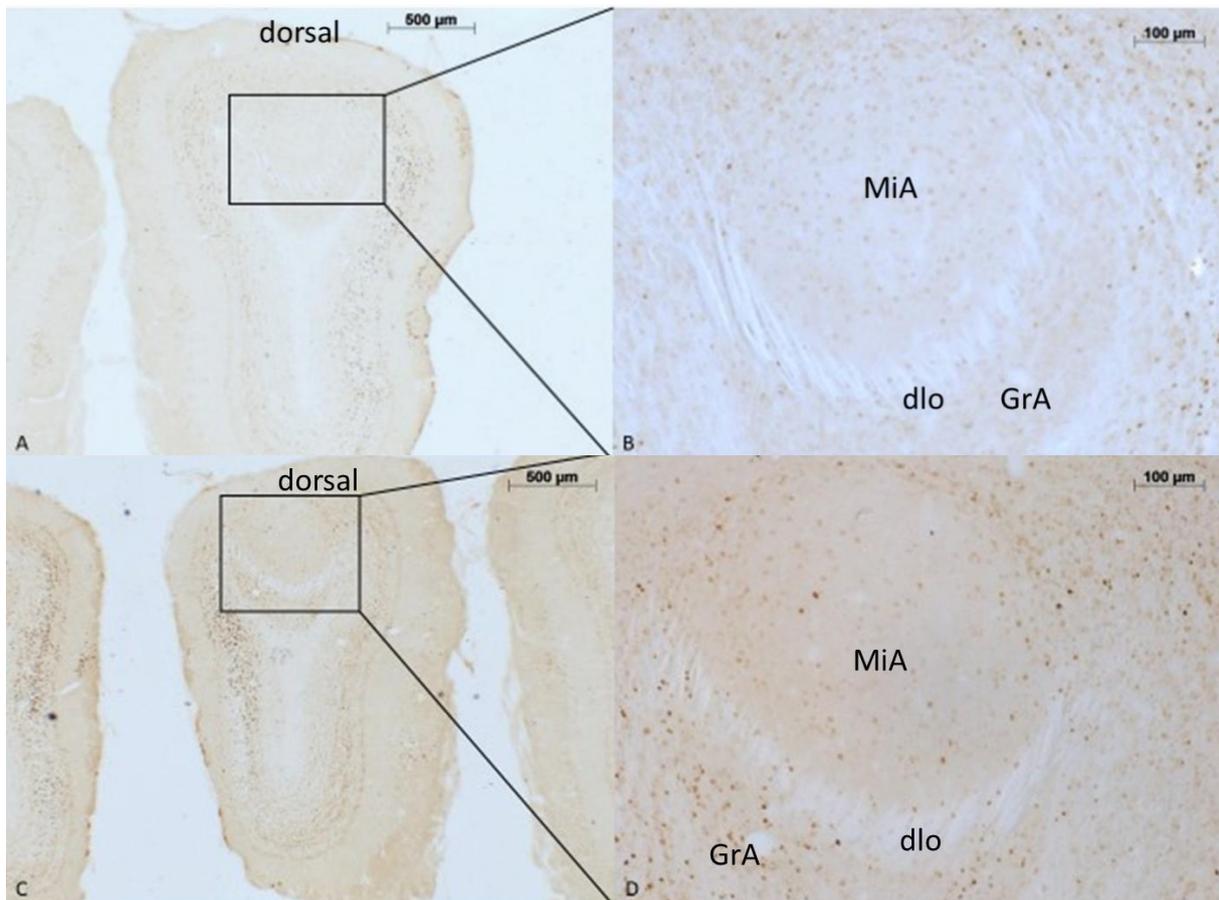


Abbildung 19: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des AOB, die immunhistochemisch auf ihre c-Fos-Synthese untersucht worden sind. (A, B) Modafinilbehandlung ohne Sampling; (C, D) Modafinilbehandlung mit Sampling. Dlo = dorsolateraler olfaktorischer Trakt; GrA = Stratum granulosum; MiA = Stratum mitrale

Abbildung 20 zeigt die statistische Auswertung der Anzahl der c-Fos positiven Zellkerne des Ncl. acc. für die verschiedenen Gruppen des Versuchs. Der Kruskal-Wallis Test war für die Gruppen des Ncl. acc. signifikant ($p = 0,0134$). Die Zahl der c-Fos positiven Nuclei des Ncl. acc. ist bei der Behandlung mit Placebo nach dem Sampling signifikant ($p = 0,006$) höher als in Einzelhaltung. Jedoch war die Anzahl bei den mit Modafinil behandelten Gruppen, im *Post-hoc-Test* nicht signifikant ($p = 0,383$) erhöht im Vergleich zur Erhöhung der Placebogruppen.

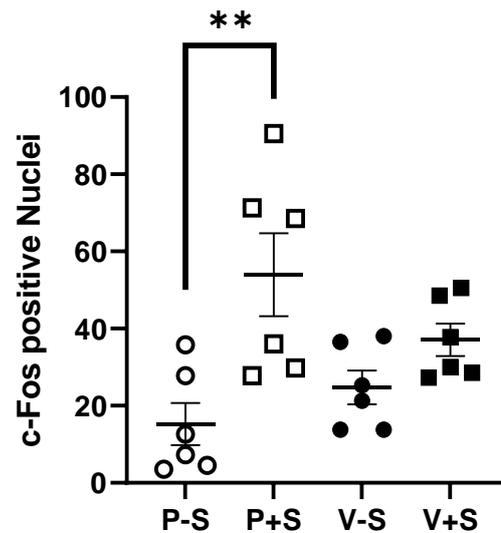


Abbildung 20: Zahl der c-Fos positiven Nuclei des Ncl. acc. (Mittelwerte \pm SEM), $n = 6$ pro Gruppe; -S = ohne Sampling; +S = mit Lernsession; P = Placebo; V = Verum, ** $p < 0,01$

Die Abbildungen 21 und 22 zeigen repräsentative Fotografien von Frontalschnitten der einzelnen Gruppen in der Übersicht in 5- und in 40-facher Vergrößerung mit Fokus auf den Ncl. acc. Zu erkennen sind die c-Fos positiven Nuclei um die Commissura anterior herum, die für die Auszählung genutzt wurden.

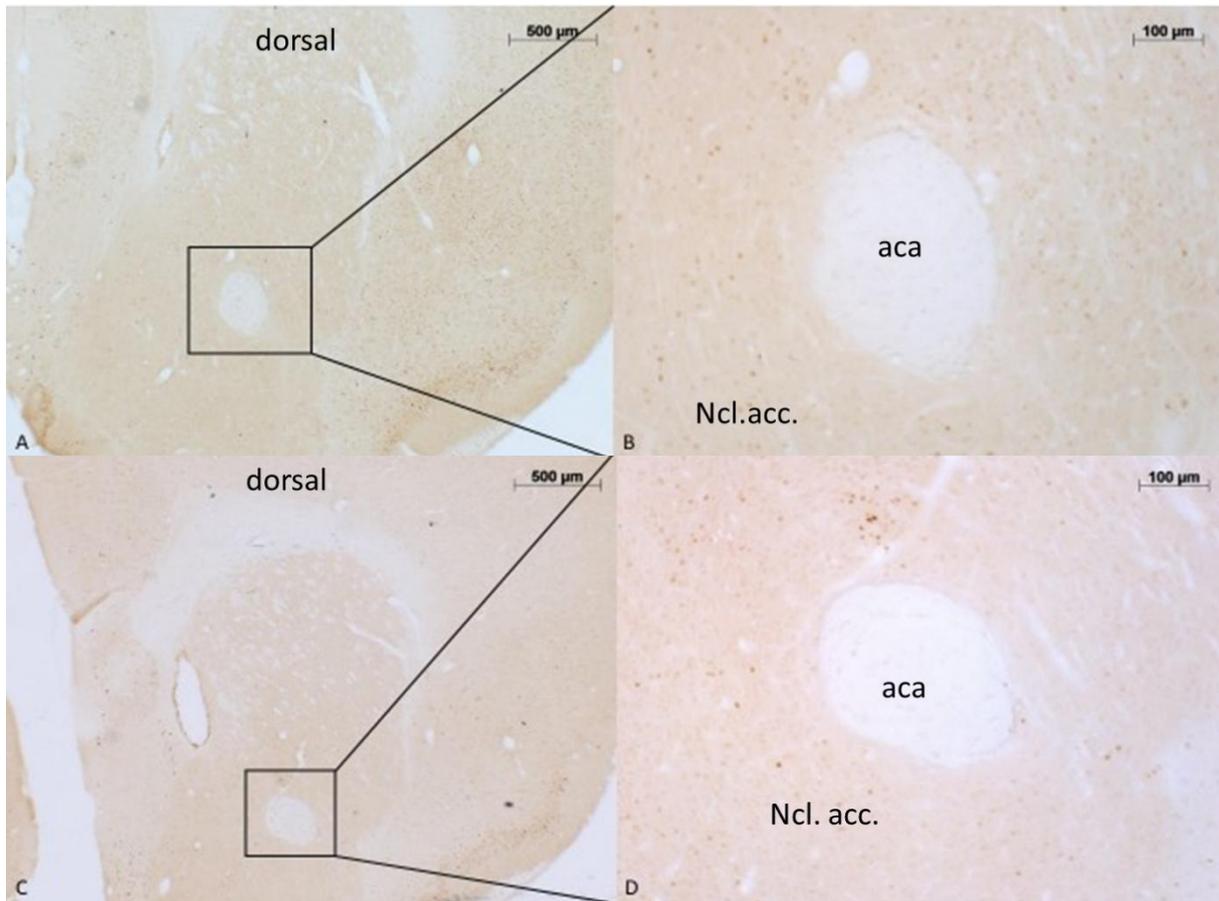


Abbildung 21: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des Ncl. acc., die immunhistochemisch auf ihre c-Fos-Synthese untersucht wurden. (A, B) Placebobehandlung ohne Sampling; (C, D) Placebobehandlung mit Sampling. Aca = Commissura anterior (anteriorer Anteil); Ncl. acc. = Nucleus accumbens

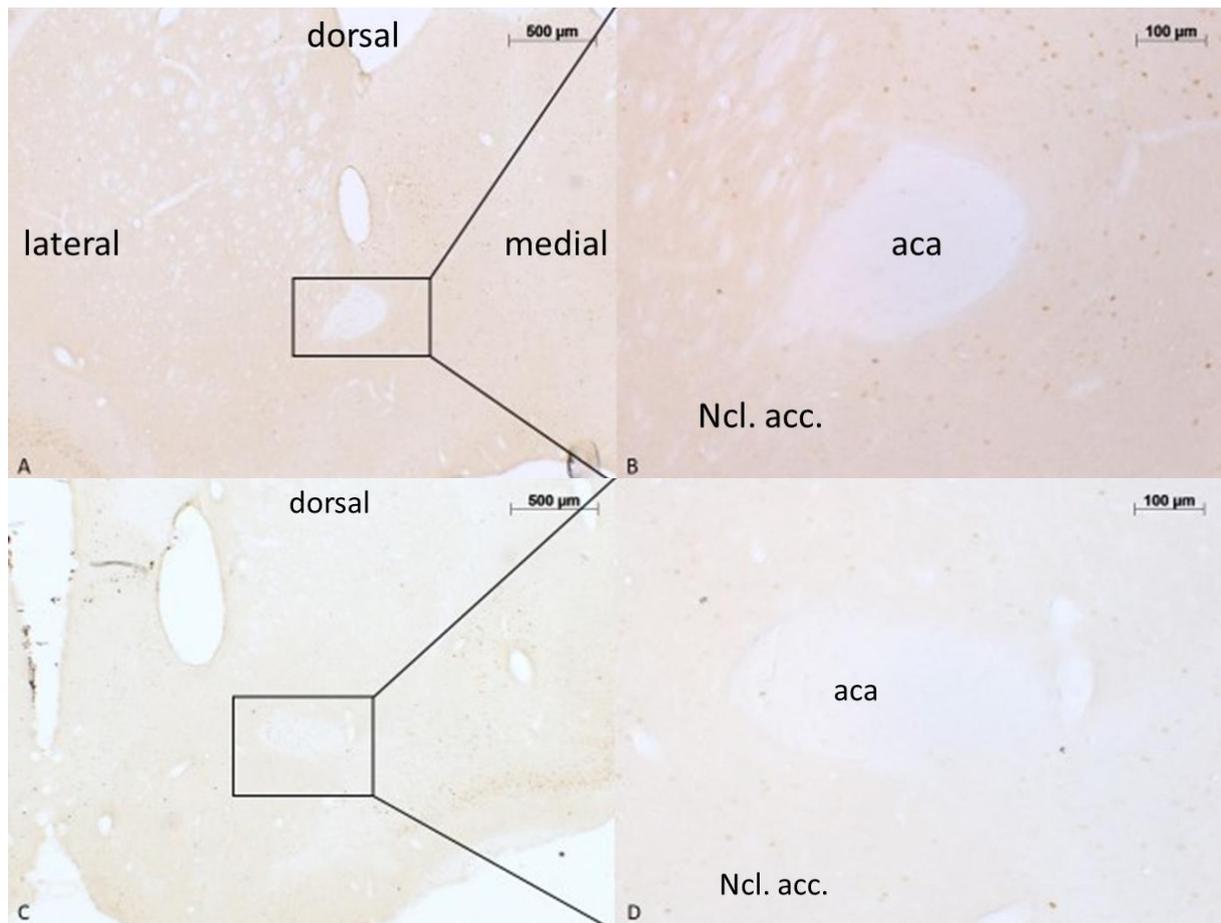


Abbildung 22: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des Ncl. acc., die immunhistochemisch auf ihre c-Fos-Synthese untersucht wurden. (A, B) Modafinilbehandlung ohne Sampling; (C, D) Modafinilbehandlung mit Sampling. Aca = Commissura anterior (anteriorer Anteil); Ncl. acc. = Nucleus accumbens

Abbildung 23 zeigt die statistische Auswertung der Anzahl der c-Fos positiven Zellkerne im Striatum. Die Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests ergab einen p-Wert von 0,0317, sodass Dunn's *Post-hoc*-Test für genauere Analysen folgen konnte. Dabei zeigte sich, dass unter Placebo-Behandlung das Sampling die Anzahl der c-Fos positiven Nuclei signifikant erhöhte ($p = 0,012$). Dieser Effekt konnte bei Modafinilbehandlung nicht gezeigt werden ($p > 0,99$).

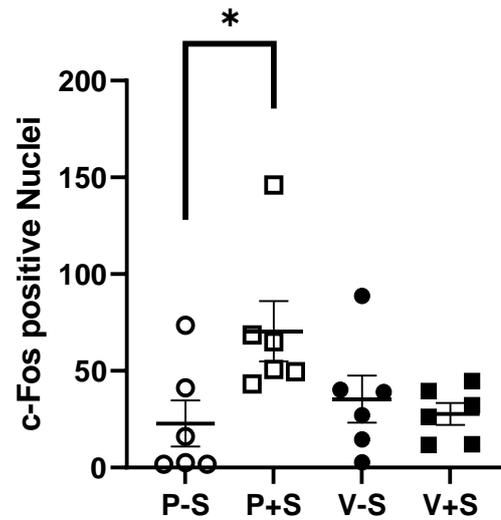


Abbildung 23: Zahl der c-Fos positiven Nuclei im Striatum (Mittelwerte + SEM) $n = 6$ pro Gruppe; -S = ohne Sampling; +S = mit Lernsession; P = Placebo; V = Verum, * $p < 0,05$

Die Abbildungen 24 und 25 zeigen repräsentative Mikroskopaufnahmen von Frontalschnitten auf der Ebene des Striatums von Tieren der Gruppen in Übersicht in 5- und im Fokus in 40-facher Vergrößerung. In der Nahaufnahme wurden alle dunkleren Kerne mit Ausnahme des Endothels als c-Fos positive Zellkerne gewertet.

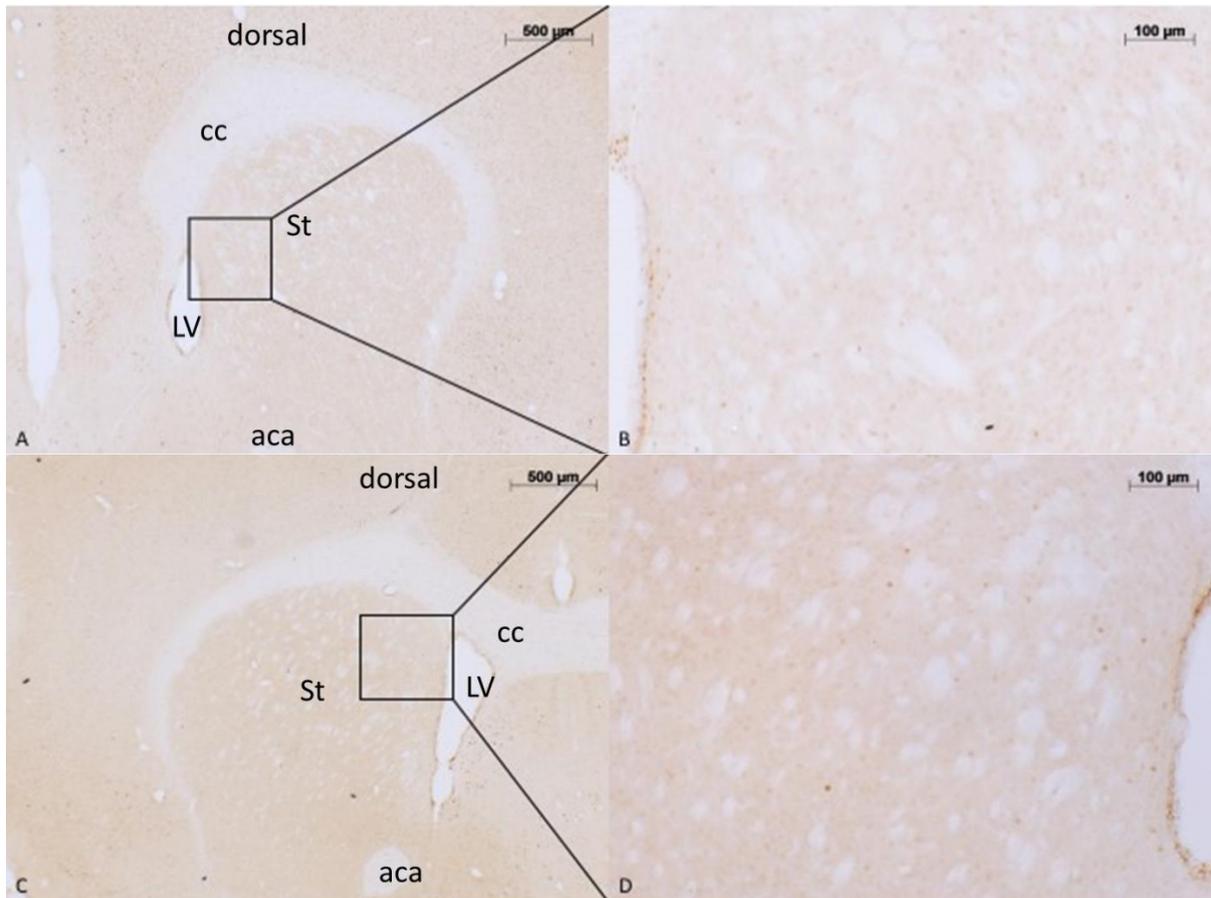


Abbildung 24: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des Striatums, die immunhistochemisch auf ihre c-Fos-Synthese untersucht worden sind. (A, B) Placebobehandlung ohne Sampling; (C, D) Placebobehandlung mit Sampling. Aca: Commissura anterior (anteriorer Anteil); cc: Corpus callosum; LV: lateraler Ventrikel; St: Striatum

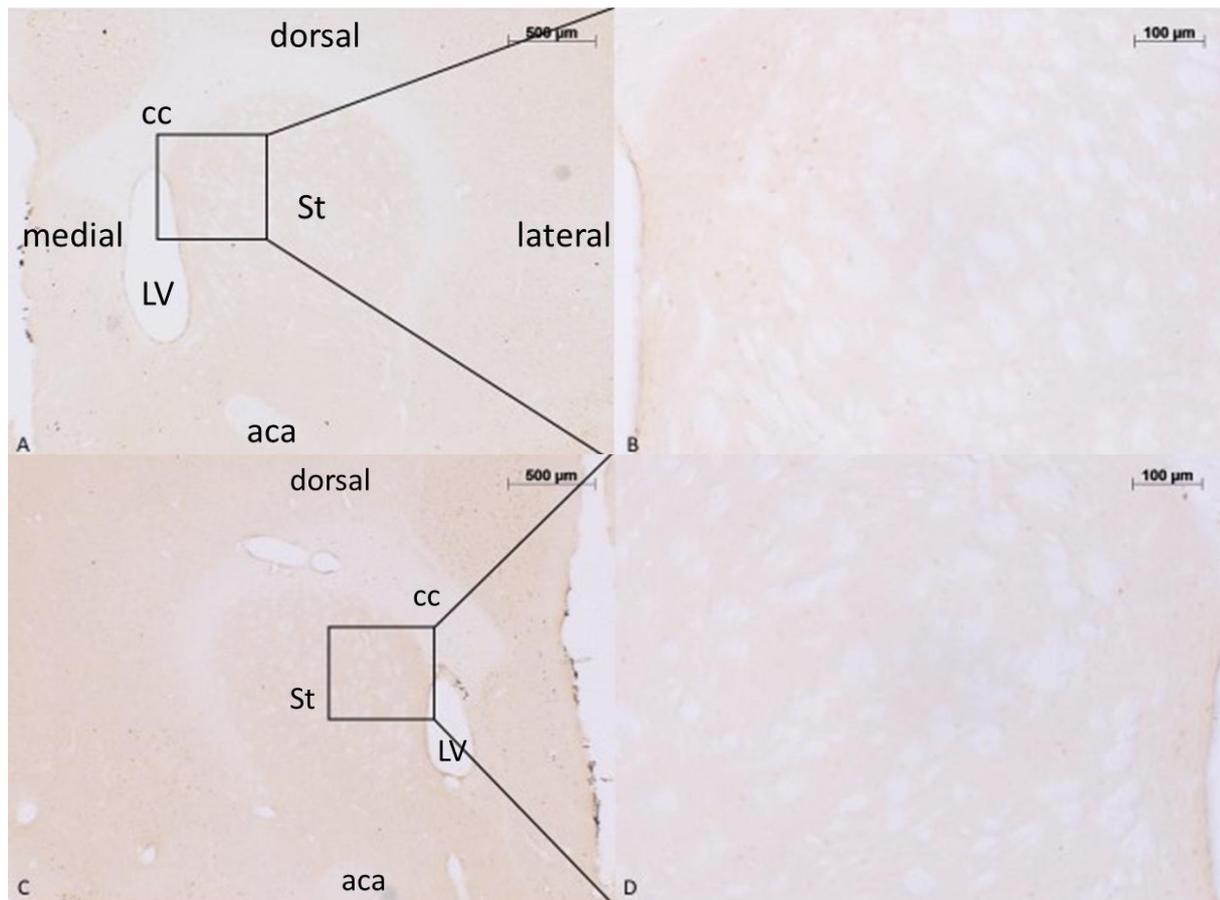


Abbildung 25: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des Striatums, die immunhistochemisch auf ihre c-Fos-Synthese untersucht wurden. (A, B) Modafinilbehandlung ohne Sampling; (C, D) Modafinilbehandlung mit Sampling. Aca: Commissura anterior (anteriorer Anteil); cc: Corpus callosum; LV: lateraler Ventrikel; St: Striatum

Die statistische Auswertung der Anzahl der c-Fos positiven Zellkerne im PFC von VT zeigt Abbildung 26. Der Kruskal-Wallis-Test ergab für diese Gruppen einen p-Wert von 0,0043. Daraufhin wurde der *Post-hoc* Test angewendet. Die statistische Analyse ergab eine Signifikanz ($p = 0,038$) bei den mit Placebo behandelten Gruppen. Zusätzlich konnte eine signifikante Erhöhung ($p = 0,027$) der c-Fos positiven Nuclei durch Sampling zwischen den mit Modafinil behandelten Gruppen nachgewiesen werden. Es lässt sich ein erheblicher Unterschied in den SEM zwischen den Placebogruppen auf der einen Seite und den Modafinilgruppen auf der anderen Seite erkennen.

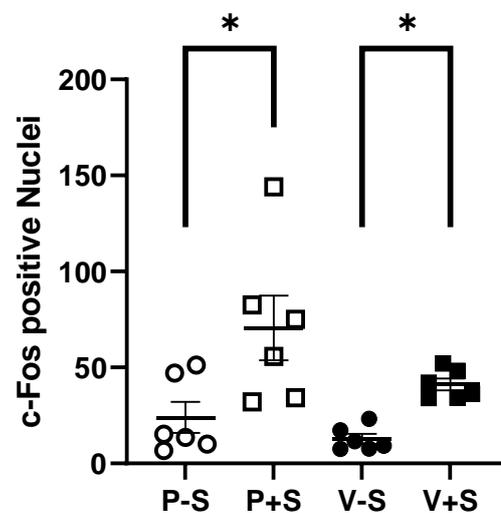


Abbildung 26: Zahl der c-Fos positiven Nuclei des PFC (Mittelwerte + SEM) $n = 6$ pro Gruppe, -S = ohne Sampling; +S = mit Lernsession; P = Placebo; V = Verum, * $p < 0,05$

Die Abbildungen 27 und 28 zeigen repräsentative Mikrofotografien von Frontalschnitten des PFC als Übersicht und im Fokus der Gruppen A-D (siehe **Tabelle 2**). Alle im Bildbereich der Nahaufnahme vorkommenden dunkleren Zellkerne wurden als c-Fos positiv gewertet.

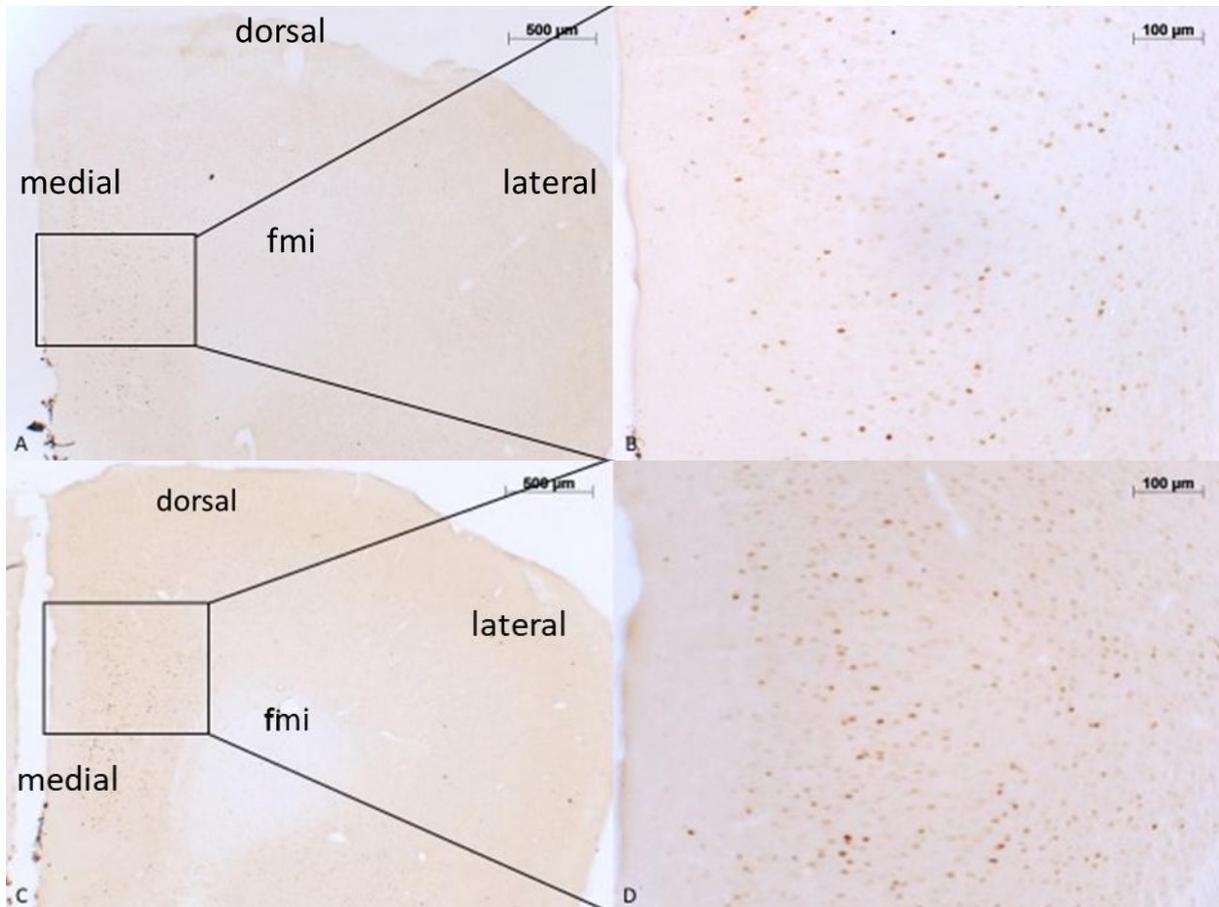


Abbildung 27: Mikroskopische Aufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des PFC, die immunhistochemisch auf ihre c-Fos-Synthese untersucht wurden. (A, B) Placebobehandlung ohne Sampling; (C, D) Placebobehandlung mit Sampling. Fmi = forceps minor

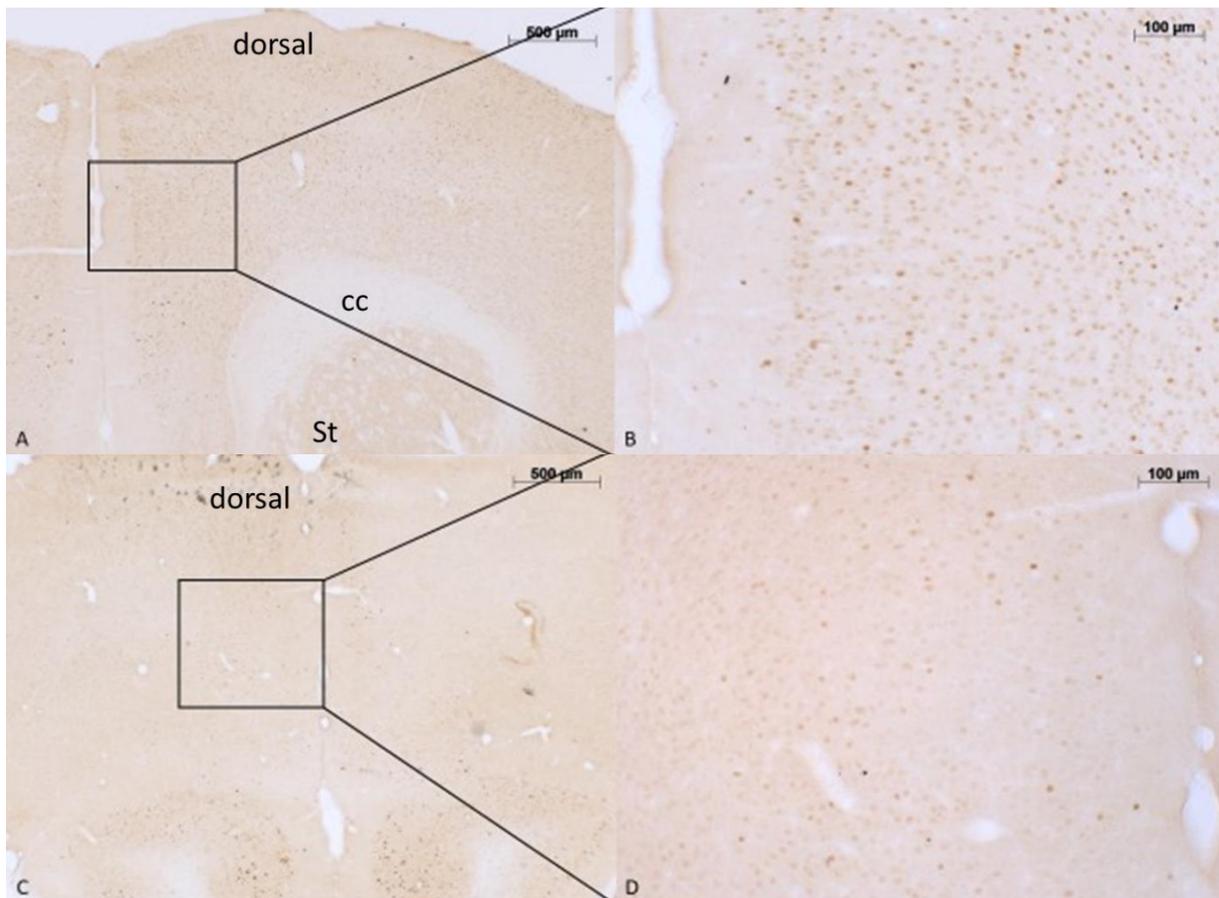


Abbildung 28: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des PFC, die immunhistochemisch auf ihre c-Fos-Synthese untersucht wurden. (A, B) Modafinilbehandlung ohne Sampling; (C, D) Modafinilbehandlung mit Sampling. Cc= Corpus callosum; Fmi = forceps minor; St = Striatum

3.3 Studie 3: Dopaminerges System und Zellinduktion

3.3.1 Immunhistochemische Färbung des Dopamin₁-Rezeptors

Die Immunhistochemie mit den drei D1RD-AK wurde zweimalig durchgeführt. Dabei kam es in beiden Versuchen zu keinem für die D1RD-Lokalisierung typischen Färbemuster für das untersuchte Hirnareal. Diese hätten Synapsen und „*shadow cells*“ (durch gefärbte Umgebung indirekt sichtbare Zellen) darstellen und in entsprechenden dopaminergen Arealen vorhanden sein müssen. Im Gegensatz dazu zeigte die IHC für Parvalbumin das erwartete Färbemuster. Abbildung 29 zeigt repräsentativ die Ergebnisse dieser IHC als Übersichtsaufnahme in 5- und im Fokus auf das Striatum in 40-facher Vergrößerung. Die Bilder der IHC mit sc-1434 AK und sc-14001 AK sowie weitere von sc-31478 AK befinden sich im Anhang (Kapitel 12.7).

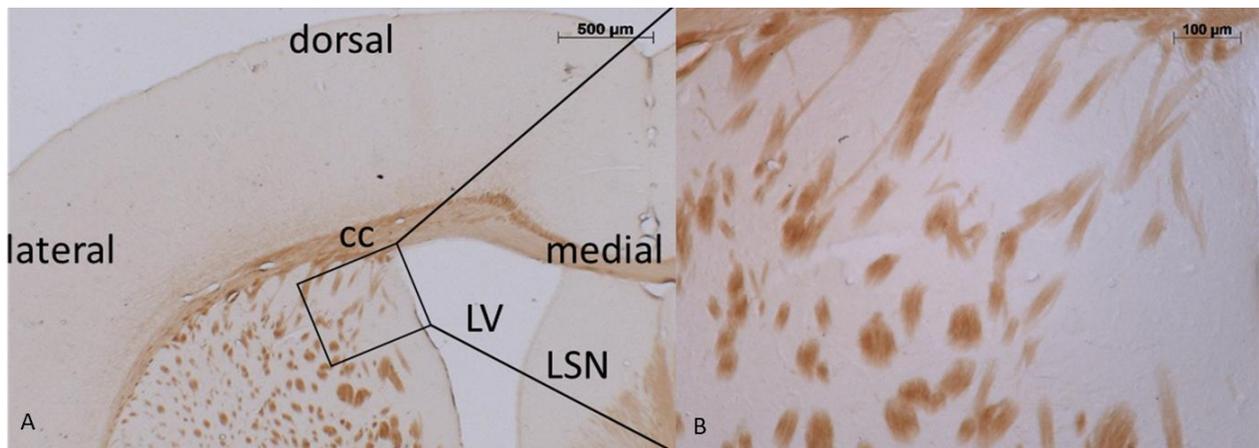


Abbildung 29: Mikroskopische Aufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des Striatums, die immunhistochemisch auf Dopaminrezeptor 1, in diesem Fall mittels sc-31478-AK, untersucht wurden. **A:** Übersichtsaufnahme (5-fache Vergrößerung); **B:** Nahaufnahme Striatum (40-fache Vergrößerung). Cc = Corpus callosum; LSN = laterale nuclei septales; LV = lateraler Ventrikel. Verdünnung 1:500

3.3.2 Immunhistochemischer Nachweis der Tyrosinhydroxylase

Die Abbildung 30 zeigt repräsentative Aufnahmen eines Frontalschnittes im Bereich des Nucleus paraventricularis hypothalamicus. Mittels TH-IHC wurden Somata die im Bereich des Hypothalamus mit dem dritten Ventrikel visualisierbar gemacht. Weitere Fotografien befinden sich in Kapitel 12.8.

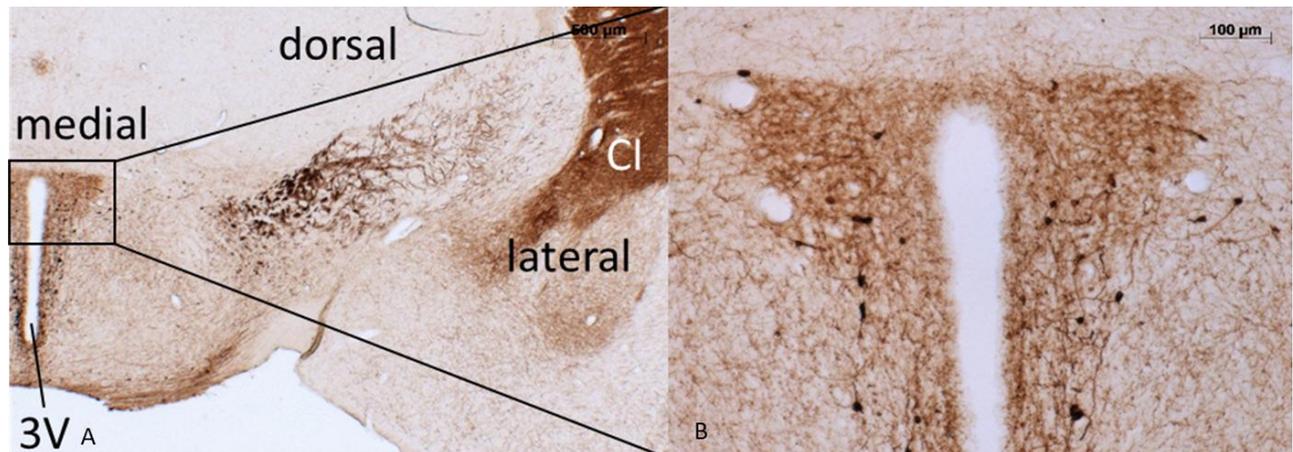


Abbildung 30: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten um den dritten Ventrikel, die immunhistochemisch auf Tyrosinhydroxylase mittels AB 152-AK untersucht wurden. **A:** Übersichtsaufnahme (5-fache Vergrößerung); **B:** Nahaufnahme des dritten Ventrikels (40-fache Vergrößerung). 3V = dritter Ventrikel; CI = Capsula interna. Verdünnung 1:1000

3.3.3 Fluoreszenzmarkierung von c-Fos und TH mittels PAK

Im Konfokalmikroskop stellte sich die Färbung mit dem TH-AK und DAPI als spezifisch visualisierbar dar. Abbildung 31 zeigt repräsentative Frontalschnitte auf Höhe des Ncl. acc., aufgenommen mit unterschiedlicher Anregungswellenlänge. Die Markierung für TH wurde rot, die für c-Fos grün und die DAPI-Färbung blau dargestellt. Der primär Immunfluoreszenz-markierte c-Fos-AK produzierte nur ein Signal außerhalb der Zellkerne. In der DAPI-Färbung sind einzelne Zellkerne zu erkennen.

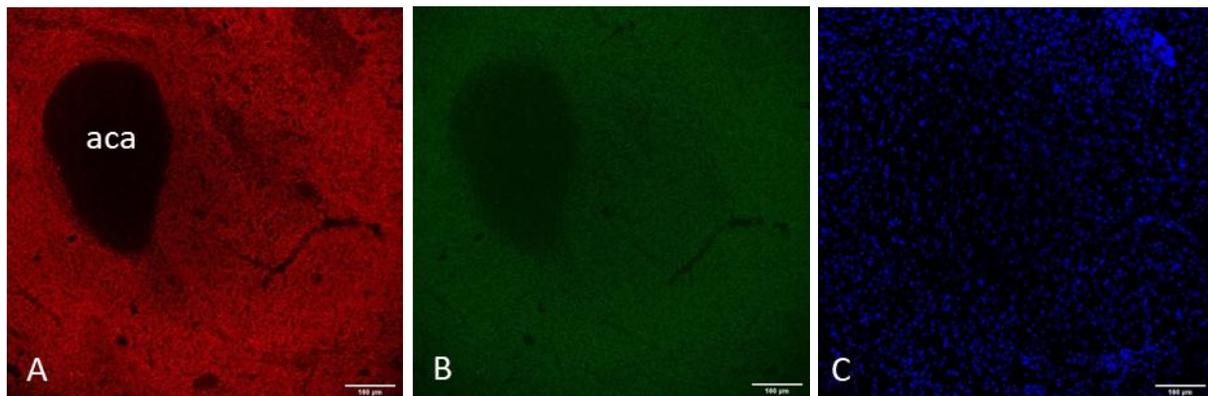


Abbildung 31: Fluoreszenzaufnahmen der Commissura anterior (aca) mit Teil des Ncl. acc.; **A:** rot = TH-AK; **B:** grün = c-fos-AK; **C:** blau = DAPI-Färbung

3.3.4 Fluoreszenzmarkierung mittels TH-PAK und c-Fos-SAK

In den Abbildungen 32–34 sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Frontalschnitten auf Höhe des Ncl. acc. zu erkennen. Da, mit Ausnahme von DAPI, mit anderen Farbstoffen als im vorigen Kapitel gearbeitet wurde, ist darauf zu achten, dass hier die c-Fos-SAK rot und TH-PAK grün fluoreszieren. Abbildung 33 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des Ncl. acc. mit rot markierten Nuclei (c-Fos) und grün gefärbten Somata (TH). In Abbildung 34 sind die doppelt gefärbten Zellen zu sehen.

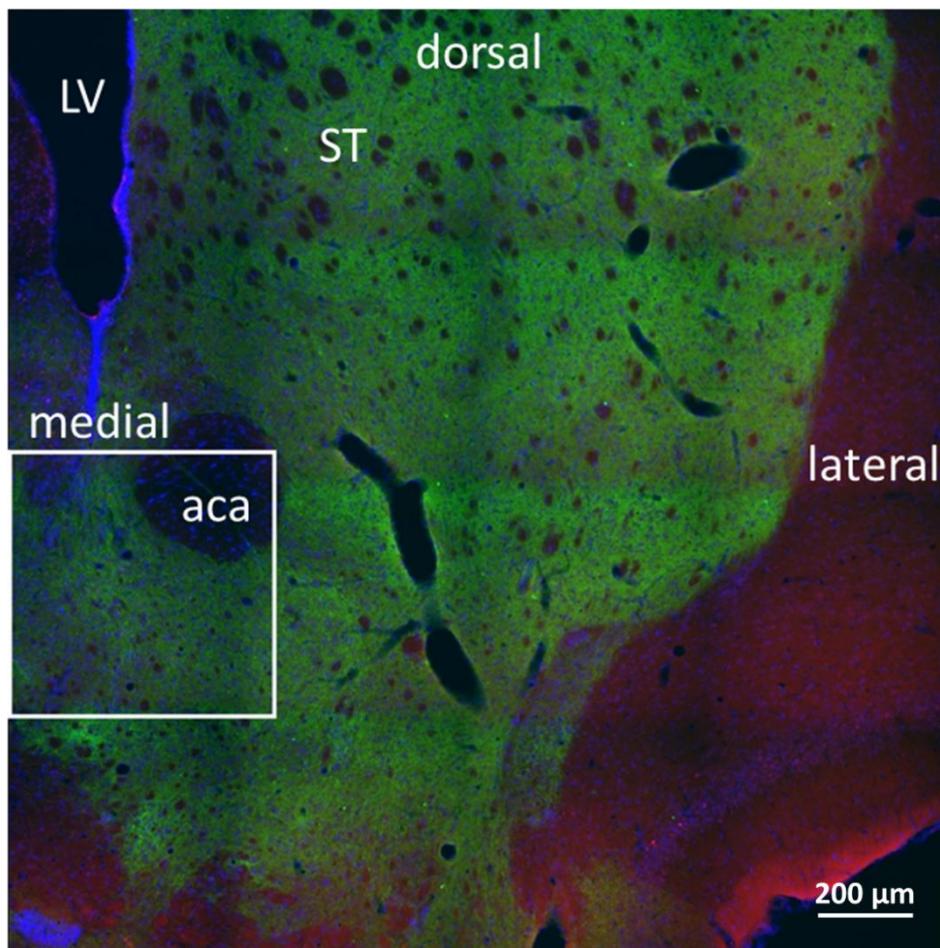


Abbildung 32: Übersichtsaufnahme (Kachelbild) der Commissura anterior mit Ncl. acc. = rot: c-Fos-SAK; grün = TH-PAK; blau = DAPI-Färbung; der weiße Rahmen stellt den Bereich der Nahaufnahme dar, die in Abbildung 34 gezeigt wird. Aca = Commissura anterior (anteriorer Anteil); LV = lateraler Ventrikel; ST = Striatum

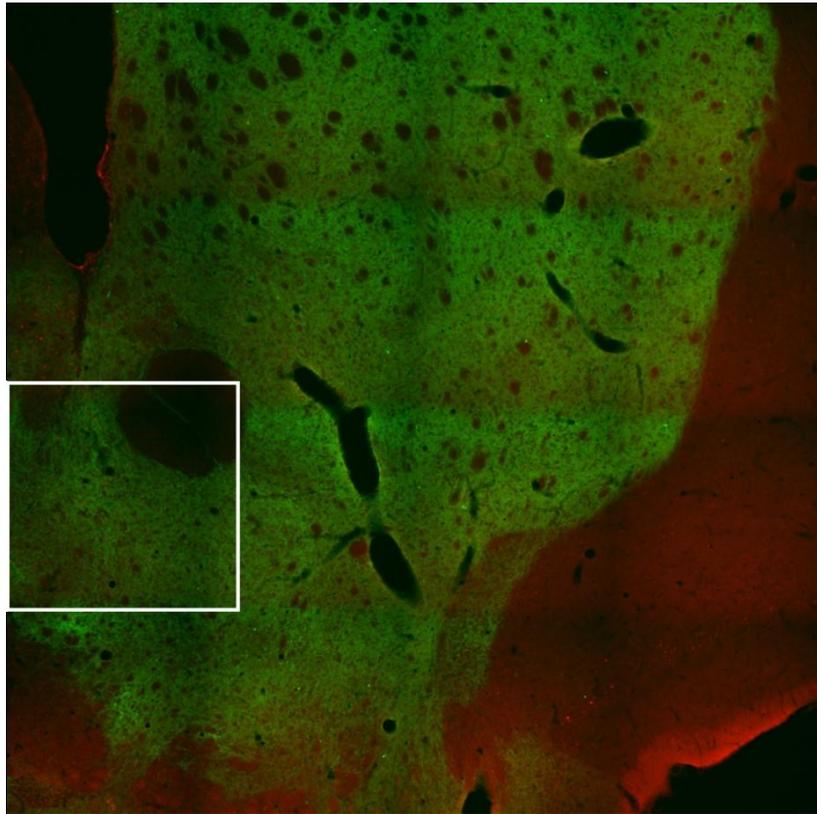


Abbildung 33: Übersichtsaufnahme der Commissura anterior mit Ncl. acc.; rot = c-Fos-SAK; grün = TH PAK; weißer Rahmen stellt Bereich der Nahaufnahme dar, die in Abbildung 34 gezeigt wird.

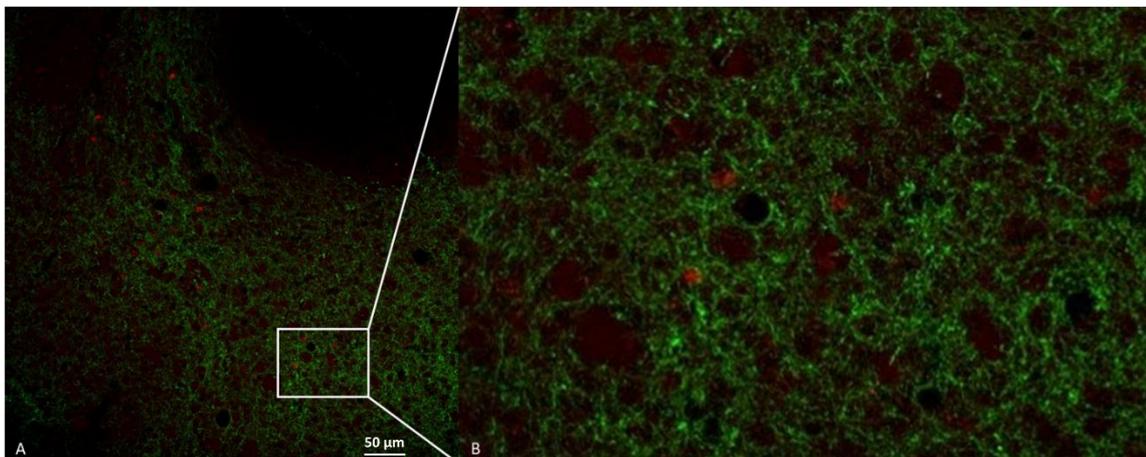


Abbildung 34: Vergrößerte Aufnahme (A) und Nahaufnahme (B) der Commissura anterior mit Teil des Ncl. acc.; rot = c-Fos-SAK; grün = TH PAK

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung des atypischen Dopamintransporter-Hemmers Modafinil auf den SDT, die *De-novo*-Proteinbiosynthese des IEG c-Fos im zentralnervalen dopaminergen System von Mäusen (*Mus musculus*). Die Wirkung von Modafinil wurde in Verhaltensversuchen im SDT mit verschiedenen Applikationszeiten durchgeführt. Dabei wurde die Untersuchungszeit und die Aktionszeit von Aggression und Sexualverhalten aufgezeichnet. Dadurch sollten Rückschlüsse über die Lern- und Gedächtnisleistung einerseits und die eventuellen Nebenwirkungen von Modafinil andererseits gezogen werden. Mithilfe eines c-Fos-AK wurde in mehreren immunhistochemischen Versuchen die *De-novo*-Proteinbiosynthese in verschiedenen Hirnarealen quantifiziert. Die dafür verwendeten Hirnschnitte entstammten Tieren, die sowohl mit Modafinil als auch mit Placebo (DMSO) und mit oder ohne Lernsession, in Form einer Begegnung mit einem ST (Sampling), behandelt wurden. Die durch c-Fos markierten Nuclei wurden anschließend quantitativ in verschiedenen Hirnarealen ausgewertet. Um eine Verbindung zwischen der Proteinbiosynthese und dem dopaminergen System herzustellen, wurden Antikörper gegen c-Fos und das dopaminerge System genutzt. Dafür wurden zuerst Frontalschnitte mit drei verschiedenen DRD1-AK behandelt. Es kam bei diesen AK zu keinem zufriedenstellenden Ergebnis, da keine für die D1RD typischen Lokalisationen gefärbt wurden. Nach erfolgreichem Test mit einem TH-AK wurde dieser daraufhin weiterverwendet. Für den ersten Versuch einer Doppelfärbung wurden c-Fos und TH AK mithilfe eines Labeling Kits fluoreszierend gemacht und anschließend primär aufgebracht. Dabei konnte keine spezifische Färbung des c-Fos-AK erreicht werden. Eine weitere Doppelfärbung wurde mit einem primär fluoreszierenden TH-AK und einem c-Fos-AK gekoppelt an einen fluoreszierenden SAK erfolgreich durchgeführt. Die Auswertung der Doppelfärbungen war in dieser Arbeit qualitativer Natur.

4.1 Methodische Überlegungen und Grenzen der Studie

Auch diese Studie unterliegt methodischen Einschränkungen, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen und deshalb vorangestellt werden. Bei der Auswertung aller Daten wurden keine „Ausreißer“ entfernt, weil bei der Versuchsdurchführung genau auf die strikte Einhaltung aller kontrollierbaren Parameter geachtet wurde und es deshalb keinen Anhaltspunkt für die Eliminierung von Daten einzelner Tiere gab. So wird der SDT in unserem Labor seit 20 Jahren mit einem Routineprotokoll durchgeführt (Richter et al. 2005; Hädicke und Engelmann

2013). In den Vortests zeigten Tiere die erwartbaren Leistungen bezüglich des Wiedererkennens (Abb. 4 ohne Interferenz) und des Nicht-Wiedererkennens (Abb. 5 mit Interferenz). Wie aus Abb. 9 und 10 ersichtlich ist, war die Wiedererkennungslleistung der Tiere in den Nachtests identisch mit der der Vortests, weswegen die Ergebnisse mit Behandlung (Verum und Placebo) primär dieser zugeschrieben werden können. Eine Erklärung für die Inhomogenität der Ergebnisse könnte die Interaktion der Behandlung mit den testspezifischen Limitationen des SDT liefern: Einerseits belegen unveröffentlichte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, dass es „attraktive“ ST gibt, die im Choice von den VT stets länger untersucht werden als das zweite, simultan präsentierte ST (Camats-Perna und Engelmann, unveröff.) und so das Ergebnis durch einen „zufälligen“, *a priori* schwer kontrollierbaren Parameter beeinflusst werden. Dies könnte unter anderem mit dem jeweiligen Geschlecht des ST zusammenhängen und bedarf weiterer Untersuchungen. Um diese „Zufallsgröße“ zu minimieren, werden bevorzugt größere Gruppenstärken mit 20 Tieren pro Behandlungsgruppe genutzt und kritische Versuche in separaten Experimenten validiert. Letzteres konnte aus tierschutzrechtlichen und Kapazitätsgründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass die z. T. schwer interpretierbaren Ergebnisse der Behandlung auch dem „zufälligen“ und schwer kontrollierbaren Parameter der „ST-Attraktivität“ geschuldet sind. Andererseits könnten die hier vorgenommenen Behandlungen mit Placebo und Verum auch andere die Untersuchungsmotivation und/oder die Bildung der Gedächtnisspur mitbestimmende Parameter beeinflusst haben. Interessant ist, dass die Injektionen vor dem Sampling bei beiden Placebobehandlungen zur (scheinbaren) Blockade der Interferenz führten (Abb. 6 und 8), nicht aber die Applikation unmittelbar danach (Abb. 7). Möglicherweise erlaubt der SDT aufgrund seiner versuchsintrinsischen Parameter die Detektion von behandlungsspezifischen Effekten, die bei anderen, auf assoziativen und damit mit starken Belohnungs- und Strafreizen arbeitenden Test nicht sichtbar sind.

Die c-Fos-IHC ist zur Betrachtung der neuronalen Zellaktivität ein valides Mittel, das in vorherigen Studien im eigenen Labor und international etabliert wurde (Noack et al. 2010; Yang et al. 2019). Um die Versuchsbedingungen so reproduzierbar wie möglich zu gestalten, wurde das Hirngewebe für alle Gruppen am gleichen Tag immunhistochemisch behandelt. In den c-Fos-Untersuchungen wurden pro Tier und Areal vier Schnitte ausgezählt und ein Mittelwert gebildet, um die Aussagekraft weiter zu erhöhen. Auch hier wurden, wie schon bei den Verhaltensdaten, keine vermeintlichen „Ausreißer“ eliminiert. Leider konnte der AOB nicht von allen perfundierten Tieren analysiert werden. Aufgrund der filigranen Verbindung von max. 2mm

zum Hirn (Franklin und Paxinos 2008) wurde der *Bulbus olfactorius* bei der Hirnentnahme teilweise beschädigt und konnte nicht geschnitten werden. Das schränkt die Repräsentativität der untersuchten Schnitte für das Hirnareal des *Bulbus olfactorius* ein.

Die Präsentation der Ergebnisse aus den Doppelmarkierungsversuchen wird nur qualitativ dargestellt, da die Größe der Stichprobe in der vorliegenden Arbeit keine quantitative Auswertung erlaubte. Tatsächlich hatte dieser Teil der Arbeit einen sondierenden Charakter, denn es sollten erste Versuche unternommen werden, das dopaminerge System mit Blick auf eine spätere Doppelfärbung mit c-Fos darzustellen.

Die Doppelfärbung von c-Fos und TH mit fluoreszenzmarkierten PAK misslang. Das Ergebnis der TH-Färbung entsprach dem zu erwartenden Muster, doch konnte exprimiertes c-Fos nicht eindeutig den Zellkernen zugeordnet werden. Die Ursache dafür konnte im Rahmen der Arbeit nicht geklärt werden. Fehlerquellen reichen von der Verdünnung des AK bis hin zu einer fehlenden Zugänglichkeit des Zellkerns. Letztere Fehlerquelle könnte mit der Modifikation des Standardprotokolls zusammenhängen, dass normalerweise eine Methanolbehandlung beinhaltet, die bei dieser Doppelfärbung weggelassen werden musste. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Versuch mit primär fluoreszierendem TH-AK und dem c-Fos-PAK mit fluoreszierendem SAK durchgeführt. Hierbei wurde der TH-PAK im Spektrum gelabelt. Anschließend wurde dieser zusammen mit dem c-Fos-AK aufgetragen. In diesem Versuch wurde Methanol verwendet. Im Anschluss wurden fluoreszierende anti-Kaninchen-Cy3-SAK verwendet, um den c-Fos-AK im Konfokalmikroskop sichtbar zu machen. Bei dieser Färbung konnte markiertes c-Fos eindeutig den Zellkernen zugeordnet werden. Warum die vorherige Doppelmarkierung mit primär fluoreszierenden AK nicht funktionierte, kann nicht mit Sicherheit bestimmt werden und bedarf weiterer Untersuchungen. Anteil am Erfolg des zweiten Ansatzes könnte die höhere Sensitivität der indirekten Methode haben.

4.2 Diskussion der Verhaltensergebnisse

Bei den Verhaltensexperimenten konnte unter Verumeinfluss in Versuch A (siehe Tab. 1) eine signifikant kürzere Investigationszeit des bekannten ST im Vergleich zum unbekanntem ST während Choice gezeigt werden (Abb. 6). Dieses Ergebnis wurde auch bei der Applikation von Placebo beobachtet (Abb. 6). Laut Engelmann (2009) sollte es ohne Behandlung nicht zum Wiedererkennen kommen, solange die Interferenz innerhalb von 18 Stunden – hier drei Stunden – nach dem Sampling stattfand. Bisherige Arbeiten deuten darauf hin, dass ein Zusammenhang in der für die Konsolidierung des sozio-olfaktorischen Langzeitgedächtnisses wichtigen Proteinsynthese besteht,

die nach 18 Stunden abgeschlossen ist (Richter et al. 2005; Wanisch et al. 2008). In den hier durchgeführten Experimenten scheint die reine Behandlung 30 Minuten vor dem Sampling – ob Verum oder Placebo – trotz einer retroaktiven Interferenz einen stabilisierenden Effekt (bspw. Blockierung der Interferenz) auf das sozioolfaktorische Wiedererkennungsgedächtnis gehabt zu haben. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Placebowirkung könnte in der interindividuellen Investigationsfreudigkeit der VT und /oder der oben genannten „ST-Attraktivität“ liegen. Es könnte sich auch um placebointrinsische Effekte handeln, da eine solche Wirkung aus keinen anderen Arbeiten bekannt ist. Die Wirkung von Modafinil entspricht den Ergebnissen von Ebner et al. (2022). Dort wurde das Modafinilanalogue CE-158 eine Stunde vor Sampling appliziert (jedoch mit der Trägersubstanz Kolliphor anstatt DMSO). Die Behandlung direkt nach dem Sampling (Versuch B, siehe Tab. 1) führte in beiden Behandlungsgruppen zu keinem signifikanten Wiedererkennen, wobei in der Placebogruppe das bereits präsentierte ST anschließend länger untersucht wurde, als das nicht präsentierte. Die Daten zeigen, dass die Modafinilgabe nach der Lernsession die Gedächtnisspur nicht unempfindlich gegenüber der experimentell induzierten Interferenz machte (siehe Abb. 7). Vergleichbar wirkungslos blieb das Modafinilanalogue CE-158 bei Injektion 60 Minuten nach dem Sampling (Ebner et al. 2022), obwohl die Behandlung vor dem Sampling dazu geführt hatte, dass die Exposition des Interferenz-ST das Wiedererkennen des „bekannten“ ST nicht unterdrückte. Diese Befunde implizieren, dass Modafinil (und ähnliche Substanzen) die Gedächtnisspur nur dann stabilisieren und gegen Interferenz unempfindlich machen, wenn sie während des Samplings wirken, also davor appliziert wurden. Weitere Untersuchungen müssten zeigen, welche Dauer zwischen Applikation und Sampling indiziert ist, um einen stabilisierenden Effekt zu erhalten.

Im Versuch C (siehe **Tabelle 1**) wurde DMSO (s. c.) durch Kolliphor (i. p.) ersetzt, da DMSO im Verdacht steht, unspezifische Effekte auf neuronaler Ebene zu verursachen (Hanslick et al. 2008). Die Behandlung mit dem Verum eine Stunde vor dem Sampling führte nicht zum Wiedererkennen, wohingegen unter Placebobehandlung (Kolliphor) wiedererkannt wurde (siehe Abb. 8). Das Ergebnis der Placebobehandlung könnte man als stabilisierenden Effekt auf die Gedächtnisspur und/oder die Blockade der Interferenz interpretieren. Eine ähnliche Wirkung des Placebos gab es auch bei rac-CE-123 (Camats-Perna et al. 2019). Dabei beobachteten die Autoren bei einem vergleichbaren Versuchsaufbau ebenfalls ein Wiedererkennen unter Placebobehandlung, allerdings wurde die Interferenz nicht drei (wie hier), sondern sechs Stunden nach dem Sampling durchgeführt. Ein derartiger „Placebo-Effekt“ ist jedoch aus keiner weiteren Studie bekannt, in der ein ähnlicher oder gleicher Versuchsaufbau und Placebo angewendet

wurde, weder in publizierten (Engelmann 2009; Ebner et al. 2022), noch in unpublizierten Studien (Engelmann, Murau und Mohrmann, unveröff.). Weitere Studien müssen klären, inwieweit die unter 4.1 dargestellten intrinsischen Limitationen der Methodik die Ergebnisse dieser Arbeit beeinflusst haben könnten.

Unseren Ergebnissen der Verumbehandlung steht das Modafinilanalogen CE-158 gegenüber. Ebner und Kollegen (2022) zeigten, dass eine Dosis von 10 mg/kg, nicht aber eine Dosis von 1 mg/kg, die eine Stunde vor dem Sampling appliziert wurde, das Engramm vor Interferenz, die sowohl drei als auch sechs Stunden nach dem Sampling provoziert wurde, schützen konnte. Diese Unterschiede in der Wirkweise lassen sich aus der Spezifität des CE-158 auf das dopaminerge System im Vergleich zu Modafinil begründen (Kalaba et al. 2020). So konnte bei gleichem Versuchsaufbau und gleichem Placebo (und damit gleichem Lösungsmittel für das Verum) CE-158 die Gedächtnisspur stabilisieren und gegen Interferenz schützen. Weitere Untersuchungen könnten zeigen, inwiefern eine höhere Dosierung von Modafinil, das Engramm vor Interferenz schützen kann, da die hier eingesetzte Modafinildosis möglicherweise zu gering war. Tatsächlich wurden pharmakologische Studien von Modafinil mit deutlich höheren Konzentrationen an Mäusen durchgeführt (Fiocchi et al. 2009; Willie et al. 2005). Da im ersten Versuch sowohl mit Verum als auch Placebo und im letzten Versuch nur mit Placebo trotz Interferenz das „bekannte“ ST wiedererkannt wurde, muss von placebointrinsischen Effekten ausgegangen werden. Bei Shuman und Kollegen (2009) konnte mittels Modafinilapplikation im Morris-Wasserlabyrinth und der Pavlov'schen Angstkonditionierung eine Verbesserung erzeugt werden, wobei nur vor den Lernsessions eingesetztes Modafinil zu einer Veränderung führte. Möglicherweise bedarf es betont emotionaler Stimuli im Lern- und Gedächtnistest („Stress“), damit Modafinil eine leistungsverbessernde Wirkung entfalten kann. Der SDT ist ein auf das intrinsische Untersuchungsverhalten basierender Test, bei dem eine „Stresskomponente“ vernachlässigbar gering ist (Engelmann et al. 2000). In Bezug auf die Nachtest lässt Modafinil keine Langzeitwirkung auf den SDT erkennen. Wie schon beschrieben, berichteten die Autoren einer vorangegangenen Studie kaum Veränderungen im agonistischen Verhalten (Aggression/Sexualität) durch den Einsatz von Modafinil (Machalova et al. 2012). Unsere Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass Modafinil keinen direkten Einfluss auf das agonistische Verhalten hat. Jedoch könnte dieser Verhaltensparameter helfen, die Ergebnisse der Untersuchungszeiten zu erklären. Die einzigen signifikanten Unterschiede der Aktionszeiten finden sich im Versuch C im Vergleich bei Placebobehandlung während des Samplings und Verumbehandlung während Choice. Möglicherweise überdeckte das erhöhte agonistische Verhalten während Choice die Detektion des „Wiedererkennens“ im Modafinilversuch. Weiterhin kam es

zu einem signifikanten Unterschied der Aktionszeiten während des Nachttests (ohne Modafinil) mit Interferenz. Eine mögliche Erklärung dafür findet sich in den in Kapitel 4.1 beschriebenen Limitationen.

4.3 Diskussion der c-Fos-Histologie

Der AOB besteht aus drei funktionellen Haupteinheiten: die vomeronasalen primären Sinneszellen in der vomeronasalen Schicht, die Mitralzellen und die Körnerzellen (Jia et al. 1999). Die IHC für c-Fos im Bereich der Körnerzellen von VT ergab für beide Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich von VT mit und ohne Lernsession (Abb. 14). Ebenso war die Anzahl der c-Fos positiven Zellkerne im Bereich der Mitralzellen des AOB bei Verum- und Placebobehandlung mit und ohne Lernsession nicht signifikant verschieden. Richter und Kollegen (2005) beschrieben einen signifikanten Anstieg der c-Fos positiven Zellkerne beider Subpopulationen des AOB bei unbehandelten VT nach Sampling im Vergleich zu solchen, die kein Sampling absolviert hatten. Nach unserem Wissenstand gibt es noch keine weiteren Erkenntnisse über die c-Fos-IHC im Bereich des AOB durch die Modafinilbehandlung. Die Modafinilbehandlung scheint hier einen „dämpfenden“ Effekt auf die c-Fos-Synthese zu haben, da es unter Einfluss des Verums zu keiner Änderung der Anzahl der c-Fos positiven Nuclei kam. Die methodischen Unterschiede zwischen der Studie von Richter und Kollegen (2005) und dieser Forschungsarbeit scheinen bei der Erklärung der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse von Bedeutung zu sein. So wurde in unseren Versuchen neben einer Injektion auch die Separation der VT verkürzt. Bei Richter und Kollegen (2005) wurden die VT bereits 12 h, bei uns nur 2 h vor der Lernsession aus der Gruppentierhaltung separiert. Die längere Separation bei Richter (2005) scheint nicht nur zu einer deutlichen Verringerung der Anzahl c-Fos positiver Zellkerne im AOB ohne ST-Exposition, sondern auch zu einer höheren Sensitivität für olfaktorische Stimuli geführt zu haben. Dadurch könnte die Detektion der Induktion der c-Fos-Synthese nach der Exposition zu einem ST leichter möglich.

Interessant ist, dass unter unseren Bedingungen unter Modafinilbehandlung sowohl im Körner- als auch im Mitralzellbereich eine geringere Schwankungsbreite der positiv markierten Zellkerne beobachtet werden konnte (siehe Abb. 14 und 17). Diese Verringerung könnte als interindividuelle „Schärfung“ der Anzahl an c-Fos positiven Zellkernen durch Modafinil im Sinne einer Schärfung des olfaktorischen Fingerabdruckes verstanden werden. Zwar scheint die Leistung der modafinilbehandelten VT im Verhaltensexperiment A dafür zu sprechen (Abb. 6; höhere Signifikanz als unter Placebo), doch spricht die Leistung der mit modafinilbehandelten Tiere im Verhaltensversuch C

insofern dagegen, als das trotz des „geschärften“ olfaktorischen Profils, die Sampling-ST nicht wiedererkannt wurden (Abb. 8). Es ist nicht auszuschließen, dass die kürzere Separationszeit (hier zwei versus 12 Stunden bei Richter und Kollegen (2005)) verbunden mit der Applikation von DMSO zu einer erhöhten c-Fos-Grundaktivität führte, die die Detektion einer darüberhinausgehenden Induktion der *De-novo*-c-Fos-Synthese durch ST-Exposition maskiert. Es bedarf in diesem Zusammenhang noch weiterer Untersuchungen – auch, um mögliche (toxische) Effekte von DMSO auf die Sensibilität von Neuronen für die Induktion der c-Fos-Synthese nach definierten Stimuli gründlicher zu beleuchten.

Im Bereich des Ncl. acc. konnte keine signifikant erhöhte Anzahl von c-Fos positiven Zellkernen zwischen den Modafinilgruppen festgestellt werden. Dies entspricht nicht den Untersuchungen von Gozzi und Kollegen (2012), die durch Modafinilbehandlung in Sprague-Dawley-Ratten eine erhöhte Zahl c-Fos positiver Nuclei in der Ncl. acc. *shell* (engl. = Schale) im Vergleich zu Placebo feststellten. Dabei ging es jedoch um eine reine Erhöhung durch eine Modafinilbehandlung und es wurden keine zusätzlichen Stimuli eingesetzt. Außerdem fand in der genannten Studie eine Applikation von Modafinil 100 min vor der Tötung statt und Modafinil war in der Konzentration 10 mg/kg intravenös verabreicht worden. Bekannt ist, dass Modafinilanaloga wie CE-158 die Konzentration von extrazellulärem Dopamin im Ncl. acc erhöhen (Ebner et al. 2022). Wir hatten die Hypothese, dass diese Konzentrationserhöhung nicht nur die lokale neuronale sekretorische Aktivität erhöht, sondern auch zu einer verstärkten *De-novo*-Synthese von c-Fos führt. Die hier vorgelegten Ergebnisse lassen vermuten, dass Modafinil diese Wirkung im Bereich des Ncl. acc. nicht entfaltet. Ursachen dafür könnten die geringere Affinität für Dopaminrücktransporter und eine gleichzeitige Konzentrationsänderung anderer Neurotransmitter wie Noradrenalin, Serotonin und GABA sein. Die Placebobehandlung führte in unserem Versuch zu einer signifikanten Erhöhung der c-Fos-positiven Zellzahl bei Vergleich mit oder ohne Lernsession (Abb. 20). Dies bestätigt die Ergebnisse der Untersuchungen von Ebner und Kollegen (2022), die dem Ncl. acc. eine entscheidende Rolle für das Gedächtnis und Lernen im Zusammenhang mit dem STD zuschreiben. Modafinil scheint im Ncl. acc. die „physiologische“ c-Fos-Erhöpfung zu dämpfen, da es unter Placebobehandlung zu der erwartbar erhöhten c-Fos-Synthese kam. Dies wäre eine für uns unerwartete Erkenntnis, die weiterer Untersuchungen bedarf.

Im Striatum erhöhte sich die Anzahl c-Fos-positiven Nuclei im Placeboversuch signifikant, nicht jedoch im Modafinilversuch. Auch bei Engber und Kollegen (1998) kam es bei reiner Behandlung mit Modafinil oder Placebo (Carbomethylcellulose) bei Sprague-Dawley Ratten zu keinem c-Fos Anstieg. Jedoch ist das Striatum an sozialer Interaktion

beteiligt (Ploeger et al. 1991; van Kerkhof et al. 2014) und damit war dort auch eine c-Fos-Erhöhung nicht unwahrscheinlich. Im PFC erhöhten sich sowohl durch Placebo als auch durch Modafinilgabe die c-Fos positiven Zellen signifikant. Für den medialen PFC, das Striatum und den Ncl. acc. fanden van Kerkhof und Kollegen (2014) heraus, dass die soziale Interaktion bei Wistar Ratten an sich zu einer Erhöhung der c-Fos positiven Zellen in diesen Bereichen führte. Dies spiegelt sich in unseren Placeboergebnissen wider und unterstützt ebenfalls die Daten von Richter und Kollegen (2005). Placebo scheint die c-Fos-Synthese in diesen Bereichen nicht zu beeinflussen. Mit Blick auf den PFC scheint Modafinil die c-Fos-Synthese nicht zu beeinflussen. Ebenfalls stellt sich hier der Eindruck einer „Schärfung“ durch Modafinil in Form eines geringeren SEM der c-Fos positiven Nuclei dar. Diese Eindrücke müssen in zukünftigen Experimenten näher untersucht werden.

4.4 Diskussion der Doppelfärbungen

Nachdem D1RD-AK in Einzelfärbungen nicht wie erwartet färbten, wurde die TH als nächster Marker für das dopaminerge System gewählt. In den Einzelversuchen stellte sich der TH-AK für diese Zwecke als geeignet heraus. Aufgrund der gleichen Herkunft (Kaninchen) wurden für die Doppelmarkierung zuerst beide AK einzeln markiert. In der anschließenden IHC entstanden keine für c-Fos typischen Zellkernfärbungen. Daraufhin wurde mit der Doppelfärbung von direkt gelabelten TH-AK und indirekt markierten c-Fos-AK gearbeitet. Damit ist der erste Schritt getan, routinemäßig die c-Fos-Markierung in direktem Zusammenhang mit TH-positiven Neuronen darzustellen. Das im Anhang beschriebene Protokoll kann als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dienen und könnte weiter modifiziert werden.

4.5 Verhalten und Histologie

In der vorliegenden Studie scheint Modafinil nicht, wie seine Analoga CE-158 (Ebner et al. 2022), rac-CE-123 und S-CE-123 (Camats-Perna et al. 2019), einen klaren Effekt im SDT zu haben. Aus der Literatur ist bekannt, dass bei chronischer Gabe von Modafinil keine Gedächtnisverbesserung im Objekterkennungstest bewirkt (González et al. 2018). Dieser Test hat Ähnlichkeit mit dem SDT. Anstelle der ST werden im Sampling dem VT zwei gleiche Objekte präsentiert. Im Choice stehen dem VT das im Sampling präsentierte und ein neues Objekt zur Auswahl. Bei Zuwendung zum neuen Objekt gilt das im Sampling präsentierte als wiedererkannt. Auch im Objekterkennungs-

test bei Garcia et al. (2013) unterschieden sich die modafinilbehandelten von den placebobehandelten VT hinsichtlich des Wiedererkennens nicht. Jedoch konnte ein durch Eisengabe verschlechtertes Wiedererkennungsgedächtnis sowohl durch akute als auch chronische Modafinilgabe verbessert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirkung von Modafinil als potenziellen „Neuroenhancer“ für die Stabilisierung einer Wiedererkennungsgedächtnisspur im SDT auf Verhaltens- und zellulärer Ebene zu charakterisieren. Die gewonnenen Ergebnisse lassen allerdings nur eng begrenzte Aussagen über die Modafinilwirkung zu: Zum einen waren die Ergebnisse der Verhaltensversuche inhomogen und sind deshalb schwer verallgemeinerbar. Zum anderen sind auch die Befunde der quantitativen immunhistochemischen Versuche nicht eindeutig interpretierbar. Die unter 4.1 geführte Diskussion bezüglich methodischer Limitationen und die erstmals gelungene Ko-Färbung von c-Fos und TH zeigen aber die Richtung auf, die in weiterführenden Studien verfolgt werden sollte.

4.6 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse der Verhaltensversuche und der Immunhistochemie in der vorliegenden Dissertation lassen keine eindeutigen Schlussfolgerungen zu. Jedoch lassen sich weitere Studien darauf aufbauen. Wie bereits beschrieben, scheint die hier gewählte Applikationsart und Konzentration von Modafinil nicht zu überzeugenden Ergebnissen zu führen. Die Wirkung von Modafinil auf Lernen und Gedächtnis ist noch Gegenstand der Forschung und es wurde sowohl von signifikanten (Esposito et al. 2013; Minzenberg et al. 2014) als auch von nicht signifikanten (Waters et al. 2005; González et al. 2018) Ergebnissen nach Modafinil-Gabe berichtet. Die Analoga von Modafinil, die sich durch eine höhere Affinität zum Dopamintransporter auszeichnen und ebenfalls einen weniger großen Noradrenalin- und Serotoninbezug haben, zeigen klarere Ergebnisse und scheinen für weitergehende Studien besser geeignet. Es konnten bereits signifikante Korrelationen zwischen solchen Analoga und der Leistung im SDT bei Mäusen ermittelt werden (Camats-Perna et al. 2019; Ebner et al. 2022). Man kann annehmen, dass eine höhere Spezifität des Pharmakons für das dopaminerge System und damit eine höhere extrazelluläre Konzentration von Dopamin damit zusammenhängt.

Bei der Erforschung des deklarativen Gedächtnisses über das Modell des sozioolfaktorischen Wiedererkennungsgedächtnisses empfehlen wir entweder eine deutlich höhere Modafinildosis – ähnlich wie bei Willie und Kollegen (2005) –, eine andere Applikationsart oder die Fokussierung auf die oben genannten Analoga. Modafinil scheint

bei einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht und dem hier gewählten Applikationsweg einen Gedächtnisinhalt (Engramm) nicht sicher gegen die retroaktive Interferenz zu schützen. Weiterhin sollte die Zeitspanne, in der die Applikation vor dem Sampling stattfindet, tiefgreifender untersucht werden. Nach unseren Daten und denen von Ebner (2022) wirkt sich die Applikation nach dem Sampling nicht auf die Leistung im SDT aus. Weiterhin könnten die intrinsischen Limitationen (wie die „ST-Attraktivität“) die den SDT beeinflussen in weiteren Studien näher untersucht werden, um weitere Einflussgrößen zu minimieren. Zusätzlich ist anzunehmen, dass eine Eradikation von „Ausreißen“, zu einer stabileren Statistik führen würde. Fraglich ist allerdings, welche Kriterien für eine derartige *Post-hoc*-„Bereinigung“ in den Daten gelten sollen. Bisher wurde davon immer abgesehen, so dass keinerlei empirische Daten in der Arbeitsgruppe vorliegen, die eine Auswahl begründen könnten.

Woher die von anderen Studien (Richter et al. 2005; Gozzi et al. 2012) verschiedenen Ergebnisse in der c-Fos-Quantifizierung kommen, lässt sich nicht mit Gewissheit sagen. Nicht auszuschließen ist, dass trotz aller Vorkehrungen Tiere, die für „Basalbedingungen“ getötet wurden, doch von außen gestört wurden, was die relativ hohe Anzahl von c-Fos-positiven Nuclei der Gruppe „P-S“ jeweils in Abbildungen 14 und 17 erklären könnte.

Die Doppelmarkierung mit einem primär markierten TH-AK und einem sekundär fluoreszierenden c-Fos-AK ist der erste Schritt zur Visualisierung einer Stimulus-spezifischen induzierten c-Fos-Expression im zentralnervalen dopaminergen System der Maus. Künftige Studien müssen folgen, in denen die Zuordnung der *De-novo*-Synthese von c-Fos zu dopaminergen Neuronen nach definierter Stimulation möglich ist. Es ist zu hoffen, dass dadurch die Erkennung von Neurontyp-spezifischen Synthesemustern in Antwort auf definierte Stimuli und Behandlungen möglich ist.

5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Modafinil auf das SWG von Mäusen auf Verhaltens- und neuronaler Ebene zu untersuchen. Dafür wurde der SDT und die immunhistochemische Färbungen in distinkten Bereichen des SWG genutzt. Dabei wurde postuliert, dass Modafinil die Gedächtnisspur gegen die angewendete retroaktive Interferenz im SDT stabilisiert. Modafinil wurde in diesen Versuchen zu drei verschiedenen Zeiten injiziert. Bei Applikation eine Stunde vor der Lernsession kam es im Placeboversuch zu signifikantem Wiedererkennen. Bei der Injektion 30 Minuten vor der Lernsession kam es sowohl bei Verum als auch bei Placebo zu signifikanten Ergebnissen während des SDT. Die Injektion direkt nach der Lernsession zeigte keinerlei Wirkung. Die Auswertung des gleichzeitig aufgezeichneten agonistischen Verhaltens zeigte keinen direkten Einfluss von Modafinil auf dieses Verhalten. Des Weiteren sollte auf histologischer Ebene gezeigt werden, dass es zu einer erhöhten Anzahl an c-Fos positiven Zellen in Teilen des vomeronasalen Systems im Vergleich von Lernsession zu Einzelhaltung kommt. Es wurden vier Gruppen mit je 6 Mäusen aufgestellt, die entweder mit Placebo oder Modafinil behandelt wurden. Dabei stellte sich heraus, dass es in den Subpopulationen des AOB (Mitralzellen und Körnerzellen) zu keiner signifikanten Veränderung zwischen Einzelhaltung und Lernsession kam. Im Bereich des Ncl. acc. und des Striatums wurde eine signifikante Erhöhung der c-Fos positiven Nuclei während des Placeboversuchs ermittelt. Modafinil scheint in diesen Bereichen die c-Fos-Proteinbiosynthese nicht induziert zu haben. Im PFC fanden sich sowohl bei Placebo- als auch bei Modafinilbehandlung signifikant mehr c-Fos positive Zellkerne bei Vergleich der Gruppen mit und ohne Lernsession. Insgesamt scheint Modafinil unter diesen methodischen Voraussetzungen nicht geeignet, das Engramm ausreichend gegen Interferenz zu schützen, was sich auch auf histologischer Ebene niederschlägt.

Weiterhin sollte die Verbindung zwischen c-Fos und dem dopaminergen System untersucht werden. Dazu wurden mehrere AK gegen das dopaminerge System untersucht. Von den drei verschiedenen D1RD AK färbte keiner die bereitgestellten Hirnschnitte (Frontalschnitte auf Höhe des Ncl. acc. und Striatum) zufriedenstellend. Die TH als Teil des katecholaminergen Systems wurde ebenfalls untersucht. Nach der erfolgreichen IHC sollten weitere Hirnschnitte mit einer Doppelmarkierung mit c-Fos und TH gefärbt werden. Die vorgenommene Doppelmarkierung konnte erfolgreich durchgeführt werden. Die Verbindung von TH markierten Synapsen und c-Fos markierten Zellkernen sind ein erster Schritt in dieser Richtung und sollten in weiteren

Studien eingehender untersucht werden. Dadurch könnten verschiedenste experimentelle Ansätze um die Beeinflussung des dopaminergen Systems und die Auswirkungen auf die damit verbundene Zellaktivität verfolgt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Alikaya, Aydin; Rack-Wildner, Mackenzie; Stauffer, William R. (2018): Reward and value coding by dopamine neurons in non-human primates. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 125 (3), S. 565–574. DOI: 10.1007/s00702-017-1793-9.
2. Aragona, Brandon J.; Liu, Yan; Yu, Y. Joy; Curtis, J. Thomas; Detwiler, Jacqueline M.; Insel, Thomas R.; Wang, Zuoxin (2006): Nucleus accumbens dopamine differentially mediates the formation and maintenance of monogamous pair bonds. In: *Nature neuroscience* 9 (1), S. 133–139. DOI: 10.1038/nn1613.
3. Arbuckle, Erin P.; Smith, Gregory D.; Gomez, Maribel C.; Lugo, Joaquin N. (2015): Testing for odor discrimination and habituation in mice. In: *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (99), e52615. DOI: 10.3791/52615.
4. Bahrami, Shahram; Drabløs, Finn (2016): Gene regulation in the immediate-early response process. In: *Advances in Biological Regulation* 62, S. 37–49. DOI: 10.1016/j.jbior.2016.05.001.
5. Battleday, R. M.; Brem, A-K (2015): Modafinil for cognitive neuroenhancement in healthy non-sleep-deprived subjects: A systematic review. In: *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 25 (11), S. 1865–1881. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2015.07.028.
6. Beier, Kevin T.; Steinberg, Elizabeth E.; DeLoach, Katherine E.; Xie, Stanley; Miyamichi, Kazunari; Schwarz, Lindsay et al. (2015): Circuit Architecture of VTA Dopamine Neurons Revealed by Systematic Input-Output Mapping. In: *Cell* 162 (3), S. 622–634. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.015.
7. Brignall, Alexandra C.; Cloutier, Jean-François (2015): Neural map formation and sensory coding in the vomeronasal system. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72 (24), S. 4697–4709. DOI: 10.1007/s00018-015-2029-5.
8. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (2015): Einfluss psychischer Belastungen am Arbeitsplatz auf das Neuroenhancement - empirische Untersuchungen an Erwerbstätigen. Forschung Projekt F 2283. Dortmund, Berlin, Dresden: Bundesanst. für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin.
9. Camats Perna, Judith; Engelmann, Mario (2016): Recognizing Others: Rodent's Social Memories. In: Markus Wöhr und Sören Krach (Hg.): Social behavior from rodents to humans. Neural foundations and clinical implications. Cham: Springer International Publishing (Current Topics in Behavioral Neurosciences Ser, v.30), S. 25–45.
10. Camats-Perna, Judith; Kalaba, Predrag; Ebner, Karl; Sartori, Simone B.; Vuyyuru, Harish; Aher, Nilima Y. et al. (2019): Differential Effects of Novel Dopamine Reuptake Inhibitors on Interference With Long-Term Social Memory in Mice. In: *Frontiers in behavioral neuroscience* 13, S. 63. DOI: 10.3389/fnbeh.2019.00063.

11. Cera, Nicoletta; Tartaro, Armando; Sensi, Stefano L. (2014): Modafinil alters intrinsic functional connectivity of the right posterior insula: a pharmacological resting state fMRI study. In: *PloS one* 9 (9), e107145. DOI: 10.1371/journal.pone.0107145.
12. Chamero, Pablo; Leinders-Zufall, Trese; Zufall, Frank (2012): From genes to social communication: molecular sensing by the vomeronasal organ. In: *Trends in neurosciences* 35 (10), S. 597–606. DOI: 10.1016/j.tins.2012.04.011.
13. Chiu, Robert; Boyle, William J.; Meek, Jennifer; Smeal, Tod; Hunter, Tony; Karin, Michael (1988): The c-fos protein interacts with c-JunAP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. In: *Cell* 54 (4), S. 541–552. DOI: 10.1016/0092-8674(88)90076-1.
14. Curtis, J.Thomas; Liu, Yan; Wang, Zuoxin (2001): Lesions of the vomeronasal organ disrupt mating-induced pair bonding in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). In: *Brain research* 901 (1-2), S. 167–174. DOI: 10.1016/s0006-8993(01)02343-5.
15. Daubner, Johanna; Arshaad, Muhammad Imran; Henseler, Christina; Hescheler, Jürgen; Ehninger, Dan; Broich, Karl et al. (2021): Pharmacological Neuroenhancement: Current Aspects of Categorization, Epidemiology, Pharmacology, Drug Development, Ethics, and Future Perspectives. In: *Neural plasticity* 2021, S. 8823383. DOI: 10.1155/2021/8823383.
16. Dewar, Michaela T.; Cowan, Nelson; Della Sala, Sergio (2007): Forgetting due to retroactive interference: a fusion of Müller and Pilzecker's (1900) early insights into everyday forgetting and recent research on anterograde amnesia. In: *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior* 43 (5), S. 616–634. DOI: 10.1016/s0010-9452(08)70492-1.
17. Doss, D.; Ohnesorge, F. K. (1966): Motilität und Krpertemperatur von Musen in verschiedenen Umgebungstemperaturen. In: *Pflgers Archiv* 289 (2), S. 91–97. DOI: 10.1007/BF00380408.
18. Ebner, Karl; Sartori, Simone B.; Murau, Rita; Kopel, Fabian; Kalaba, Predrag; Dragačević, Vladimir et al. (2022): The Novel Analogue of Modafinil CE-158 Protects Social Memory against Interference and Triggers the Release of Dopamine in the Nucleus Accumbens of Mice. In: *Biomolecules* 12 (4), S. 506. DOI: 10.3390/biom12040506.
19. Engber, T. M.; Koury, E. J.; Dennis, S. A.; Miller, M. S.; Contreras, P. C.; Bhat, R. V. (1998): Differential patterns of regional c-Fos induction in the rat brain by amphetamine and the novel wakefulness-promoting agent modafinil. In: *Neuroscience letters* 241 (2-3), S. 95–98. DOI: 10.1016/s0304-3940(97)00962-2.
20. Engelmann, M.; Wotjak, C. T.; Ebner, K.; Landgraf, R. (2000): Behavioural impact of intraseptally released vasopressin and oxytocin in rats. In: *Experimental physiology* 85 Spec No, 125S-130S. DOI: 10.1111/j.1469-445x.2000.tb00015.x.

21. Engelmann, Mario (2009): Competition between two memory traces for long-term recognition memory. In: *Neurobiology of learning and memory* 91 (1), S. 58–65. DOI: 10.1016/j.nlm.2008.08.009.
22. Engelmann, Mario; Hädicke, Jana; Noack, Julia (2011): Testing declarative memory in laboratory rats and mice using the nonconditioned social discrimination procedure. In: *Nature protocols* 6 (8), S. 1152–1162. DOI: 10.1038/nprot.2011.353.
23. Engelmann, Mario; Wotjak, Carsten T.; Landgraf, Rainer (1995): Social discrimination procedure: An alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. In: *Physiology & Behavior* 58 (2), S. 315–321. DOI: 10.1016/0031-9384(95)00053-l.
24. Esposito, Roberto; Cilli, Franco; Pieramico, Valentina; Ferretti, Antonio; Macchia, Antonella; Tommasi, Marco et al. (2013): Acute effects of modafinil on brain resting state networks in young healthy subjects. In: *PloS one* 8 (7), e69224. DOI: 10.1371/journal.pone.0069224.
25. Finke, Kathrin; Dodds, Chris M.; Bublak, Peter; Regenthal, Ralf; Baumann, Frank; Manly, Tom; Müller, Ulrich (2010): Effects of modafinil and methylphenidate on visual attention capacity: a TVA-based study. In: *Psychopharmacology* 210 (3), S. 317–329. DOI: 10.1007/s00213-010-1823-x.
26. Fiocchi, Elaine M.; Lin, Yin-Guo; Aimone, Lisa; Gruner, John A.; Flood, Dorothy G. (2009): Armodafinil promotes wakefulness and activates Fos in rat brain. In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 92 (3), S. 549–557. DOI: 10.1016/j.pbb.2009.02.006.
27. Flavell, Steven W.; Greenberg, Michael E. (2008): Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. In: *Annual review of neuroscience* 31, S. 563–590. DOI: 10.1146/annurev.neuro.31.060407.125631.
28. Franke, A. G.; Lieb, K. (2010): Pharmakologisches Neuroenhancement und "Hirndoping" : Chancen und Risiken. In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 53 (8), S. 853–859. DOI: 10.1007/s00103-010-1105-0.
29. Franklin, Keith B. J.; Paxinos, George (2008): The mouse brain in stereotaxic coordinates. Compact 3. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
30. Frey, U.; Frey, S.; Schollmeier, F.; Krug, M. (1996): Influence of actinomycin D, a RNA synthesis inhibitor, on long-term potentiation in rat hippocampal neurons in vivo and in vitro. In: *The Journal of Physiology* 490 (Pt 3) (Pt 3), S. 703–711. DOI: 10.1113/jphysiol.1996.sp021179.
31. Garcia, Vanessa Athaíde; Souza de Freitas, Betânia; Busato, Stefano Boemler; D'avila Portal, Bernardo Chaves; Piazza, Francisco Correa; Schröder, Nadja (2013): Differential effects of modafinil on memory in naïve and memory-impaired rats. In: *Neuropharmacology* 75, S. 304–311. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.07.038.

32. Geng, Joy J.; Soosman, Steffan; Sun, Yile; DiQuattro, Nicholas E.; Stankevitch, Beth; Minzenberg, Michael J. (2013): A match made by modafinil: probability matching in choice decisions and spatial attention. In: *J Cogn Neurosci* 25 (5), S. 657–669. DOI: 10.1162/jocn_a_00333.
33. González, Betina; Jayanthi, Subramaniam; Gomez, Natalia; Torres, Oscar V.; Sosa, Máximo H.; Bernardi, Alejandra et al. (2018): Repeated methamphetamine and modafinil induce differential cognitive effects and specific histone acetylation and DNA methylation profiles in the mouse medial prefrontal cortex. In: *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 82, S. 1–11. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.12.009.
34. Gozzi, Alessandro; Colavito, Valeria; Seke Etet, Paul F.; Montanari, Dino; Fiorini, Silvia; Tambalo, Stefano et al. (2012): Modulation of fronto-cortical activity by modafinil: a functional imaging and fos study in the rat. In: *Neuropsychopharmacology* 37 (3), S. 822–837. DOI: 10.1038/npp.2011.260.
35. Hädicke, Jana; Engelmann, Mario (2013): Social investigation and long-term recognition memory performance in 129S1/SvImJ and C57BL/6JOlaHsd mice and their hybrids. In: *PloS one* 8 (1), e54427. DOI: 10.1371/journal.pone.0054427.
36. Hanslick, Jennifer L.; Lau, Karen; Noguchi, Kevin K.; Olney, John W.; Zorumski, Charles F.; Mennerick, Steven; Farber, Nuri B. (2008): Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Produces Widespread Apoptosis in the Developing Central Nervous System. In: *Neurobiology of disease* 34 (1), S. 1–10. DOI: 10.1016/j.nbd.2008.11.006.
37. Hoffmann, Joachim; Engelkamp, Johannes (2017): Lern- und Gedächtnispsychologie. 2., überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
38. Jia, C.; Chen, W. R.; Shepherd, G. M. (1999): Synaptic organization and neurotransmitters in the rat accessory olfactory bulb. In: *Journal of neurophysiology* 81 (1), S. 345–355. DOI: 10.1152/jn.1999.81.1.345.
39. Joo, Jae-Yeol; Schaukowitch, Katie; Farbiak, Lukas; Kilaru, Gokhul; Kim, Tae-Kyung (2016): Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers. In: *Nature neuroscience* 19 (1), S. 75–83. DOI: 10.1038/nn.4170.
40. Kalaba, Predrag; Ilić, Marija; Aher, Nilima Y.; Dragačević, Vladimir; Wieder, Marcus; Zehl, Martin et al. (2020): Structure-Activity Relationships of Novel Thiazole-Based Modafinil Analogues Acting at Monoamine Transporters. In: *Journal of medicinal chemistry* 63 (1), S. 391–417. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01938.
41. Linda Scoriels; Peter B. Jones; Barbara J. Sahakian: Modafinil effects on cognition and emotion in schizophrenia and its neurochemical modulation in the brain.

42. Linda Scoriels; Peter B. Jones; Barbara J. Sahakian (2013): Modafinil effects on cognition and emotion in schizophrenia and its neurochemical modulation in the brain. In: *Neuropharmacology* 64, S. 168–184. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.07.011.
43. Machalova, Alena; Slais, Karel; Vrskova, Dagmar; Sulcova, Alexandra (2012): Differential effects of modafinil, methamphetamine, and MDMA on agonistic behavior in male mice. In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 102 (2), S. 215–223. DOI: 10.1016/j.pbb.2012.04.013.
44. Makris, Angela P.; Rush, Craig R.; Frederich, Robert C.; Taylor, Alisia C.; Kelly, Thomas H. (2007): Behavioral and subjective effects of d-amphetamine and modafinil in healthy adults. In: *Experimental and clinical psychopharmacology* 15 (2), S. 123–133. DOI: 10.1037/1064-1297.15.2.123.
45. Martinez-Marcos, Alino (2009): On the organization of olfactory and vomeronasal cortices. In: *Progress in Neurobiology* 87 (1), S. 21–30. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2008.09.010.
46. Milde-Langosch, Karin (2005): The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 41 (16), S. 2449–2461. DOI: 10.1016/j.ejca.2005.08.008.
47. Minzenberg, Michael J.; Carter, Cameron S. (2008): Modafinil: a review of neurochemical actions and effects on cognition. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33 (7), S. 1477–1502. DOI: 10.1038/sj.npp.1301534.
48. Minzenberg, Michael J.; Gomes, Glenn C.; Yoon, Jong H.; Watrous, Andrew J.; Geng, Joy; Firl, Alana J.; Carter, Cameron S. (2014): Modafinil augments oscillatory power in middle frequencies during rule selection. In: *Psychophysiology* 51 (6), S. 510–519. DOI: 10.1111/psyp.12201.
49. Minzenberg, Michael J.; Watrous, Andrew J.; Yoon, Jong H.; Ursu, Stefan; Carter, Cameron S. (2008): Modafinil shifts human locus coeruleus to low-tonic, high-phasic activity during functional MRI. In: *Science (New York, N.Y.)* 322 (5908), S. 1700–1702. DOI: 10.1126/science.1164908.
50. Mohamed, Ahmed Dahir; Lewis, Chris Roberts (2014): Modafinil increases the latency of response in the Hayling Sentence Completion Test in healthy volunteers: a randomised controlled trial. In: *PLOS ONE* 9 (11), e110639. DOI: 10.1371/journal.pone.0110639.
51. Müller, U.; Rowe, J. B.; Rittman, T.; Lewis, C.; Robbins, T. W.; Sahakian, B. J. (2013): Effects of modafinil on non-verbal cognition, task enjoyment and creative thinking in healthy volunteers. In: *Neuropharmacology* 64, S. 490–495. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2012.07.009.

52. Murre, Jaap M. J.; Dros, Joeri (2015): Replication and Analysis of Ebbinghaus' Forgetting Curve. In: *PLOS ONE* 10 (7), e0120644. DOI: 10.1371/journal.pone.0120644.
53. Noack, Julia; Murau, Rita; Engelmann, Mario (2015): Consequences of temporary inhibition of the medial amygdala on social recognition memory performance in mice. In: *Frontiers in neuroscience* 9, S. 152. DOI: 10.3389/fnins.2015.00152.
54. Noack, Julia; Richter, Karin; Laube, Gregor; Haghgoo, Hojjat Allah; Veh, Rüdiger W.; Engelmann, Mario (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. In: *Neurobiology of learning and memory* 94 (4), S. 568–575. DOI: 10.1016/j.nlm.2010.09.013.
55. Ogawa, Sachie K.; Watabe-Uchida, Mitsuko (2018): Organization of dopamine and serotonin system: Anatomical and functional mapping of monosynaptic inputs using rabies virus. In: *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 174, S. 9–22. DOI: 10.1016/j.pbb.2017.05.001.
56. Okuyama, Teruhiro (2018): Social memory engram in the hippocampus. In: *Neuroscience research* 129, S. 17–23. DOI: 10.1016/j.neures.2017.05.007.
57. Park, Gaeun; Ryu, Changhyeon; Kim, Soobin; Jeong, Se Jin; Koo, Ja Wook; Lee, Yong-Seok; Kim, Sang Jeong (2021): Social isolation impairs the prefrontal-nucleus accumbens circuit subserving social recognition in mice. In: *Cell reports* 35 (6), S. 109104. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109104.
58. Ploeger, G. E.; Willemen, A. P.; Cools, A. R. (1991): Role of the nucleus accumbens in social memory in rats. In: *Brain research bulletin* 26 (1), S. 23–27. DOI: 10.1016/0361-9230(91)90187-o.
59. Qu, Wei-Min; Huang, Zhi-Li; Xu, Xin-Hong; Matsumoto, Naomi; Urade, Yoshihiro (2008): Dopaminergic D1 and D2 receptors are essential for the arousal effect of modafinil. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (34), S. 8462–8469. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1819-08.2008.
60. Richter, Karin; Wolf, Gerald; Engelmann, Mario (2005): Social recognition memory requires two stages of protein synthesis in mice. In: *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 12 (4), S. 407–413. DOI: 10.1101/lm.97505.
61. Shafiei, Golia; Zeighami, Yashar; Clark, Crystal A.; Coull, Jennifer T.; Nagano-Saito, Atsuko; Leyton, Marco et al. (2019): Dopamine Signaling Modulates the Stability and Integration of Intrinsic Brain Networks. In: *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 29 (1), S. 397–409. DOI: 10.1093/cercor/bhy264.

62. Sheng, Morgan; Greenberg, Michael E. (1990): The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. In: *Neuron* 4 (4), S. 477–485. DOI: 10.1016/0896-6273(90)90106-p.
63. Shuman, Tristan; Wood, Suzanne C.; Anagnostaras, Stephan G. (2009): Modafinil and memory: effects of modafinil on Morris water maze learning and Pavlovian fear conditioning. In: *Behavioral neuroscience* 123 (2), S. 257–266. DOI: 10.1037/a0014366.
64. Smith, M. Elizabeth; Farah, Martha J. (2011): Are prescription stimulants "smart pills"? The epidemiology and cognitive neuroscience of prescription stimulant use by normal healthy individuals. In: *Psychological bulletin* 137 (5), S. 717–741. DOI: 10.1037/a0023825.
65. Stevenson, Rebecca; Samokhina, Evgeniia; Rossetti, Ilaria; Morley, John W.; Buskila, Yossi (2020): Neuromodulation of Glial Function During Neurodegeneration. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14, S. 278. DOI: 10.3389/fncel.2020.00278.
66. Stork, O.; Welzl, H. (1999): Memory formation and the regulation of gene expression. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 55 (4), S. 575–592. DOI: 10.1007/s000180050316.
67. Thor, D. H.; Holloway, W. R. (1982): Social memory of the male laboratory rat. In: *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 96 (6), S. 1000–1006. DOI: 10.1037/0735-7036.96.6.1000.
68. Trouillet, Anne-Charlotte; Moussu, Chantal; Poissenot, Kevin; Keller, Matthieu; Birnbaumer, Lutz; Leinders-Zufall, Trese et al. (2021): Sensory Detection by the Vomeronasal Organ Modulates Experience-Dependent Social Behaviors in Female Mice. In: *Frontiers in Cellular Neuroscience* 15, S. 638800. DOI: 10.3389/fncel.2021.638800.
69. Tulving, Endel (2002): Episodic memory: from mind to brain. In: *Annual review of psychology* 53, S. 1–25. DOI: 10.1146/annurev.psych.53.100901.135114.
70. van Kerkhof, Linda W. M.; Trezza, Viviana; Mulder, Tessa; Gao, Ping; Voorn, Pieter; Vanderschuren, Louk J. M. J. (2014): Cellular activation in limbic brain systems during social play behaviour in rats. In: *Brain structure & function* 219 (4), S. 1181–1211. DOI: 10.1007/s00429-013-0558-y.
71. Wanisch, Klaus; Wotjak, Carsten T.; Engelmann, Mario (2008): Long-lasting second stage of recognition memory consolidation in mice. In: *Behavioural brain research* 186 (2), S. 191–196. DOI: 10.1016/j.bbr.2007.08.008.
72. Watabe-Uchida, Mitsuko; Zhu, Lisa; Ogawa, Sachie K.; Vamanrao, Archana; Uchida, Naoshige (2012): Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. In: *Neuron* 74 (5), S. 858–873. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.03.017.
73. Waters, Kerry A.; Burnham, Katherine E.; O'connor, Desmond; Dawson, Gerard R.; Dias, Rebecca (2005): Assessment of modafinil on

- attentional processes in a five-choice serial reaction time test in the rat. In: *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* 19 (2), S. 149–158. DOI: 10.1177/0269881105048995.
74. Willie, J. T.; Renthal, W.; Chemelli, R. M.; Miller, M. S.; Scammell, T. E.; Yanagisawa, M.; Sinton, C. M. (2005): Modafinil more effectively induces wakefulness in orexin-null mice than in wild-type littermates. In: *Neuroscience* 130 (4), S. 983–995. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.10.005.
75. Winslow, Forbes (1860): On Obscure Diseases of the Brain and Disorders of the Mind: their Incipient Symptoms, Pathology, Diagnosis, Treatment, and Prophylaxis. In: *AJP* 17 (2), S. 212–228. DOI: 10.1176/ajp.17.2.212.
76. Wise, Roy A.; Robble, Mykel A. (2020): Dopamine and Addiction. In: *Annual review of psychology* 71, S. 79–106. DOI: 10.1146/annurev-psych-010418-103337.
77. Xing, Bo; Mack, Nancy R.; Guo, Kai-Ming; Zhang, Yu-Xiang; Ramirez, Billy; Yang, Sha-Sha et al. (2021): A Subpopulation of Prefrontal Cortical Neurons Is Required for Social Memory. In: *Biological psychiatry* 89 (5), S. 521–531. DOI: 10.1016/j.biopsych.2020.08.023.
78. Yang, Huajun; Shan, Wei; Zhu, Fei; Yu, Tingting; Fan, Jingjing; Guo, Anchen et al. (2019): C-Fos mapping and EEG characteristics of multiple mice brain regions in pentylenetetrazol-induced seizure mice model. In: *Neurological research* 41 (8), S. 749–761. DOI: 10.1080/01616412.2019.1610839.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Modafinilmoleküls als Kugel-Stab-Modell.....	14
Abbildung 2: Darstellung des Ablaufs des sozialen Diskriminationstests.....	20
Abbildung 3: Repräsentativer Frontalschnitt der c-Fos-Immunhistochemie.....	25
Abbildung 4: Darstellung der Untersuchungszeiten im Vortest im SDT ohne Interferenz und ohne Behandlung.	28
Abbildung 5: Darstellung der Untersuchungszeiten im Vortest im SDT mit Interferenz und ohne Behandlung ...	29
Abbildung 6: Darstellung der Untersuchungszeiten im Versuch A.....	29
Abbildung 7: Darstellung der Untersuchungszeiten im Versuch B.....	30
Abbildung 8: Darstellung der Untersuchungszeiten im Versuch C.....	31
Abbildung 9: Darstellung der Untersuchungszeiten im Nachtest ohne Interferenz und ohne Behandlung.....	31
Abbildung 10: Darstellung der Untersuchungszeiten im Nachtest mit Interferenz und ohne Behandlung.....	32
Abbildung 11: Darstellung der Aktionszeiten (Aggressivität und Sexualverhalten) in den Vortests.....	33
Abbildung 12: Darstellung der Aktionszeiten (Aggressivität und Sexualverhalten) in den Versuchen.....	34
Abbildung 13: Darstellung der Aktionszeiten (Aggressivität und Sexualverhalten) in den Nachtests.....	34
Abbildung 14: Zahl der c-Fos positiven Nuclei der Körnerzellschicht.....	35
Abbildung 15: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des AOB.....	36
Abbildung 16: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des AOB.....	37
Abbildung 17: Zahl der c-Fos positiven Nuclei der Mitralzellschicht.....	38
Abbildung 18: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des AOB.....	39
Abbildung 19: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des AOB.....	40
Abbildung 20: Zahl der c-Fos positiven Nuclei des Ncl. acc.....	41
Abbildung 21: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des Ncl. acc.....	42
Abbildung 22: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des Ncl. acc.....	43
Abbildung 23: Zahl der c-Fos positiven Nuclei im Striatum.....	44
Abbildung 24: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des Striatums.....	45
Abbildung 25: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des Striatums.....	46
Abbildung 26: Zahl der c-Fos positiven Nuclei des PFC.....	47
Abbildung 27: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des PFC.....	48
Abbildung 28: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des PFC.....	49
Abbildung 29: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten des Striatums, die immunhistochemisch auf Dopaminrezeptor 1.....	50
Abbildung 30: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten um den dritten Ventrikel, die immunhistochemisch auf Tyrosinhydroxylase.....	51
Abbildung 31: Fluoreszenzaufnahmen der Commissura anterior (aca) mit Teil des Ncl. acc.....	52
Abbildung 32: Übersichtsaufnahme (Kachelbild) der Commissura anterior mit Ncl. acc.....	53
Abbildung 33: Übersichtsaufnahme der Commissura anterior mit Ncl. acc.....	54
Abbildung 34: Vergrößerte Aufnahme (A) und Nahaufnahme (B) der Commissura anterior mit Teil des Ncl. acc.....	54
Abbildung 35: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-31478-AK).....	85
Abbildung 36: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-31478-AK).....	86
Abbildung 37: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-31478-AK).....	87
Abbildung 38: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Kontrollschnitten.....	88
Abbildung 39: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-1434-AK).....	89
Abbildung 40: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-1434-AK).....	90
Abbildung 41: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-1434-AK).....	91
Abbildung 42: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Kontrollschnitten.....	92
Abbildung 43: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-14001-AK).....	93
Abbildung 44: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-14001-AK).....	94
Abbildung 45: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-14001-AK).....	95
Abbildung 46: Mikroskopaufnahmen von frontalen Kontrollschnitten.....	96
Abbildung 47: Mikroskopaufnahmen von TH-AK behandelten repräsentativen Frontalschnitten.....	97
Abbildung 48: Mikroskopaufnahmen von TH-AK behandelten repräsentativen Frontalschnitten.....	97
Abbildung 49: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Kontrollschnitten.....	98

8 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Darstellung eingesetzten Versuchsspezifika der Verhaltensversuchen.....</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 2: Behandlung der Mäuse für die immunhistochemische Aufarbeitung der Gehirne.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabelle 3: Schritte zur Herstellung des Placebos und Verums für die Verhaltensversuche.....</i>	<i>80</i>
<i>Tabelle 4: Protokoll für die c-Fos-IHC.....</i>	<i>81</i>
<i>Tabelle 5: Protokoll für IHC von AK gegen das dopaminerge System.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabelle 6: Labeling des c-Fos-AK.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabelle 7: Labeling des TH-AK.....</i>	<i>82</i>
<i>Tabelle 8: Protokoll für die Herstellung der finalen c-Fos-AK-Lösung.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabelle 9: Protokoll für die Herstellung der finalen TH-AK-Lösung.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabelle 10: Protokoll für die Herstellung der finalen AK-Lösung der Doppelfärbung.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabelle 11: Protokoll für die gelabelten c-Fos- und TH-IHC.....</i>	<i>83</i>
<i>Tabelle 12: Protokoll Fluoreszenz-IHC TH-PAK und c-Fos mit fluoreszierendem SAK.....</i>	<i>84</i>

9 Danksagung

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

10 Eidesstattliche Versicherungen

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

*Zu den Auswirkungen von Modafinil auf das soziale
Wiedererkennungsgedächtnis und das dopaminerge System der Maus*

am Institut für Biochemie und Zellbiologie in Kooperation mit dem Leibnitz-Institut für Neurobiologie ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

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

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

Magdeburg, den

Unterschrift

Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die Wissenschaftsbezug hat.

Magdeburg, den

Unterschrift

11 Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf und Bildungsweges ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

12 Anhang

12.1 Herstellung der Injektionslösungen der Verhaltensversuche

Nach allen Zwischenschritten wurden das Placebo oder das Verum erwärmt (40 °C) und gerührt bis eine homogene Lösung entstand. Das Verum wurde mit 1% DMSO, 0,9% NaCl und Modafinil hergestellt. Die Kontrolle bestand ebenfalls aus 1% DMSO und 0,9% NaCl.

Tabelle 3: Schritte zur Herstellung des Placebos und Verums für die Verhaltensversuche

Kontrolle	Verum
	2,5 mg Modafinil
20 µl DMSO	20 µl DMSO
Zusatz von NaCl:	Zusatz von NaCl:
+ 80 µl	+ 50 µl
+ 200 µl	+ 50 µl
+ 200 µl	+ 80 µl
+ 1 ml	+ 100 µl
+ 1 ml	+ 200 µl
	+ 500 µl

12.2 Protokoll für die c-Fos-IHC

Tabelle 4: Protokoll für die c-Fos-IHC

Anzahl	Zeit	Temperatur	Zweck	Lösung	Rezept (auf 10 ml)
3x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh	
1x	20 min	RT	zerstört endog. Peroxidase	50% Methanol / PBS/ 1% H ₂ O ₂	Methanol + PBS nach Veh 1:1 + 1% H ₂ O ₂ (ca. 333 µl einer 30%igen H ₂ O ₂ auf 10 ml)
3x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh	
1x	30 min	RT	Vorinkubation	10% ZNS-Lsg./0,3% Triton/ 0,1% Azid	1 ml 100% ZNS + 300 µl 10% Tritonstocklsg. + 100 µl 10% Na-azidstocklsg. auf 10 ml PBS nach Veh
1x	2-3 Nächte	4°C	PAK Primär Antikörper	PAK in 10% ZNS/0,3% Triton/ 0,1% Azid	entspricht Vorinkubation + PAK
3x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh	
1x	60 min	RT	Vorinkubation	PBS+BSA	1 ml einer 20 mg/ml BSA Stocklsg. + 100 µl 10% Tritonlsg. + 100 µl 10% Na-azidlsg. auf 10 ml PBS nach Veh
1x	über Nacht länger	RT 4°C	SAK Sekundär Antikörper	in 0,2% BSA/0,1% Triton/ 0,1% Azid	1 ml einer 20 mg/ml BSA Stocklsg. + 100 µl 10% Tritonlsg. + 100 µl 10% Na-azidlsg. auf 10 ml PBS nach Veh + SAK
3x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh	
1x	60 min	RT	Vorinkubation	0,2% BSA/Lsg.	1 ml einer 2% BSA Stocklsg. + 9 ml PBS (1:10)
1x	4h über Nacht	RT 4°C		Elite-ABC-Komplex in 0,2% BSA	erst 10 µl Elite A in 10 ml 0,2% BSA/PBS kurz rühren, dann 10 µl Elite B → 30 min rühren lassen
3x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh	
1x	10 min	RT	waschen	50 mM Tris/ pH 7,6	50 mM Tris in Aqua dest.
1x		RT	Vorinkubation	0,5% DAB-Lsg./pH 7,6	5 mg auf 10 ml 50 mM Trislsg. (pH 7,6) (1:10 aus 500 mM Trisstocklsg. in Aqua dest.)
1x	max. 5 min	RT	visualisieren	0,3% H ₂ O ₂	(0,3% H ₂ O ₂ in A.d.) 25 µl auf 500 µl DAB Lösung
1x		RT	abstoppen der Reaktion	PBS nach Veh	
2x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh	

12.3 Protokoll für die D1RD- und TH-IHC

Tabelle 5: Protokoll für IHC von AK gegen das dopaminerge System

Anzahl	Zeit	Temperatur	Zweck	Lösung
3x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh
1x	20 min	RT	Blocken reaktiver Aldehydgruppen	1% Natriumborhydrid in PBS
2x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh
1x	20 min	RT	Blocken endogener Peroxidase	Methanol+ PBS (1:1) + 1% Wasserstoffperoxid (30%)
2x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh
1x	45 min	RT	Blocken unspez. AK Bindungen	5% BSA in PBS; 0,1%-0,3% Triton
2x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh
1x	3h-2d	RT + Schüttler	PAK Inkubation	PAK + 0,3% Triton; 1% BSA (Verdünnung?)
2x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh
1x	2 h-2 d	RT	SAK Inkubation	
2x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh
1x	2 h	RT	Biotin Nachweisreaktion	50 ml PBS + 2 Tropfen AB Komplex (Vectastain)
2x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh
1x		RT	spülen	0,05 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl Puffer
1x	10 min	RT	DAB Reaktion	5 mg DAV + 10 ml TRIS+ 100 µl 1 M Imidazolsg. + 5 µl 30 % H2O2
1x		RT	spülen	TRIS
2x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh
Lufttrocknung auf gelatierten Objektträgern				
1x	2 min	RT	entwässern	Isopropanol
3x	5 min	RT	entwässern	Roticlear

12.4 Protokoll Labeling von c-Fos-AK und TH-AK

Tabelle 6: Labeling des c-Fos-AK

Labeling c-Fos-AK mit Fab 488			
Zeit	Temperatur	Stoff	Menge
		PAK 1:2500	0,4 µl (2x 1:2500!)
		mit 19,6 µl PBS auf 20 µl auffüllen	
		Fab 488	5 µl
5 min	RT		
5 min	RT	Block	5 µl
final 30 µl Ak-Komplex			

Tabelle 7: Labeling des TH-AK

Labeling anti TH-AK mit Fab 532			
Zeit	Temperatur	Stoff	Menge
		PAK 1:400	2,5 µl (2x 1:400!)
		mit 17,5 µl PBS auf 20 µl auffüllen	
		Fab 532	5 µl
5 min	RT		
5 min	RT	Block	5 µl
final 30 µl Ak-Komplex			

12.5 Protokoll für die c-Fos- und TH-IHC mit fluoreszierenden PAK

Tabelle 8: Protokoll für die Herstellung der finalen c-Fos-AK-Lösung

Einzelmarkierung c-Fos (PAK) Fab 488	
15 µl	c-Fos-Labeling-Komplex
485 µl	10% ZNS-Lsg./0,3% Triton/ 0,1% Azid
500 µl	Finale Lösung

Tabelle 9: Protokoll für die Herstellung der finalen TH-AK-Lösung

Einzelmarkierung TH (PAK) Fab 532	
15 µl	TH-Labeling-Komplex
485 µl	10% ZNS-Lsg./0,3% Triton/ 0,1% Azid
500 µl	Finale Lösung

Tabelle 10: Protokoll für die Herstellung der finalen AK-Lösung der Doppelfärbung

Doppelmarkierung c-Fos-Fab 488/TH Fab 532	
15 µl	c-Fos-Labeling-Komplex
15 µl	TH-Labeling-Komplex
470 µl	10% ZNS-Lsg. /0,3% Triton/ 0,1% Azid
500 µl	Finale Lösung

Tabelle 11: Protokoll für die gelabelten c-Fos- und TH-IHC

Anzahl	Zeit	Temperatur	Zweck	Lösung
3x	10 min	RT	Waschen	PBS nach Veh
1x	1 h	RT	Vorinkubation	10% ZNS-Lsg./0,3% Triton/ 0,1% Azid
1x	2-3 d	4°C	PAK (finale Lsg.)	gelabelter PAK in 10% ZNS-Lsg./0,3% Triton/ 0,1% Azid
3x	10 min	RT	Waschen	PBS nach Veh
1x	15 min	RT	Nachfixierung	4% PFA (Paraformaldehyd)
3x	10 min	RT	Waschen	PBS nach Veh
1x	15 min	RT	DAPI	1 zu 2000
3x	10 min	RT	Waschen	PBS nach Veh

12.6 Protokoll Fluoreszenz-IHC von c-Fos und TH

Tabelle 12: Protokoll Fluoreszenz-IHC TH-PAK und c-Fos mit fluoreszierendem SAK

Anzahl	Zeit	Temperatur	Zweck	Lösung	Rezept (auf 10 ml)
3x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh	
1x	20 min	RT	für c-Fos AK (rabbit) einmal mit und ohne Methanol waschen	50% Methanol / PBS/ 1% H ₂ O ₂	Methanol + PBS nach Veh 1:1 + 1% H ₂ O ₂ (ca. 333 µl einer 30%igen H ₂ O ₂ auf 10 ml)
3x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh	
1x	30 min	RT	Vorinkubation	10% ENS-Lsg./0,3% Triton/0,1% Azid	1 ml 100% ENS + 300 µl 10% Tritonstocklsg. + 100 µl 10% Na-azidstocklsg. auf 10 ml PBS nach Veh
1x	2-3 Nächte	4°C	PAK 1:1000 (c-Fos rabbit Scj)	PAK in 10% ENS/0,3% Triton/0,1% Azid	entspricht Vorinkubation + PAK
3x	10 min	RT	PAK 1 : 500 (Alexa 647 TH Mouse)	gleichzeitig zum Vorschritt	In die Lsg. vom Schritt davor
1x	60 min	RT	waschen	PBS nach Veh	
1x	über Nacht länger	RT	SAK Fluoreszenz (Donkey, anti rabbit cy 3) 1:500	in 10% ENS/0,1% Triton/0,1% Azid	1 ml ENS Stocklsg. + 100 µl 10% Tritonlsg. + 100 µl 10% Na-azidlsg. auf 10 ml PBS nach Veh
3x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh	
1x	15 min	RT	DAPI 1 : 2000	1 zu 2000	
3x	10 min	RT	waschen	PBS nach Veh	in PBS

12.7 Lichtmikroskopische Aufnahmen der D1RD-AK-IHC

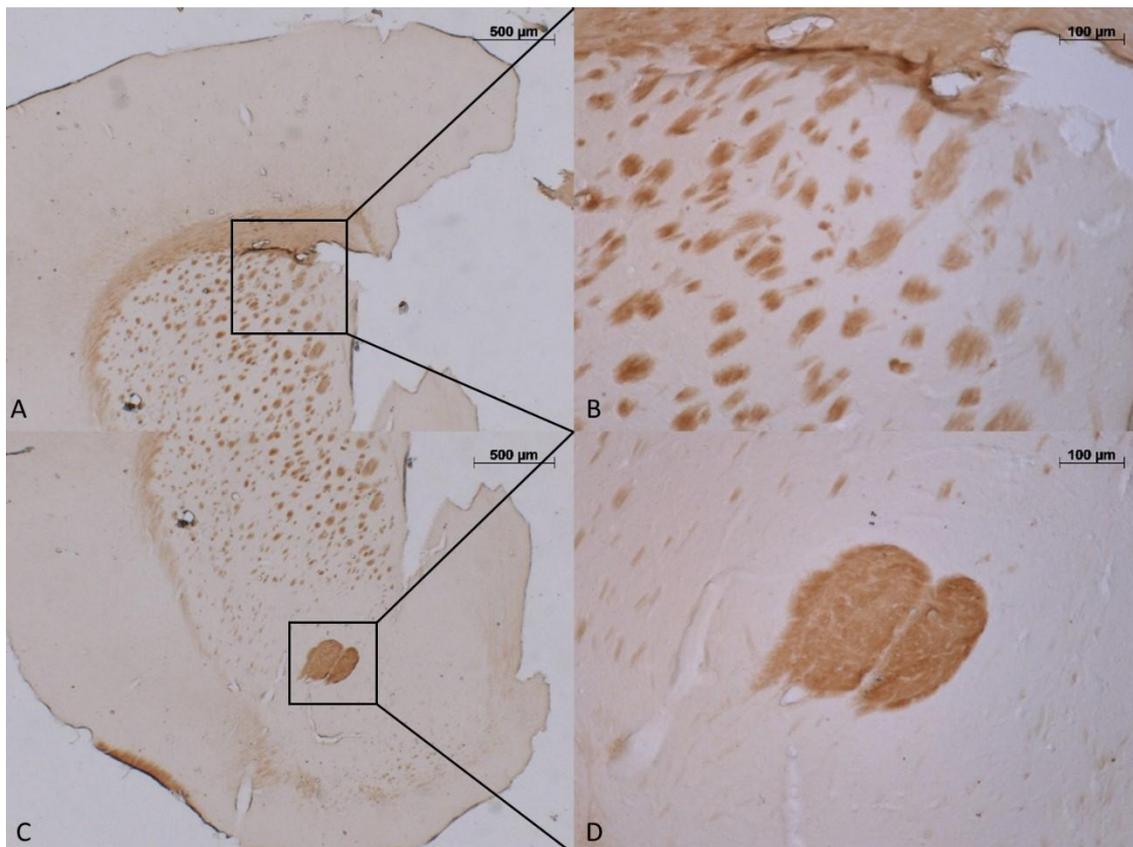


Abbildung 35: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-31478-AK) des Striatums, die immunhistochemisch auf D1RD untersucht wurden. **A, B** Striatum; **C, D** Commissura anterior mit umgebenen Ncl. acc. Verdünnung 1:100

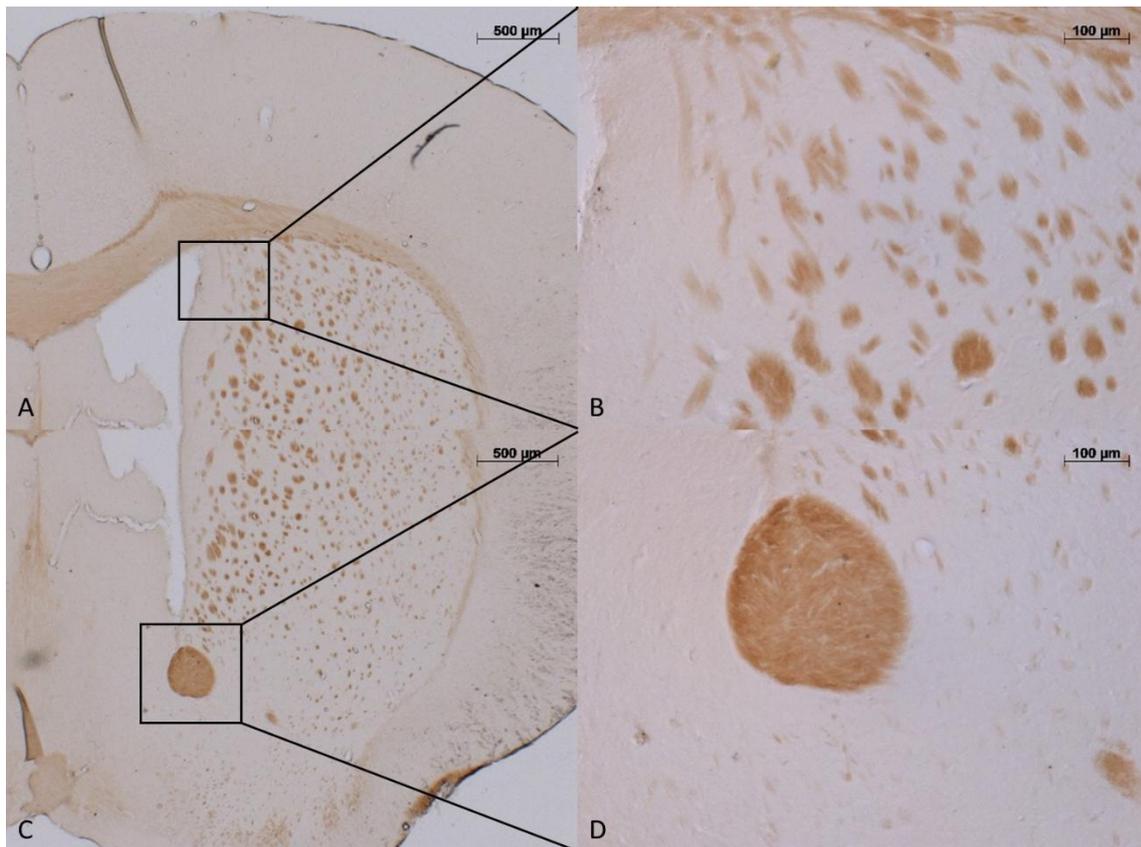


Abbildung 36: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-31478-AK) des Striatums, die immunhistochemisch auf D1RD untersucht wurden. **A, B** Striatum; **C, D** Commissura anterior mit umgebenen Ncl. acc. Verdünnung 1:250

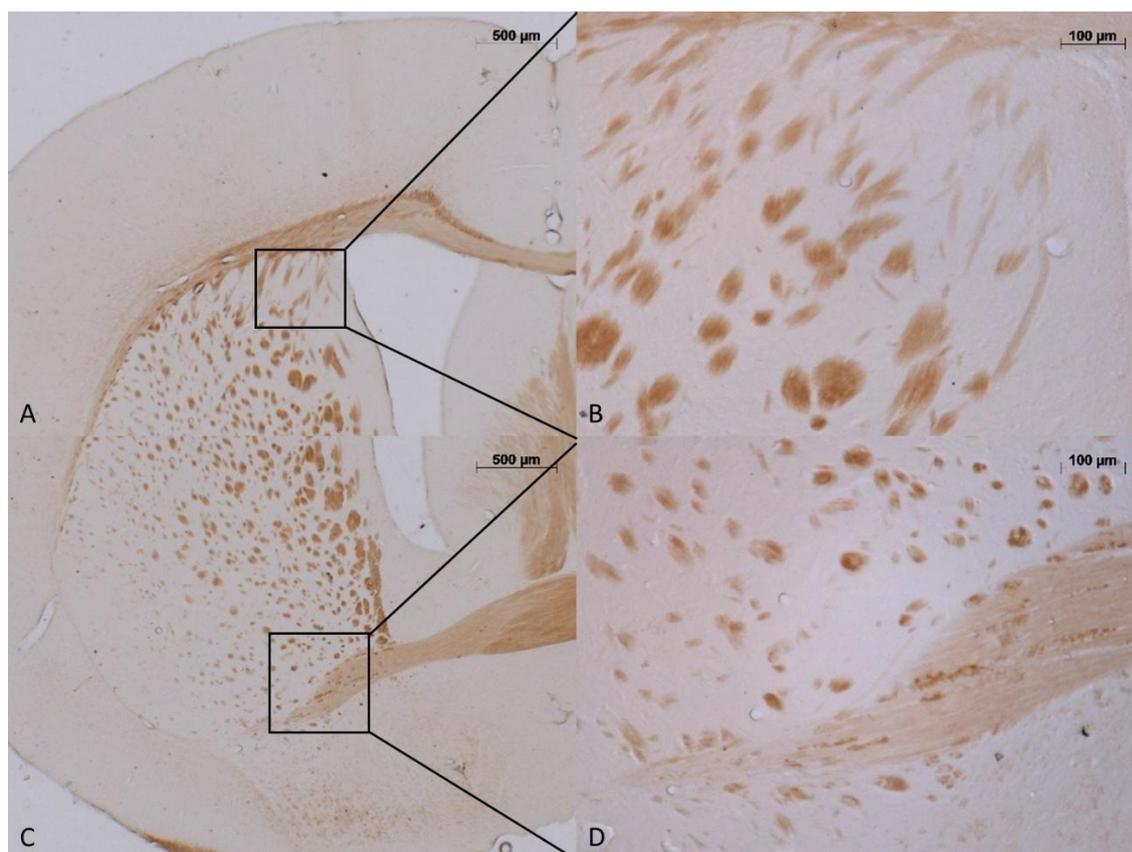


Abbildung 37: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-31478-AK) des Striatums, die immunhistochemisch auf D1RD untersucht wurden. A, B Striatum; C, D Commissura anterior; Verdünnung 1:500

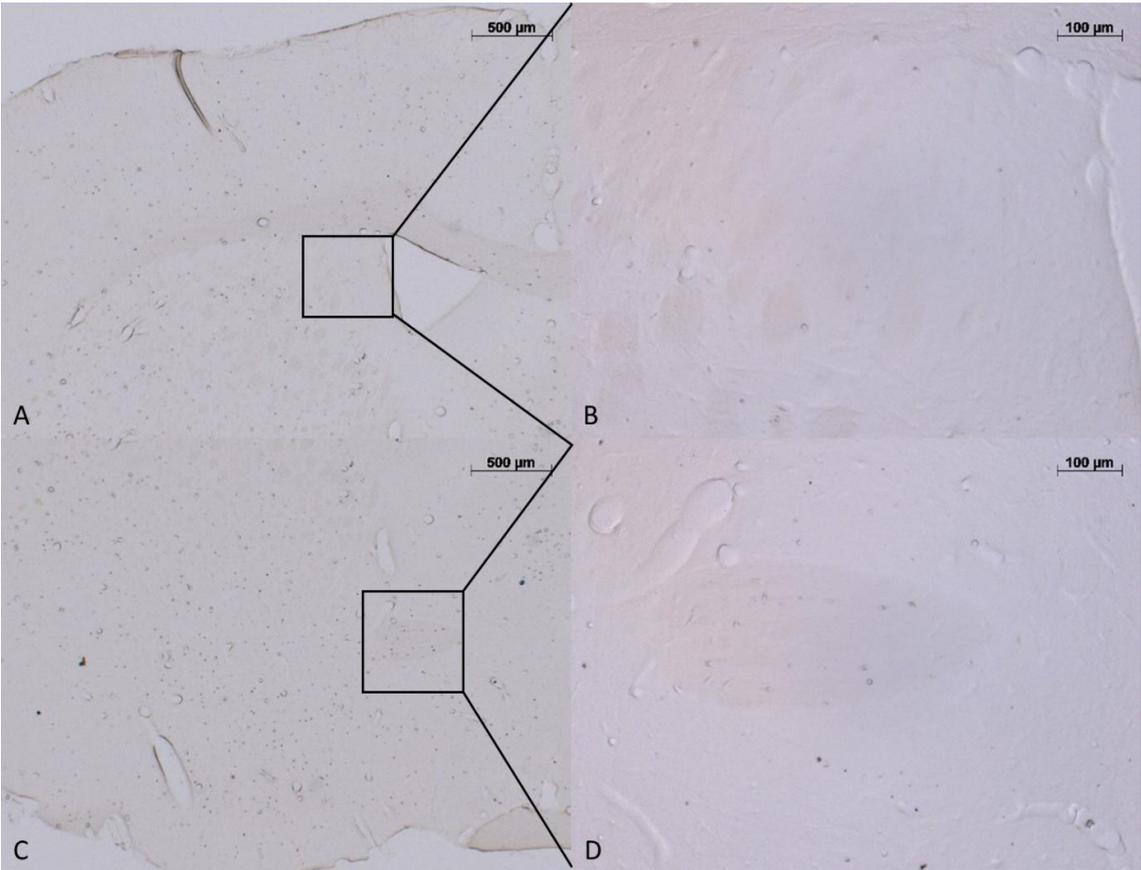


Abbildung 38: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Kontrollschnitten des Striatums. A, B Striatum; C, D Commissura anterior mit umgebenen Ncl. acc.

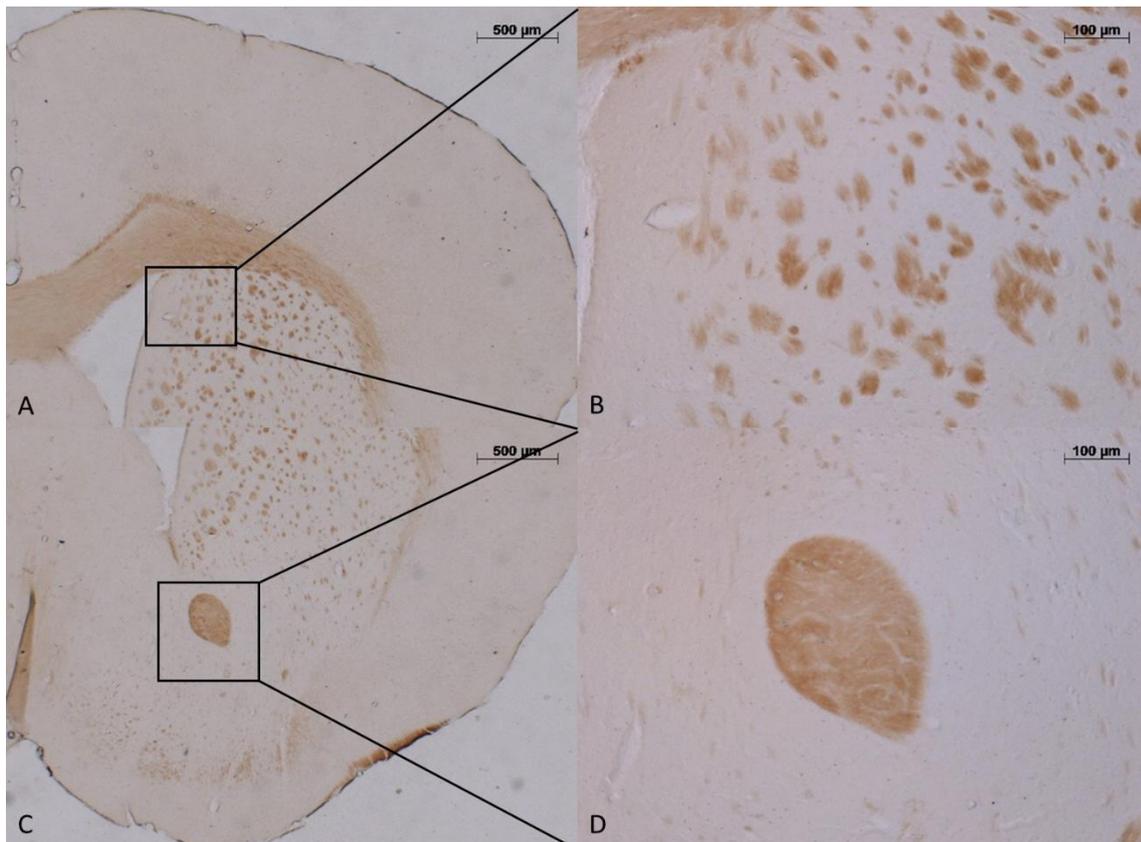


Abbildung 39: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-1434-AK) des Striatums, die immunhistochemisch auf D1RD untersucht wurden. A, B Striatum; C, D Commissura anterior mit umgebenen Ncl. acc. Verdünnung 1:100

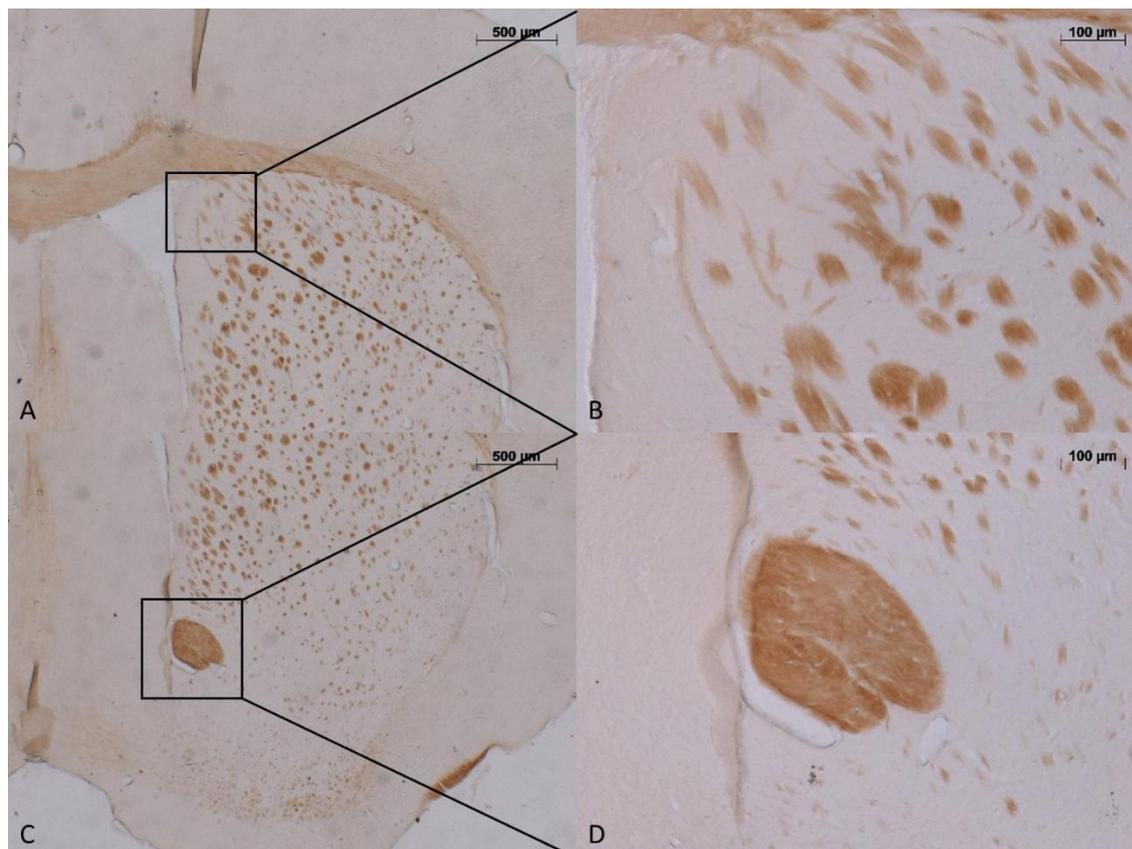


Abbildung 40: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-1434-AK) des Striatums, die immunhistochemisch auf untersucht wurden. **A, B** Striatum; **C, D** Commissura anterior mit umgebenen Ncl. acc. Verdünnung 1:250

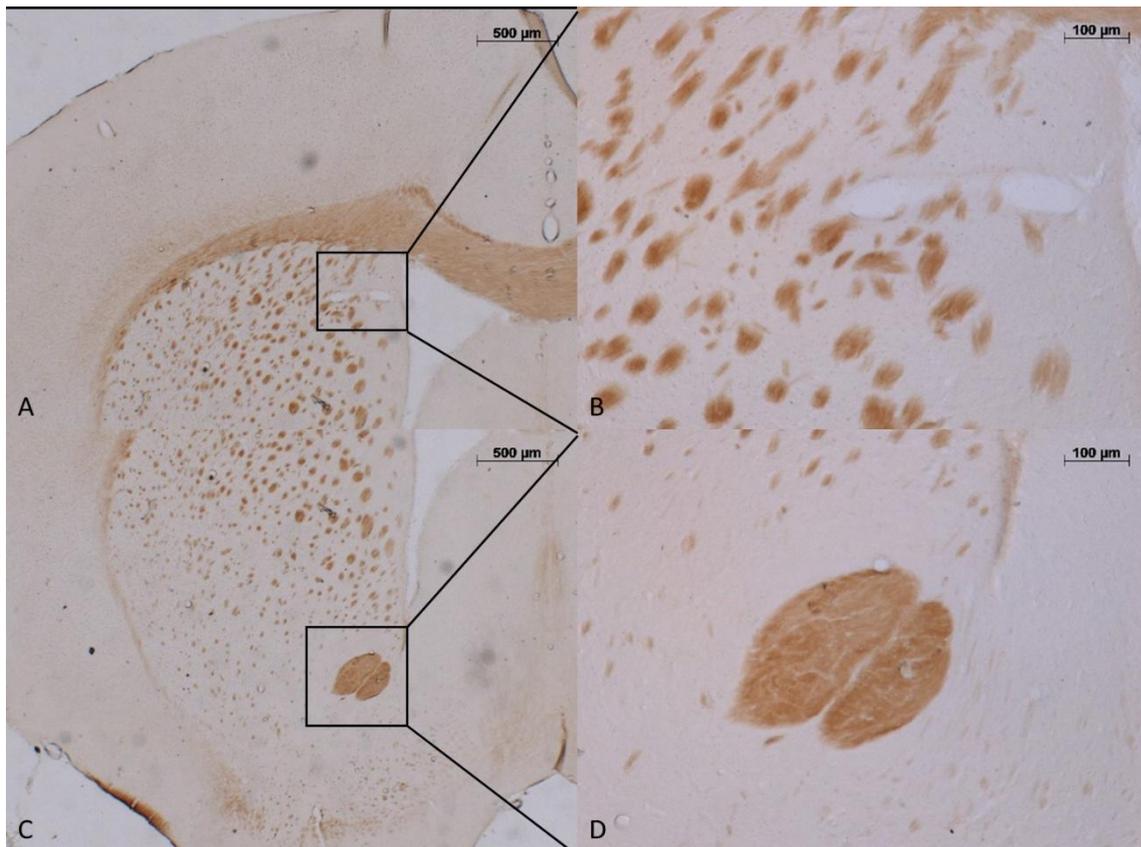


Abbildung 41: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-1434-AK) des Striatums, die immunhistochemisch auf untersucht wurden. **A, B** Striatum; **C, D** Commissura anterior mit umgebenen Ncl. acc. Verdünnung 1:500

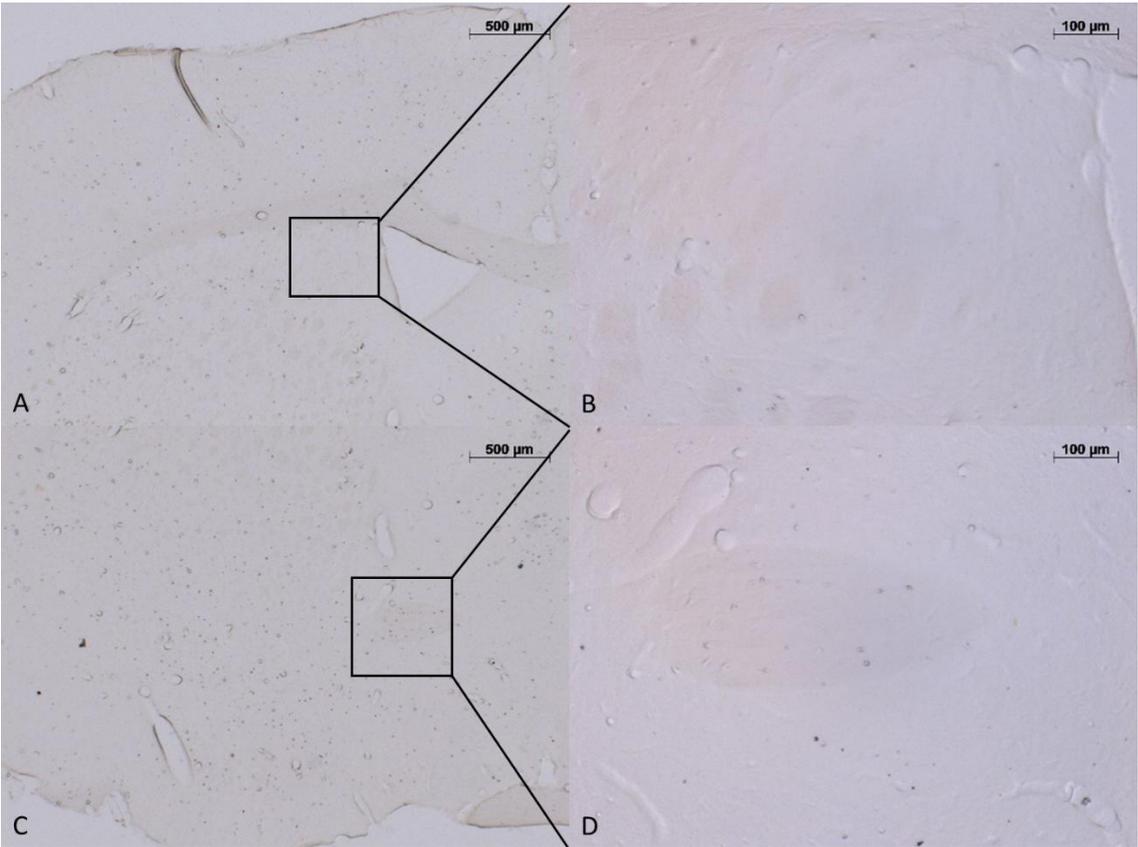


Abbildung 42: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Kontrollschnitten des Striatums. **A, B** Striatum; **C, D** Commissura anterior mit umgebenen Ncl. acc.

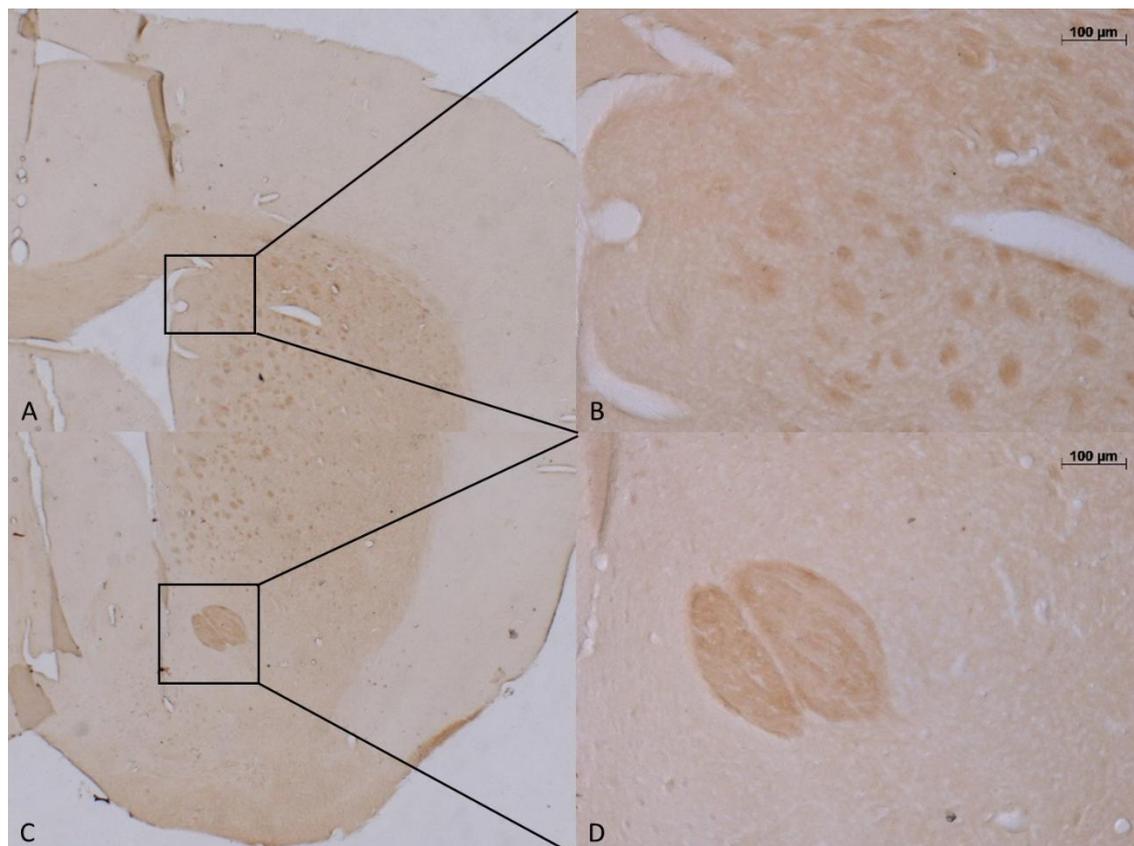


Abbildung 43: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-14001-AK) des Striatums, die immunhistochemisch auf D1RD untersucht wurden. **A, B** Striatum; **C, D** Commissura anterior mit umgebenen Ncl. acc. Verdünnung 1:100

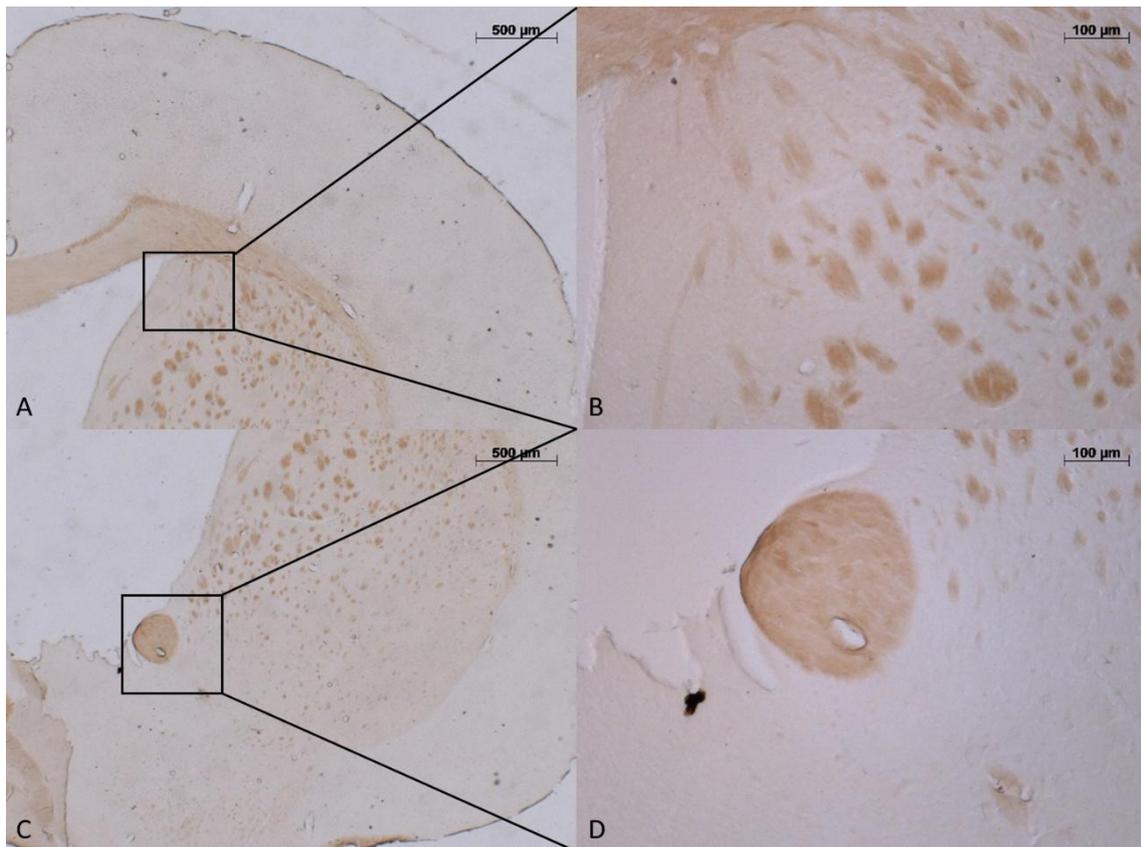


Abbildung 44: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-14001-AK) des Striatums, die immunhistochemisch auf D1RD untersucht wurden. **A, B** Striatum; **C, D** Commissura anterior mit umgebenen Ncl. acc. Verdünnung 1:250

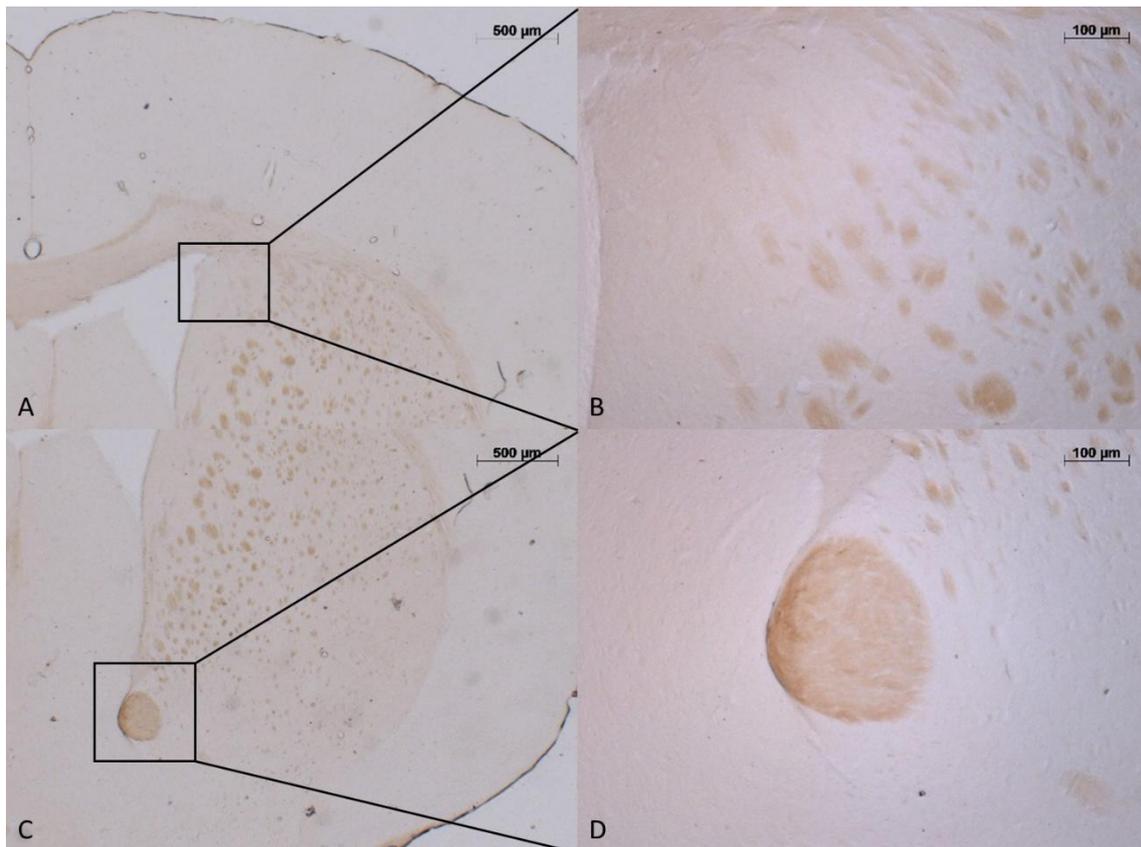


Abbildung 45: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Frontalschnitten (sc-14001-AK) des Striatums, die immunhistochemisch auf D1RD untersucht wurden. **A, B** Striatum; **C, D** Commissura anterior mit umgebenen Ncl. acc. Verdünnung 1:500

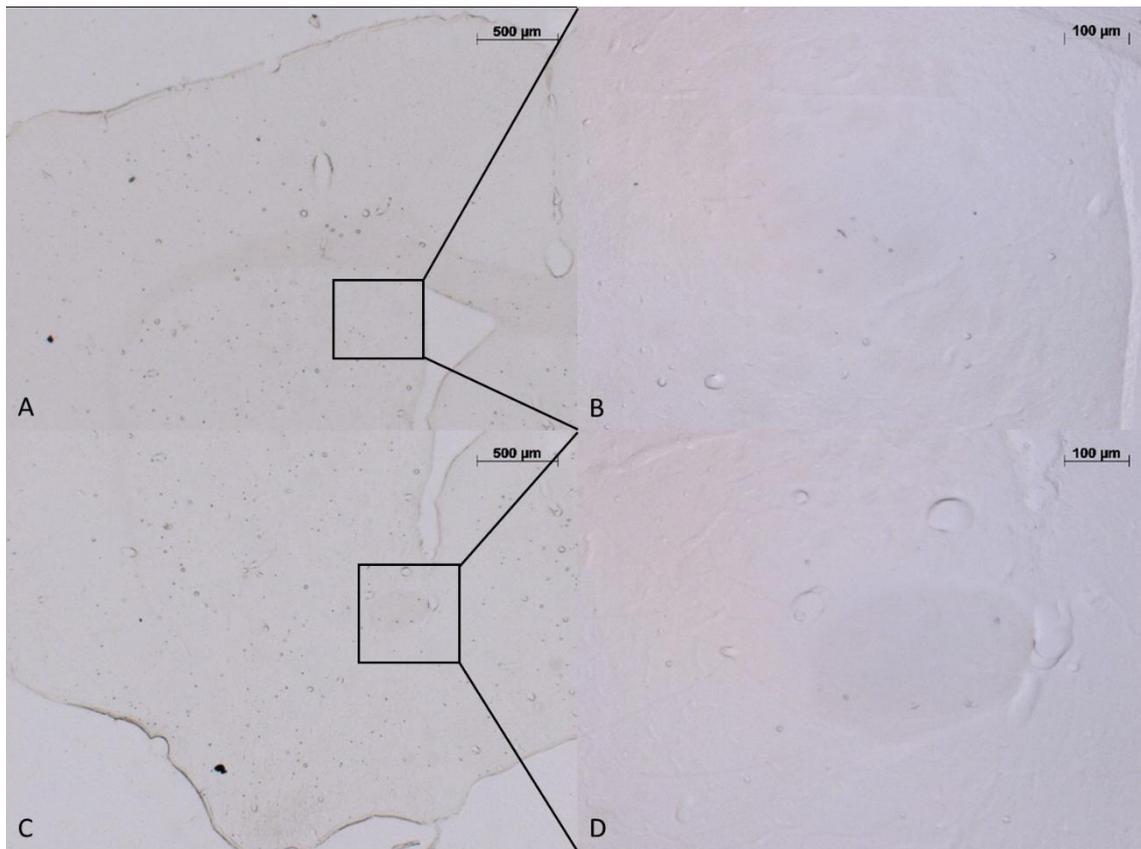


Abbildung 46: Mikroskopaufnahmen von frontalen Kontrollschnitten des Striatums. **A, B** Striatum; **C, D** Commissura anterior mit umgebenen Ncl. acc.

12.8 Lichtmikroskopische Aufnahmen der TH-AK-IHC

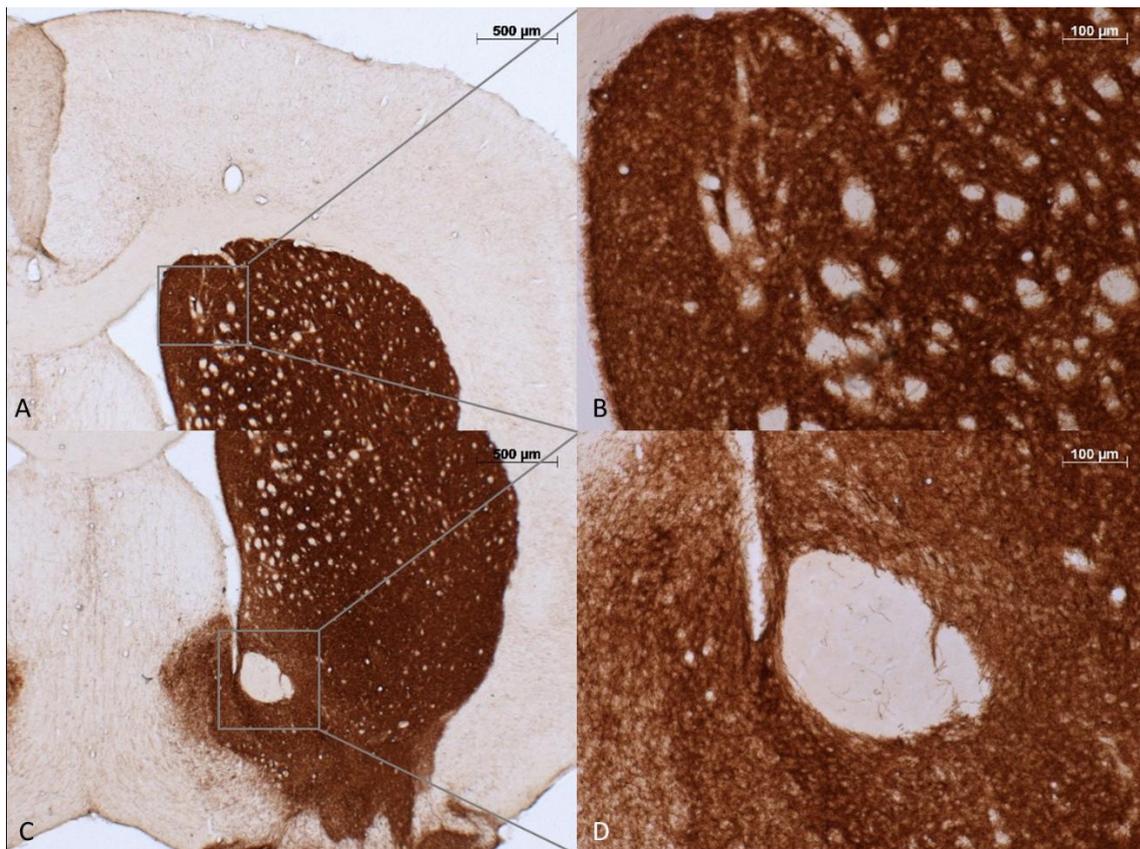


Abbildung 47: Mikroskopaufnahmen von TH-AK behandelten repräsentativen Frontalschnitten des Striatums. **A, B** Striatum; **C, D** Commissura anterior mit umgebenen Ncl. acc. Verdünnung 1:1000

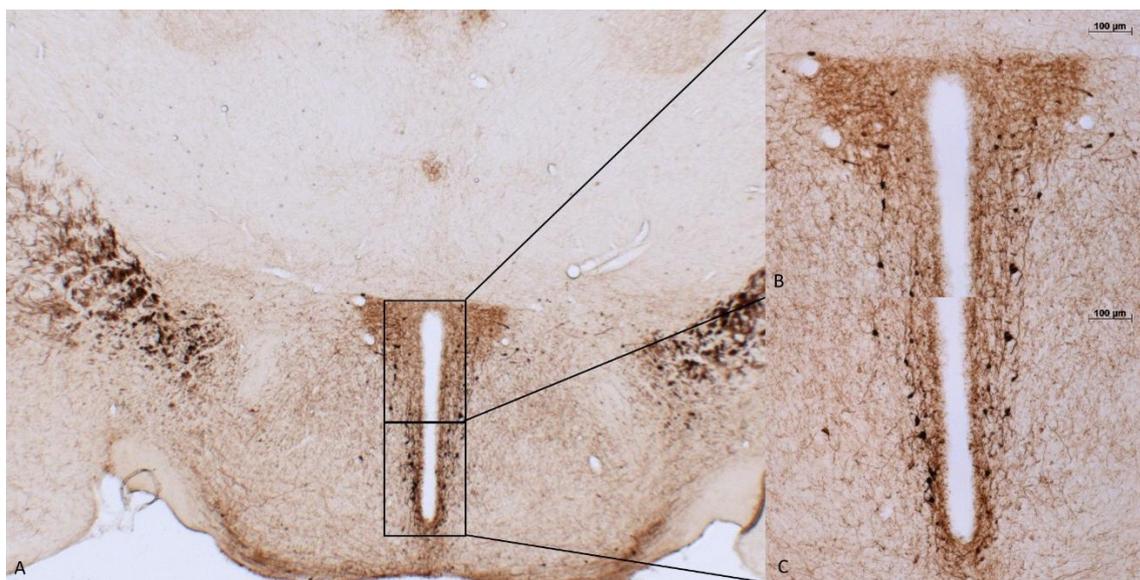


Abbildung 48: Mikroskopaufnahmen von TH-AK behandelten repräsentativen Frontalschnitten des Striatums. **A, B, C** dritter Ventrikel; Verdünnung 1:1000

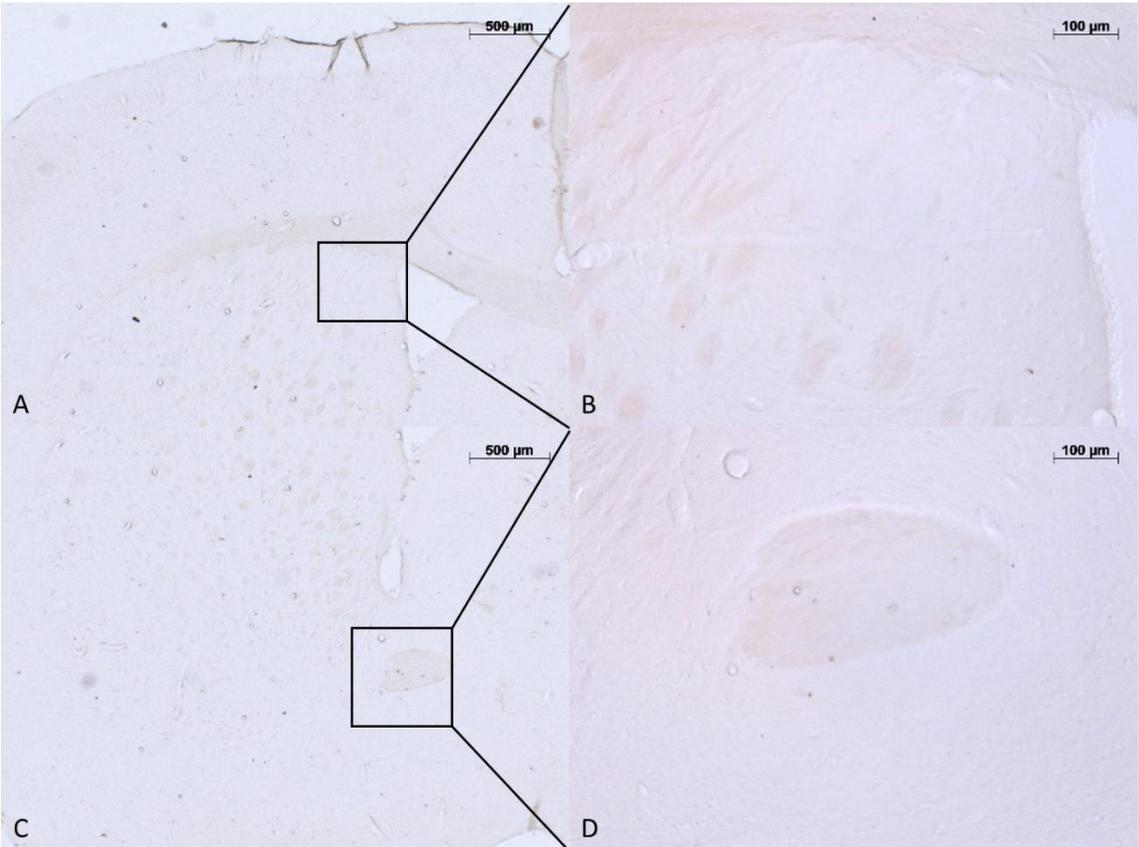


Abbildung 49: Mikroskopaufnahmen von repräsentativen Kontrollschnitten des Striatums. **A, B** Striatum; **C, D** Commissura anterior mit umgebenen Ncl. acc.