

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

angefertigt am Zentralinstitut für seelische Gesundheit in Mannheim  
(Prof. Dr. Rainer Spanagel)

**Charakterisierung des Phänotyps einer Mausmutante mit  
konditionaler Deletion der NMDA Rezeptoruntereinheit NR1 in  
dopaminergen Neuronen**



**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Nina Reinmuth  
aus Heidelberg  
München 2010

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun**  
**Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ammer**  
**Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Aigner**  
**Univ.-Prof. Dr. Göbel**

**Tag der Promotion: 13. Februar 2010**

**Für Christoph**

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	
<b>1.1</b>	<b>DAS GLUTAMATERGE SYSTEM</b>	<b>1</b>
1.1.1	Glutamat	1
1.1.2	Synthese, Metabolismus, Inaktivierung	2
1.1.3	Glutamat-Rezeptoren	4
1.1.3.1	Ionotrope und metabotrope Glutamat-Rezeptoren	5
	Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR)	7
	Die ionotropen Glutamat-Rezeptoren (iGluR)	10
1.1.3.2	NMDA-Rezeptor	11
1.1.3.2.1	NR1-Untereinheit	16
1.1.3.2.2	Lokalisation im ZNS	18
1.1.3.3	Das glutamaterge System	19
<b>1.2</b>	<b>DAS DOPAMINERGE SYSTEM</b>	<b>20</b>
1.2.1	Dopamin	20
1.2.2	Synthese, Metabolismus, Inaktivierung	21
1.2.3	Dopamin-Rezeptoren	25
1.2.4	Dopamintransporter (DAT)	28
1.2.5	Lokalisation des dopaminergen Systems im ZNS	29
<b>1.3</b>	<b>INTERAKTIONEN ZWISCHEN DEM GLUTAMATERGEN- UND DEM DOPAMINERGEN SYTEM</b>	<b>33</b>
<b>1.4</b>	<b>SÄUGETIERMODELLE ZUR IN VIVO CHARAKTERISIERUNG VON NMDA-REZEPTOREN</b>	<b>35</b>
1.4.1	Die Maus als Modellorganismus	35
1.4.2	Die Möglichkeit der genetischen Manipulation des Mausmodells	36

1.4.3	Die Cre-Rekombinase zur induzierbaren, konditionalen Gendeletion	40
1.4.4	Das Mausmodell „DATCreERT2-NR1“	43
<b>1.5</b>	<b>VERHALTENSTESTS</b>	<b>45</b>
1.5.1	Lokomotorische Aktivität im Offenfeld	45
1.5.2	Nestbauverhalten	46
1.5.3	Soziale Interaktion	48
1.5.4	Wiedererkennungstest ( <i>object recognition test</i> )	48
1.5.5	Emotionales Verhalten	49
1.5.5.1	Erhöhtes Plus-Labyrinth ( <i>elevated plus-maze</i> )	49
1.5.5.2	Hell-Dunkel-Box ( <i>light-dark-emergence test</i> )	50
1.5.6	Präpulsinhibition ( <i>PPI</i> ) der akustisch ausgelösten Schreckreaktion ( <i>ASR</i> )	51
<b>1.6</b>	<b>ZIEL DER ARBEIT</b>	<b>53</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>		
<b>2.1</b>	<b>VERSUCHSTIERE</b>	<b>54</b>
2.1.1	Tiere und Tierzucht	54
2.1.2	Tierhaltung	54
<b>2.2</b>	<b>VERHALTENSTESTS</b>	<b>55</b>
2.2.1	Lokomotorische Aktivität	55
2.2.2	Nestbauverhalten	57
2.2.3	Soziale Interaktion	58

2.2.4	Wiedererkennungstest ( <i>object recognition test</i> )	60
2.2.5	Emotionales Verhalten	64
2.2.5.1.	Erhöhtes Plus-Labyrinth ( <i>elevated plus-maze</i> )	64
2.2.5.2.	Hell-Dunkel-Box ( <i>light-dark-emergence test</i> )	66
2.2.6	Präpulsinhibition ( <i>PPI</i> ) der akustisch ausgelösten Schreckreaktion ( <i>ASR</i> )	68

### **3. ERGEBNISSE**

3.1	Gewicht	70
3.2	Lokomotorische Aktivität	71
3.3	Nestbauverhalten	72
3.4	Soziale Interaktion	74
3.5	Wiedererkennungstest ( <i>object recognition test</i> )	77
3.6	Emotionales Verhalten	81
3.6.1	Erhöhtes Plus-Labyrinth ( <i>elevated plus-maze</i> )	81
3.6.2	Hell-Dunkel-Box ( <i>light-dark-emergence test</i> )	83
3.7	PPI der ASR	87

### **4. DISKUSSION**

4.1	Gewicht	89
4.2	Lokomotorische Aktivität	90
4.3	Nestbauverhalten	97
4.4	Soziale Interaktion	98
4.5	Wiedererkennungstest ( <i>object recognition test</i> )	99
4.6	Emotionales Verhalten	102
4.7	PPI der ASR	104

<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	107
<b>6.</b>	<b>SUMMARY</b>	109
<b>7.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	110
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	113
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	132
<b>10.</b>	<b>ERKLÄRUNG</b>	134

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 DAS GLUTAMATERGE SYSTEM

### 1.1.1 Glutamat

Glutamate (Abb.1) sind Salze oder Ester der Aminosäure Glutaminsäure (2-Aminoglutar-säure), aber auch in der Medizin und der Biologie, in der die Glutaminsäure vor allem dissoziiert vorliegt, wird sie als Glutamat bezeichnet. Dabei kann die Glutaminsäure in zwei Spiegelbildisomeren, so genannten Enantiomeren, vorkommen, wobei sie in der Natur fast nur in der Konfiguration des L-(+)-Glutamats vorliegt. In vielen Proteinen, beispielsweise des Quarks und Getreides, kommt Glutaminsäure in hoher Zahl vor. Aber auch im menschlichen Körper ist sie als proteinogene Aminosäure Baustein vieler Proteine, Bestandteil des Zellstoffwechsels und an der Bildung anderer Aminosäuren beteiligt. Sie bindet das beim Aminosäureabbau entstehende Zellgift Ammoniak und ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) der Wirbeltiere. Glutamat ist im Gehirn wahrscheinlich an fast allen physiologischen Abläufen, wie beispielsweise Gedächtnis, Lernen und Kognition, beteiligt (Danbolt, 2001), aber auch bei der Entwicklung des ZNS (McDonald et Johnston, 1990; Vallano, 1998), der Ausbildung neuronaler Fortsätze (Pearce et al., 1987; Rajan et Cline, 1998), der Aktivität GABAerger Neuronen (van den Pol et al., 1998) und der Neuronenmigration (Komuro et Rakic , 1993; Rossi et Slater , 1993). Auch in der Peripherie ist es in Organen, Geweben und Endokrinum ein unverzichtbarer Transmitter.

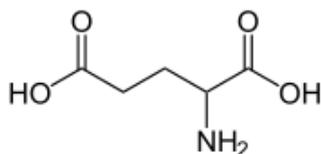


Abb.1 Strukturformel des Glutamats.

Im Gehirn ist der erregende Neurotransmitter Glutamat die einzige Aminosäure, die dort oxidiert, transaminiert, aminiert und zu  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), dem wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter, decarboxyliert werden kann. Zudem spielt Glutamat bei vielen ZNS-Funktionen, wie motorischer, mnestischer und kognitiver Funktionen eine entscheidende Rolle (Danbolt, 1994). Des Weiteren wird freies Natrium-Glutamat als Geschmacksverstärker mit der Geschmacksrichtung „umami“, was auch als fünfte Geschmacksrichtung bezeichnet wird und vor allem in Verbindung mit Kochsalz einen intensiven würzig-fleischigen Geschmack vermittelt, hauptsächlich in Japan und China

verwendet. Aber auch in vielen Fertigprodukten ist Glutamat unter der Bezeichnungen E620-E625 zu finden.

Glutamat kann unter bestimmten Bedingungen toxisch wirken, indem es über Aktivierung spezifischer Glutamatrezeptoren zu akutem oder chronischem Neuronenuntergang führt, man spricht auch von der „Exzitotoxizität“. Bei dieser toxischen Wirkung, die sich experimentell durch den N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Antagonisten (NMDAR-Antagonisten), wie beispielsweise Ketamin, hemmen lässt, spielen vor allem die NMDA-Rezeptoren (NMDAR) eine entscheidende Rolle, da deren Aktivierung zu einem Kalziumioneneinstrom und damit letztendlich zur Aktivierung kataboler Enzyme führt. Dieser Mechanismus wird zurzeit im Zusammenhang mit Hypoxie, Hypoglykämie, Ischämie, Traumen und chronischen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der alkoholassozierten Gehirnatrophie, diskutiert (Bleich et al., 2000).

### 1.1.2 Synthese, Metabolismus, Inaktivierung

Der Neurotransmitter Glutamat kann aus verschiedenen Quellen stammen. Da L-Glutamat die Blut-Hirnschranke nicht passieren kann, wird das im ZNS vorkommende L-Glutamat ausschließlich lokal in den Neuronen oder Gliazellen synthetisiert.

Zum einen kann Glutamat im so genannten Glutamatzyklus innerhalb des Citratzyklus aus  $\alpha$ -Ketoglutarat (2-Oxoglutarat) und Ammoniak gebildet werden. Dabei entsteht durch Transaminierung Glutamat (Abb.2). Durch ein weiteres Ammoniumion kann Glutamat zu dem Glutaminsynthetase-katalysiertem Glutamin metabolisiert werden, welches zur Proteinsynthese und als Energielieferant der Enterozyten dient, oder durch Decarboxylierung zu dem wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter GABA transformiert werden.

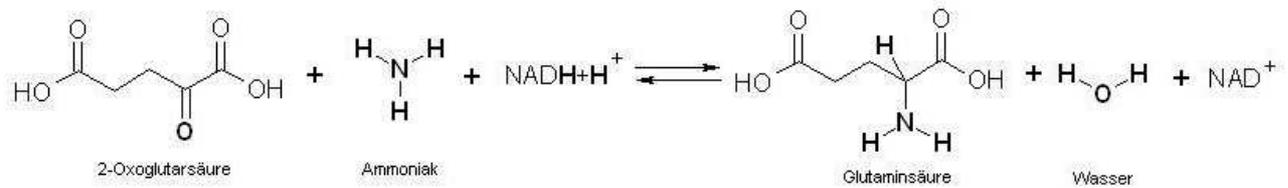


Abb.2 Die Abbildung zeigt den Glutamatdehydrogenase-katalysierten Teil des Citratzyklus. Das ubiquitär vorkommende Intermediärprodukt des Citratzyklus  $\alpha$ -Ketoglutarat (2-Oxoglutarat) wird katalysiert durch die Glutamatdehydrogenase zu L-Glutamat synthetisiert.

Eine andere Möglichkeit der Glutamatsynthese ist der Glutaminzyklus (Abb.3 D), wobei das synaptisch freigesetzte Glutamat in die umliegenden Gliazellen transportiert wird, dort mittels Glutaminsynthetase in Glutamin transformiert wird und bei Bedarf in glutamaterge Zellen gelangt, um dort glutaminasekatalysiert in Glutamat und Ammoniak gespalten zu werden.

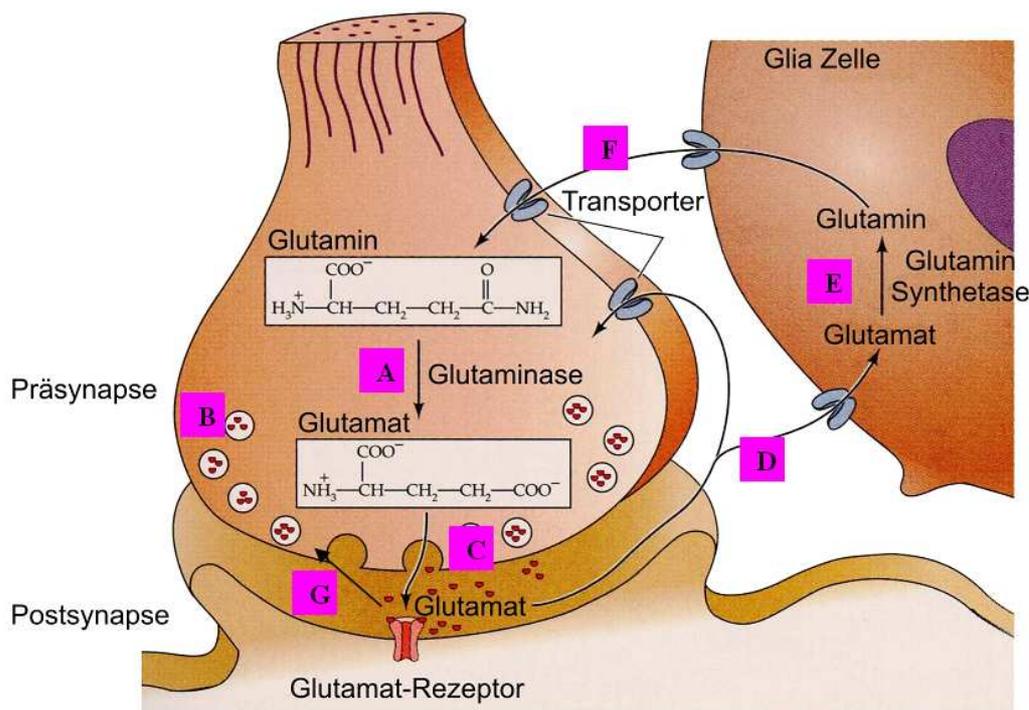


Abb.3 Der Glutamatkreislauf am Neuron:

- (A) Glutamatsynthese aus Glutamin durch das intrazelluläre Enzym Glutaminase.
- (B) Aufnahme und Speicherung des Glutamats in Vesikel.
- (C) Glutamatfreisetzung in den synaptischen Spalt.
- (D) Glutamataufnahme durch hochaffine Glutamattransporter in benachbarte Gliazellen.
- (E) Abbau des Glutamats durch die gliale Glutaminsynthetase zu Glutamin.
- (F) Rücktransport von Glutamin in die Präsynapse des glutamatergen Neurons.
- (G) Wiederaufnahme des Glutamats durch hochaffine Glutamattransporter in das glutamaterge Neuron.

Glutamat kann aber auch direkt aus dem synaptischen Spalt in das Axoplasma glutamaterger Neuronen aufgenommen werden (Abb.3 G), um dann mittels des elektrochemischen Protonengradienten in speziellen Vesikeln gespeichert und bei Bedarf freigesetzt zu werden.

Um die glutamaterge Informationsübertragung zeitlich zu begrenzen, ist es nötig, die Wirkung des synaptisch freigesetzten Glutamats, wie oben erwähnt, durch verschiedene Mechanismen zu inaktivieren. Da es für Glutamat keinen extrazellulären Metabolismus gibt, wird es über drei verschiedene, energieabhängige Transportersysteme, den natriumionen-abhängigen, den chloridionenabhängigen oder den protonenabhängigen Transporter, wieder zellulär aufgenommen. Dadurch wird die extrazelluläre Glutamatkonzentration reguliert (Danbolt, 1994; Danbolt, 2001). Über bisher fünf bekannte spezifische natriumionen-abhängige Transporter, so genannte EAAT1-5 (exzitatorischer Aminosäure-Transporter), kann Glutamat zum einen in das präsynaptische, glutamaterge Neuron aufgenommen werden, welches es dann vesikulär speichert. Zum anderen kann es aber auch vorrangig durch EAAT1 und EAAT2, in umliegende Gliazellen transportiert werden, um dann dem oben beschriebenen Glutaminzyklus zugeführt zu werden. Dadurch wird die extrazelluläre Glutamatkonzentration auf einem niedrigen Niveau gehalten. Wäre dies nicht der Fall, würden erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentrationen über die osmotische Zellschwellung, welche durch den erhöhten Natriumionen- und Wassereinstrom oder Aktivierung enzymatischer Zellyse bedingt wird, neurotoxisch wirken.

### 1.1.3 Glutamat-Rezeptoren

Bei den Glutamatrezeptoren (GluR) handelt es sich um transmembranäre Glykoproteine, deren zelluläre Effekte von dem Neurotransmitter Glutamat vermittelt werden.

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Transmitter, annähernd 50 Prozent aller Neuronen werden durch diesen Transmitter moduliert. Dabei bindet Glutamat sowohl an post-synaptische Rezeptoren als auch an Autorezeptoren der präsynaptischen glutamatergen Nervenzelle (Lynch et Guttman, 2001). Die Aktivierung präsynaptischer GluR, den so genannten Autorezeptoren, führt zu einer negativen Rückkopplung der Neurotransmission, beispielsweise durch Hemmung spannungsabhängiger Kalziumionenkanäle oder direkter Regulation des Exozytoseapparates (Pin et Bockaert, 1995; Pin et Duvoisin, 1995a et 1995b; Ikeda, 1996; Takahashi et al., 1996). Glutamaterge, exzitatorische Synapsen spielen im

ZNS bei einer Vielzahl neuronaler Prozesse, wie beispielsweise dem Lernen und der neuronalen Plastizität (Collingridge, 1987; Nakanishi, 1992), aber auch bei der schon erwähnten Neurotoxizität durch überhöhten Kalziumioneneinstrom (Coyle et Puttfarcken, 1993), eine entscheidende Rolle.

Ein Aktionspotential führt zur präsynaptischen Ausschüttung von Glutamat in den synaptischen Spalt. Hier kann es sowohl ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluR) als auch metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) aktivieren (Abb.4). iGluRs (Abb.4, grau dargestellt) sind prä- und postsynaptisch lokalisiert. Die mGluRs der I Gruppe (Abb.4, gelb dargestellt) liegen vor allem postsynaptisch, mGluRs der Gruppe II (Abb.4, grün dargestellt) sind hingegen vorwiegend in der Peripherie der synaptischen Membranen lokalisiert und die mGluRs der Gruppe III (Abb.4, rot dargestellt) liegen hauptsächlich präsynaptisch (Ottersen und Landsend, 1997).

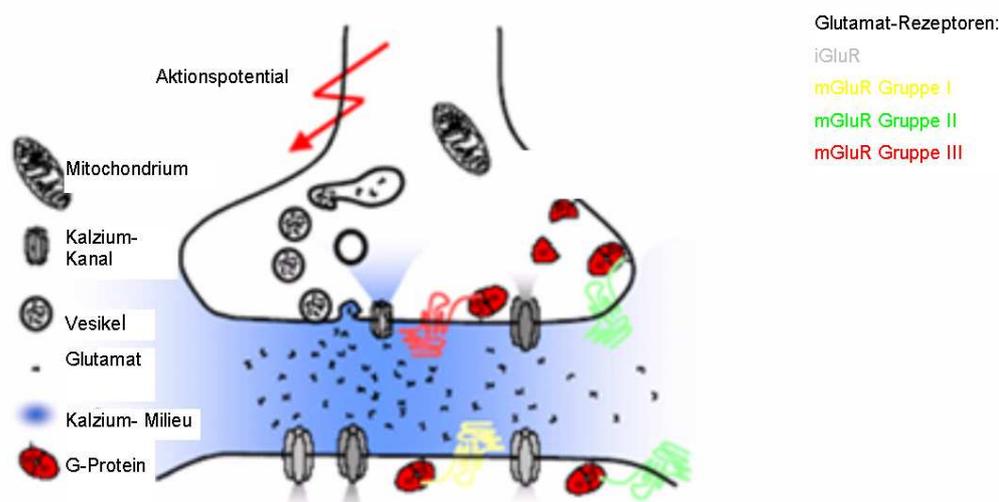


Abb.4 Schematische Darstellung einer glutamatergen Synapse mit der Lokalisation der verschiedenen GluRs.

### 1.1.3.1 Ionotrope und metabotrope Glutamat-Rezeptoren

Glutamatrezeptoren werden auf Grund ihrer verschiedenen Signaltransduktion in zwei Klassen unterteilt (Abb.5 und Abb.6), die mGluRs und die iGluRs (Kornhuber et al., 1999).

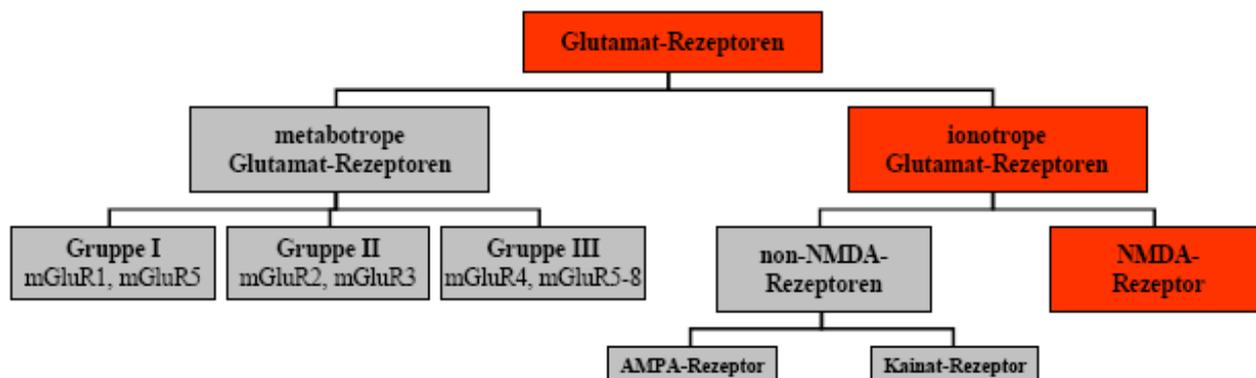


Abb.5 Einteilung der zwei verschiedenen Glutamat-Rezeptor-Klassen. Die Zugehörigkeit des NMDA-Rezeptors ist farblich besonders hervorgehoben.

Die iGluRs führen zu einer schnellen Signaltransduktion mit einer Latenz zwischen Rezeptorbindung und Effekt von unter fünf Millisekunden, sie gehören zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen. Bei ihnen befinden sich Glutamatbindungsstelle und Ionenkanal als zellulärer Effektor vereint in einem transmembranären Makromolekül. Bei den mGluRs ist die Glutamatbindungsstelle hingegen räumlich getrennt von den zellulären Effektoren. Sie zählen zu den phylogenetisch ältesten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und lösen langsamere postsynaptische Potentiale aus. Dabei aktivieren sie rezeptor-assoziierte Enzyme, welche wiederum metabolische Prozesse im Zellinneren in Gang setzen und somit indirekt die Membraneigenschaften beeinflussen. Die Latenz der synaptischen Übertragung bei mGluRs von der Glutamatbindung an den Rezeptor bis zum Eintritt des Effekts beträgt über zehn Millisekunden, allerdings führen sie auch zu länger anhaltenden (Sekunden bis Minuten) synaptischen Vorgängen.

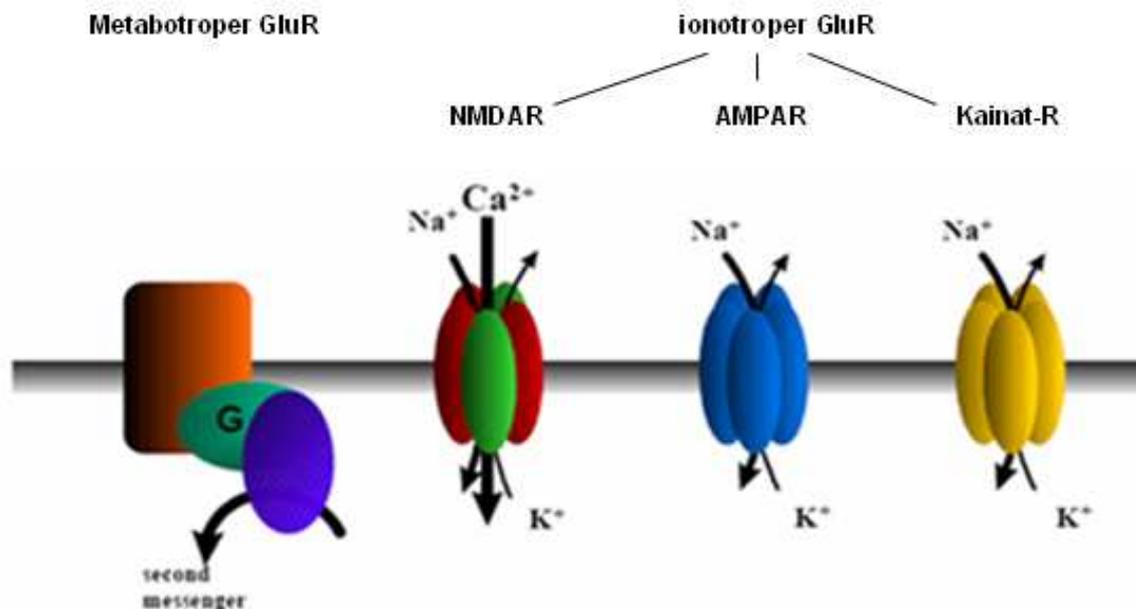


Abb.6 Unterschiedliche Wirkungsweise der einzelnen Glutamatrezeptoren. Während mGluRs ihre Signale über G-Protein in das Zellinnere weiterleiten und nur indirekt das Membranpotential beeinflussen, führt die Glutambindung an einem iGluR direkt zu Veränderungen der Leitfähigkeit des im iGluR integrierten Ionenkanals.

## Die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR)

Die bisher acht bekannten mGluRs werden chronologisch, entsprechend ihrer Entdeckung, von GluR1 bis GluR8 durchnummeriert. Dabei werden die verschiedenen mGluRs, die alle zu den Guaninnukleotid-bindenden-Protein (G-Protein) gekoppelten Rezeptoren gehören, auf Grund ihres Rezeptoraufbaus, der Signaltransduktion und ihrer pharmakologischen Eigenschaften wiederum in drei Gruppen eingeteilt (Stark et al., 2000).

Alle drei Rezeptortypen der mGluR-Gruppen bestehen aus einem Multi-Domänen-Protein, welches als Dimer in die Zytoplasmamembran eingefügt ist (Abb.7). Das aminoterminal Ende (N-Terminus) liegt extrazellulär und beinhaltet eine Ligandenbindungsregion, die in zwei deutliche Subdomänen unterteilt ist und in deren Furche das Glutamat bindet; man spricht auch von der Glutamatbindungstasche. Daran schließt die transmembrane Region an, welche die Membran siebenmal durchkreuzt. Die zweite (Abb.7: i2), der insgesamt drei intrazellulären Schleifen übernimmt dabei hauptsächlich, mittels einer amphiphilen  $\alpha$ -Helix,

die Interaktion mit dem C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins (Pin et al., 1995; Gomez et al., 1996a et 1996b), bei allen anderen G-Protein gekoppelten Rezeptoren interagiert die dritte intrazelluläre Schleife mit der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins. Zudem ist sie an der G-Protein Kopplung beteiligt (Pin et Duvoisin, 1995a) und Bindungsstelle für zahlreiche regulatorische Proteine, wie beispielsweise die Kinasen. Innerhalb einer Gruppe weisen die verschiedenen mGluRs eine Aminosäureidentität von 70 Prozent auf, zwischen den Gruppen liegt sie nur bei 45 Prozent (Nakanishi, 1992).

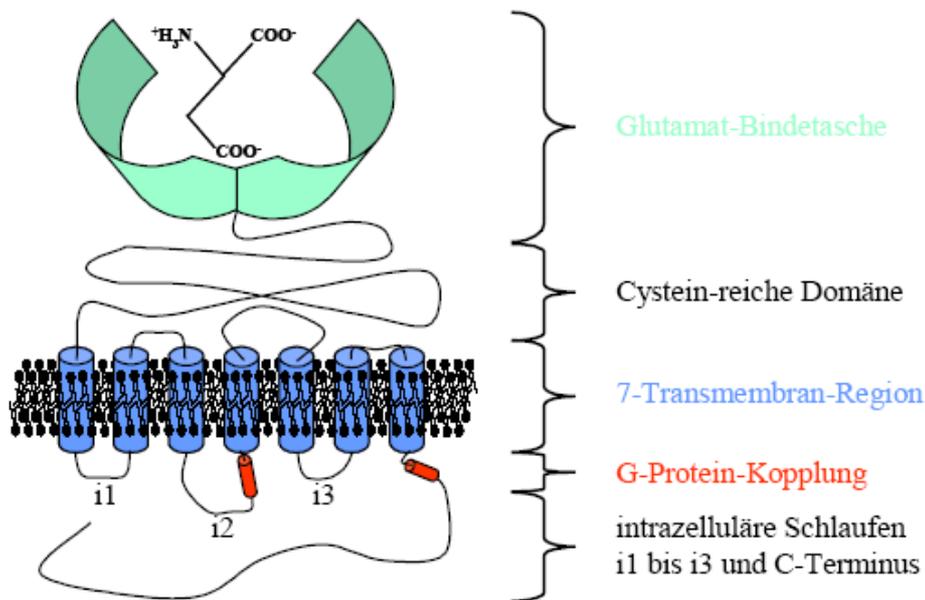


Abb.7 Schematische Darstellung eines metabotropen Glutamatrezeptors.

Bei den mGluRs liegen, im Gegensatz zu den iGluRs, die Ligandenbindungsstelle und die zellulären Effektoren als getrennte Einheiten vor, wobei das trimetrische G-Protein, bestehend aus den Untereinheiten  $G\alpha$ ,  $G\beta$  und  $G\gamma$ , die Verbindung zwischen beiden herstellt. Die verschiedenen mGluRs aktivieren über verschiedene G-Proteine unterschiedliche Signalkaskaden mit unterschiedlichen Effekten (Abb.8; Zusammenfassung: Tab.1).

Tab.1 Charakterisierung der drei verschiedenen metabotropen Glutamatrezeptor Gruppen.

Gruppe der mGluR	I	II	III
<b>dazugehörige Rezeptoren</b>	mGluR1 mGluR5	mGluR2 mGluR3	mGluR4 mGluR6 mGluR7 mGluR8
<b>hauptsächliche Lokalisation</b>	postsynaptisch	perisynaptisch	präsynaptisch
<b>Klasse der aktivierten G-Proteine</b>	G $\alpha$	G $\alpha$ 0/i	G $\alpha$ 0/i
<b>G-Protein abhängige Signalkaskade</b>	aktivieren Phospholipase C (PLC)	hemmen Adenylatcyclase	hemmen Adenylatcyclase
<b>Effekte</b>	„Erhöhte neuronale Aktivität (Excitabilität)“ Aktiviert PLC → IP3 (Kalzium $\uparrow$ ) → DAG (PKC)  <b>exzitatorisch</b>	„Reduzierte neuronale Erregbarkeit“ → intrazelluläres cAMP $\downarrow$ → aktiviert Kalium- ionenkanäle  (Hyperpolarisation) → blockt Kalzium- Ionenkanäle <b>inhibitorisch</b>	„Reduzierte neuronale Erregbarkeit“ → intrazelluläres cAMP $\downarrow$ → aktiviert Kalium- ionenkanäle  (Hyperpolarisation) → blockt Kalzium- Ionenkanäle <b>inhibitorisch</b>

Wie schon erwähnt, unterscheiden sich die einzelnen Gruppen nicht nur in ihren intrazellulären Signalwegen, sondern auch in ihrer synaptischen Lokalisation. Die GluRs der Gruppe I, welche hauptsächlich postsynaptisch liegen, sind an der Regulation der kolokalisierten, ionotropen NMDARs beteiligt (Alagarsamy et al., 1999a et 1999b), wohingegen die meist perisynaptisch lokalisierten mGluRs der Gruppe II vermutlich nur indirekt an der Regulation der Neurotransmission beteiligt sind. Vorrangig präsynaptisch lokalisiert sind die mGluRs der Gruppe III, mit Ausnahme des prä- und postsynaptischen mGluR6 der Retina

(Nomura et al., 1994); sie spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der direkten Regulation der Neurotransmission.

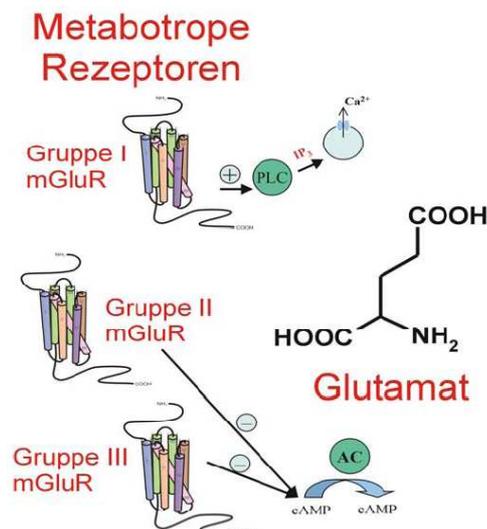


Abb.8 Die verschiedenen Wirkungen der unterschiedlichen Gruppen der mGluRs. Während die mGluRs der Gruppe I exzitatorisch wirken, führt die Aktivierung der mGluRs der Gruppe II und III infolge der Hyperpolarisation zu einer inhibitorischen Wirkung.

## Die ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluR)

Alle iGluRs wirken exzitatorisch und dienen der schnellen synaptischen Übertragung. Dabei werden die iGluRs grob in zwei Klassen, die NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren (AMPA- und Kainat-Rezeptoren) unterteilt (Abb.5). Bezeichnet werden die iGluRs nach ihren selektiven Agonisten als  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure- (AMPA), N-Methyl-D-Aspartat- (NMDAR) und Kainat-Rezeptoren. Glutamat bewirkt an iGluRs ein biphasisches, depolarisierendes Potential. Die non-NMDA-Rezeptoren sind für den schnellen Anteil der Signaltransduktion des exzitatorischen, postsynaptischen Membranpotentials (EPSP) verantwortlich. Dies wird durch eine hohe, selektive Permeabilität für die monovalenten Natrium- und Kaliumionen gewährleistet. Der NMDAR ist hingegen für die langsamere, aber auch länger anhaltende Komponente des EPSPs verantwortlich. Neben der hohen Permeabilität für Natrium- und Kaliumionen zeichnet er sich durch eine zusätzliche sehr hohe Permeabilität für Kalziumionen aus (Stark et al., 2000).

Die iGluRs bestehen entweder aus vier (NMDAR und AMPAR) oder fünf (Kainat-Rezeptor) Untereinheiten, welche zusammen den Ionenkanal bilden. Dabei enthält jede Untereinheit

drei, die Membran durchspannende Segmente (Abb.11: M1, M3 und M4), sowie einem Segment (M2). M2 tritt von der cytoplasmatischen Seite in die Zellmembran ein- und wieder aus (reentrant loop), ohne die Membran dabei vollständig zu durchqueren. Die dadurch gebildete Pore scheint für die Kationenselektivität verantwortlich zu sein. Der pentamere Kainat-Rezeptor setzt sich aus insgesamt fünf verschiedenen Untereinheiten, den GluR5- bis GluR7-sowie den KA1- und KA2-, der tetramere AMPAR aus vier verschiedenen, den GluR1- bis GluR4- und der tetramere NMDA-Rezeptor (Abb.9) aus sieben verschiedenen, den NR1-, NR2A-, bis NR2D- sowie NR3A- und NR3B-Untereinheiten zusammen.

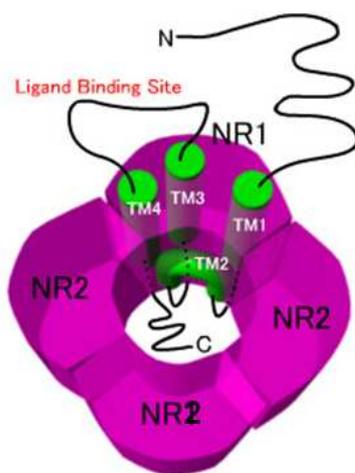


Abb.9 Schematische Darstellung eines tetrameren iGluRs.

### 1.1.3.2 Der NMDAR

Namensgebend ist die synthetische Aminosäure N-Methyl-D-Aspartat, für die der NMDAR im Vergleich zu den anderen Glutamatrezeptoren die höchste Selektivität aufweist. Daneben wirken noch die endogenen exzitatorischen Aminosäuren L-Aspartat und L-Glutamat (Abb.10), für die der NMDAR die höchste Affinität besitzt, agonistisch auf den NMDAR.

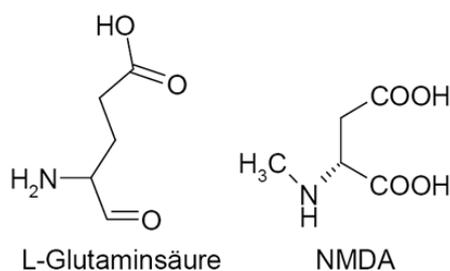


Abb.10 Strukturformel der beiden wichtigsten NMDAR-Liganden.

Der tetramere NMDAR (Abb. 9) setzt sich wie bereits erwähnt aus den fünf verschiedenen Untereinheiten, NR1, NR2A bis NR2D, NR3A und NR3B zusammen, wobei die beiden NR3-Untereinheiten bisher nur beim Nagetier charakterisiert wurden (Matsuda et al, 2002). Die Zusammensetzung der verschiedenen Untereinheiten scheint dabei die biophysikalischen Eigenschaften des Rezeptors zu bestimmen und variiert in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand und der betrachteten Gehirnregion. Der funktionelle NMDAR besteht aus vier Untereinheiten, allerdings wird auch die Möglichkeit der pentameren Struktur diskutiert (Williams, 2001; Magazanik et al., 2002). Dabei bilden zwei NR1- und zwei der möglichen NR2A-D-Untereinheiten, beim Kaninchen auch die NR3-Untereinheiten, den tetrameren Rezeptor (Dingledine et al., 1999). Die NR1-Rezeptoruntereinheit, die die Glycin-Bindungsstelle beinhaltet, ist bei jedem NMDAR essentiell, denn nur so ist der Rezeptor funktionsfähig (Stephenson, 2001; Danysz et Parsons, 1998). Die Verteilung der NR2A-D-Untereinheiten, auf welchen sich die L-Glutamat-Bindungsstelle befindet, variiert, was die Kanaleigenschaften und die Sensitivität gegenüber Antagonisten bedingt (Monyer et al., 1994; Buller et Monaghan, 1997; Danysz et Parsons, 1998; Meldrum, 2000). Verschiedene Kombinationen bedingen beispielsweise zum einen die später näher erläuterte, unterschiedlich starke Spannungsabhängigkeit des Magnesiumkanalblocks der NMDA-Rezeptoren und zum anderen eine unterschiedliche Wirkungsdauer (Monyer et al., 1994).

Allgemein besteht jede Untereinheit des NMDAR (Abb.11) aus einem extrazellulären N-Terminus, vier hydrophoben Membrandomänen (Abb.11: M1, M2, M3 und M4) und einem intrazellulären C-Terminus. Der N-Terminus scheint eine wichtige Rolle bei der untereinheitenspezifischen Assemblierung zu spielen (Ayalon et Stern-Bach, 2001a et 2001b; Meddows et al., 2001), daneben binden Modulatoren an dieser Stelle und beeinflussen durch allosterische Mechanismen die Kanalöffnung (Masuko et al., 1999; Paoletti et al., 2000; Zheng et al., 2001; Perin-Dureau et al., 2002). Die Ligandenbindungsstelle befindet sich extrazellulär (Williams, 2001), der Ligand wird über einen Venusfliegenfallenmechanismus durch Einschluss zwischen S1 und S2 gebunden (Oh et al., 1993). Während M1, M3 und M4 die Membran vollständig durchziehen, ist M2 als Schleife von der cytoplasmatischen Seite in die Membran eingelagert (reentrant loop). Die M2-Domänen aller Untereinheiten bilden die Kanalpore nativer Rezeptorkomplexe (Williams, 2001), wobei der reentrant loop wesentlich die elektrophysiologische Eigenschaften des Kanals bestimmt (Wood et al., 1995; Panchenko et al., 2001). Durch Kinasen, wie beispielsweise die Kalzium Kalmodulinkinase II (CaMK II), die Proteinkinase A und C oder die Tyrosinkinase (Chen et Huang, 1992; Leonard et Hell, 1997; Omkumar et Kiely, 1996), kommt es zu einer Phosphorylierung der C-

Terminal. Dadurch wird die Kanalleitungsfähigkeit des NMDARs, mittels einer Potenzierung der Kanalöffnungsfrequenz und Öffnungswahrscheinlichkeit bei der Ligandenbindung (Kim et Haganir et al., 1999), reguliert.

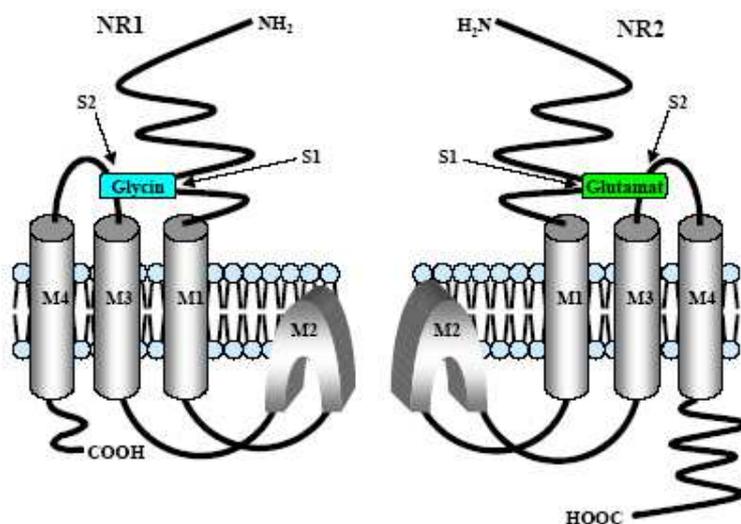


Abb.11 Topologie des NMDARs. In der NR1-Untereinheit befindet sich die Bindungsstelle für den Koagonisten Glycin, während die NR2-Untereinheit die Bindungsstelle für den Agonisten L-Glutamat bzw. NMDA besitzt. Die M2-Domänen aller Untereinheiten bilden die Kanalpore des Rezeptors.

Wie bereits oben erwähnt, weist der NMDAR einige besondere Merkmale im Vergleich zu den anderen non-NMDARs auf. So besitzt er neben der Permeabilität für Natrium- und Kaliumionen, welche alle iGluRs aufweisen, auch eine hohe Durchlässigkeit für Kalziumionen. Dadurch werden Signale nicht nur wie bei den non-NMDARs über Membrandepolarisation weitergeleitet, sondern mittels des Kalziumstroms verschiedene Second-Messenger-Systeme aktiviert, die allerdings bei Überaktivierung auch cytotoxisch wirken können (Lynch et Guttman, 2002). Als weitere Besonderheit ist ihr Ionenkanal spannungsabhängig von extrazellulären Magnesiumionen blockiert, welche innerhalb des Kanals gebunden sind und somit den Durchtritt anderer Kationen durch die Kanalpore verhindern (Mayer et Westbrook, 1987; Sobolevskii et Khodorov, 2002). Einzigartig unter allen ligandengesteuerten Ionenkanälen ist der Koagonismus von L-Glutamat und Glycin des NMDARs (MacDermott et al., 1986; Thomson et al., 1989; Lummis et al., 2002).

Damit ein NMDAR aktiviert wird, müssen drei Voraussetzungen erfüllt sein. Zuerst einmal muss die Membran depolarisiert werden, beispielsweise über kolokalisierte AMPARs, wodurch der spannungsabhängige Magnesiumblock des Ionenkanals aufgehoben wird. Bei

einer geringen synaptischen Glutamatfreisetzung werden allerdings nur AMPARs aktiviert, und somit erfolgt die Signaltransduktion lediglich durch eine Membrandepolarisierung der AMPARs. Erst bei höherer, länger andauernder oder wiederholter Glutamatausschüttung wird auch der NMDAR aktiviert. Zudem müssen sich, damit der NMDAR aktiviert wird, die beiden Koagonisten L-Glutamat und Glycin gleichzeitig an ihren Bindungsstellen des Rezeptors anlagern (Lynch et Guttman, 2001). Der NMDAR wird auch als molekularer Koinzedenzdetektor bezeichnet, da er erst bei Membrandepolarisation und dem gleichzeitigen Vorhandensein von Glutamat und Glycin den Ionenkanal öffnet und somit erst bei gleichzeitiger prä- und postsynaptischen Aktivität leitfähig ist. Daneben können auch noch andere Stoffe über weitere allosterische Bindungsstellen die Rezeptoreigenschaften beeinflussen (Stark et al., 2000).

Der Kalziumeinstrom bedingt nicht nur eine Membrandepolarisation, sondern bewirkt auch als intrazellulärer Botenstoff länger andauernde Veränderungen, wie beispielsweise die Expression von Genen, was als Grundlage für Lern- und Gedächtnisprozesse diskutiert wird (Maren et Baudry, 1995; Asztely et Gustafsson, 1996). Der NMDAR spielt aber auch eine essentielle Rolle beim Prozess der Induktion von plastischen Veränderungen an Kontaktstellen zwischen Neuronen. Damit nimmt er vermutlich eine herausragende Stellung bei der Gedächtnisbildung ein (Gnegy, 2000; Platenik et al., 2000). Der NMDAR ist auch an dem Prozess der „Long Term Potentiation“ (LTP) beteiligt, einer lang anhaltenden stimulusinduzierten Plastizität synaptischer Kommunikationen im Hippokampus (HIPPO). Dies bildet die Grundlage für Lernvorgänge, Emotionen und Gedächtnisbildung. Dabei beschreibt das LTP die Steigerung der Feuerungsrate postsynaptischer Zellen nach tetanischer Stimulation und Potenzierung der Reaktion von Pyramidenzellen auf nachfolgende Stimuli, die wochenlang anhalten kann (Bliss et Gardner-Medwin, 1973; Bliss et Lomo, 1973). Die besonderen Merkmale des NMDARs führen zu einer Art Konditionierbarkeit der Neuronen, wodurch die Möglichkeit der logischen Verknüpfung besteht und mittels Ausbildung neuronaler Schaltkreise die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen möglich wird. Dies wird auch als NMDAR-vermittelte, synaptische Plastizität bezeichnet (Stark et al., 2000).

Der NMDAR wird wie alle GluRs hauptsächlich im ZNS exprimiert, allerdings wurde er in letzter Zeit auch in Zellen des peripheren, nicht-neuronalen Gewebes nachgewiesen, so beispielsweise in Osteoblasten, -klasten, Keratinozyten, Inselzellen und Thrombozyten, des Weiteren aber auch in Zellen von Lunge, Dünndarm, Herz und Nebenniere (Skerry et Genever, 2001).

Der NMDAR wird neben L-Glutamat und Glycin auch noch von vielen anderen endogenen und exogenen Liganden beeinflusst, beispielsweise Zinkionen, Magnesiumionen, Protonen, Polyamine, Peptide oder Ethanol (Dingledine et al., 1999; Bence et al., 2000; Stark et al., 2000; Lynch et Guttman, 2001). Dabei wurden bisher sechs verschiedene Ligandenbindungsstellen identifiziert, die potentielle Angriffspunkte für Pharmaka liefern.

Klinisch ist der NMDAR vor allem in der Anästhesiologie von Bedeutung, da er durch die Bindung von Ketamin, Lachgas oder Xenon blockiert wird. Ketamin führt neben der Analgesie auch zu einem hypnotischen Zustand, bei dem allerdings, im Gegensatz zur hypnotischen Wirkung bei Aktivierung der GABA-Rezeptoren, sensorische Afferenzen weiterhin das Gehirn erreichen.

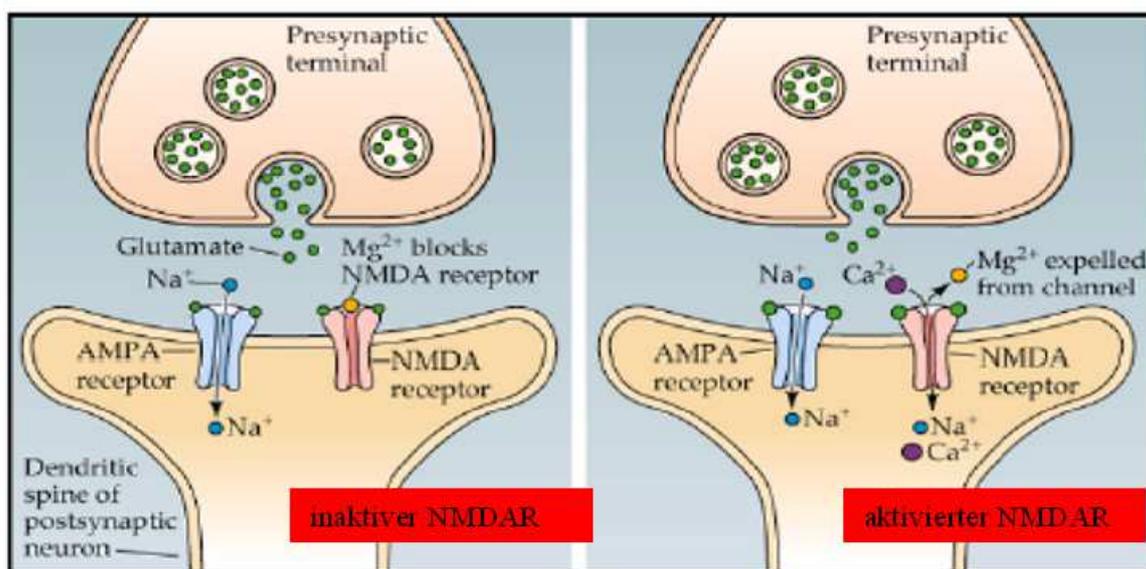


Abb.12 Inaktiver und aktiver Zustand des NMDAR. Im Ruhemembranpotential ist der NMDAR immer inaktiv, da der Ionenkanal durch Magnesium für Ionen blockiert ist. Erst bei der Depolarisation der postsynaptischen Membran und dem gleichzeitigen Vorkommen von Glutamat und Glycin kommt es neben dem Natrium- und Kaliumionenstrom auch zu dem für NMDAR typischen Kalziumioneneinstrom und dadurch zu weiteren biochemischen Veränderungen.

### 1.1.3.2.1 NR1-Untereinheit

Die NR1-Rezeptoruntereinheit des NMDAR beherbergt die Bindungsstelle des essentiellen Koagonisten Glycin (Kleckner et Dingledine, 1988), von dem bisher acht (NR1A-H) verschiedene Isoformen entdeckt wurden (Anantharam et al., 1992), die durch alternatives Spleißen entstehen. Dabei unterscheiden sich die NR1-Gene, welche aus insgesamt 22 Exons und 21 Introns bestehen (Dunah et al., 1999; Hollmann et Heinemann, 1994), durch das Vorhandensein oder Fehlen dreier verschiedener Exone, der 21 AS langen N-terminalen Kasette (Exon 5; Abb.13, N1), und zweier 37 beziehungsweise 38 AS langer C-terminalen Kassetten (Exon 21 und 22; Abb.13, C1 und C2).

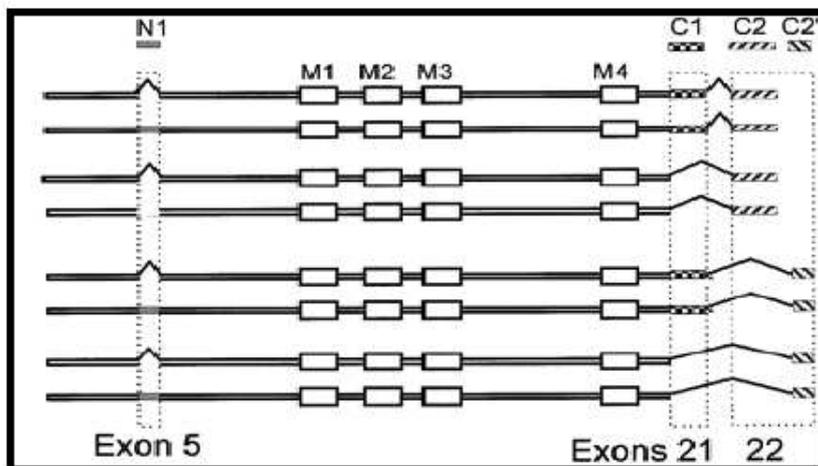


Abb.13 Die acht verschiedenen Isoformen der NMDAR-Untereinheit NR1 welche sich durch die Exone 5, 21 und 22 unterscheiden.

Dabei besitzen alle NR1-Isoformen dieselbe pharmakologische Sensitivität. Die Isoformen können auch nach der Anzahl ihrer N- und C-terminalen Domänen bezeichnet werden, so bedeutet beispielsweise NR1-011, dass das Protein keine N-Terminale (0), dafür aber zwei C-Terminale (11) besitzt.

Allgemein besteht die NR1-NMDAR-Untereinheit zu 50 Prozent aus einer extrazellulären N-terminalen Domäne, den beiden extrazellulären Segmenten S1 und S2, welche Glycin binden und drei transmembranen Domänen (Abb.14: 1, 3 und 4) und einer vierten, den Ionenkanal bildenden Schleife (Abb.14: TM2) (Zukin et Bennett, 1995).

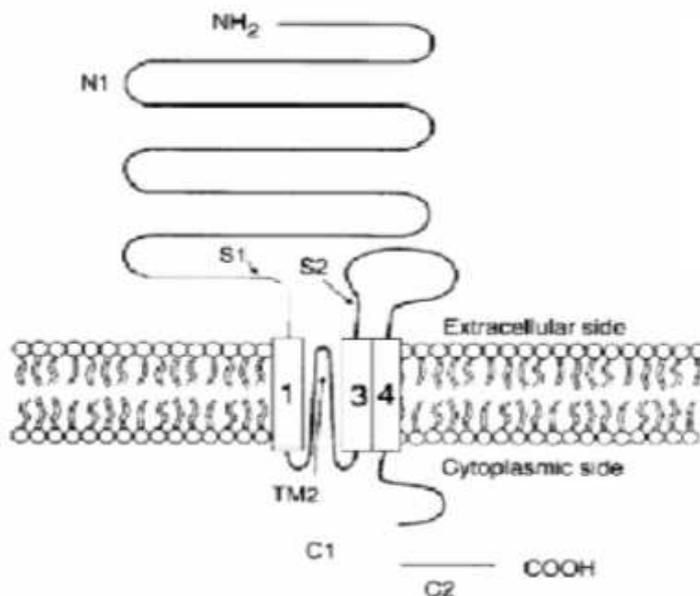


Abb.14 Aufbau der NR1-Untereinheit des NMDAR.

Die einzelnen Isoformen weisen regional unterschiedliche Expressionsmuster auf, deren hirnspezifische Expressionsrate sich im Laufe der Gehirnentwicklung verändert (Laurie et Seeburg, 1994). Die NR1-Untereinheit wird dabei in fast allen Hirnregionen exprimiert, bei adulten Tieren aber hauptsächlich im cerebralen Cortex, HIPP, olfactorischem Bulbus, Thalamus, Striatum, Hirnstamm und Cerebellum. So kommen im Cortex und HIPP hauptsächlich NR1A, beziehungsweise NR1-011 und NR1E, beziehungsweise NR1-000 (Sugihara et al., 1992; Zhong et al., 1995; Laurie et Seeburg, 1994), also Nr1-Untereinheiten ohne N-terminale Domäne, vor. Im Cerebellum adulter Lebewesen hingegen wird hauptsächlich die NR1G- beziehungsweise NR1-100-Untereinheit, also eine N-terminalhaltige NR1-Untereinheit, gefunden (Sugihara et al., 1992). Diese regionspezifischen Variationen sind wahrscheinlich Ausdruck für die verschiedenen Funktionen, die der NMDAR in unterschiedlichen Gehirnregionen erfüllt und deuten darauf hin, dass nicht nur die NR2- und NR3-Untereinheitenzusammensetzung des NMDAR für die biophysischen Eigenheiten verantwortlich sind. Ob diese NR1-Untereinheitenvarianten verschiedene Affinitäten zu den NR2- und NR3-Untereinheiten aufweisen, ist noch nicht bekannt.

„NR1-/- Knockout-Mäuse“ sterben neonatal bedingt durch Entwicklungsaberrationen in lebenswichtigen Hirnstammzentren (Forrest et al., 1994; Li et al, 1994), welche eventuell auch essentiell für die Vitalfunktion sind. Eine Reduktion der NR1-Untereinheit auf fünf Prozent führte zu lebensfähigen Mäusen, welche eine erhöhte Lokomotion, Stereotypien und

Defizite im Sozial- und Sexualverhalten zeigten. Wird die NR1-Rezeptoruntereinheit beispielsweise nur in der CA1 (Cornu Ammonis 1) Region des Ammonshorn im HIPP ausgeknockt (CA1-NR1-/-Mäuse) sind die Mäuse lebens- und fortpflanzungsfähig, zeigen aber Beeinträchtigungen des räumlichen Lernens in einer Morris Water-Maze-Aufgabe (Tsien et al., 1996). Somit sind NMDARs der CA1 Region für anfängliches Lernen neuer Aufgaben, als auch für die posttrainings Konsolidierungsphase von Bedeutung (Shimizu et al., 2000), wobei dies für räumliche und nicht-räumliche Gedächtnisinhalte relevant zu sein scheint. Bei kürzlich erzeugten CA3 spezifischen „NR1-Knockout-Mäusen“ ist das räumliche Lernvermögen normal, allerdings kommt es unter erschwerten Bedingungen, beispielsweise bei leichten Variationen der Lernsituationen, zu Beeinträchtigungen beim Abruf von Gedächtnisinhalten (Nakazawa et al., 2003). Des Weiteren können Serine die NR1-Untereinheit stimulieren und durch (+)-HA-966 können sie antagonisiert werden (Danysz et al., 1989).

#### 1.1.3.2.2. Lokalisation im ZNS

Wie oben bereits erwähnt, werden die verschiedenen NMDAR-Untereinheiten in den einzelnen Gehirnregionen in der Abhängigkeit vom Alter in unterschiedlicher Dichte exprimiert (Akazawa et al., 1994; Monyer et al., 1994), was zu unterschiedlichen pharmakologischen, biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften führt (Lynch et Guttman, 2001). So ist beispielsweise das feinregulierte Expressionsmuster der NR2-Untereinheit während der Ontogenese kritisch für die Hirnreifung beziehungsweise Synapsenbildung, -aufrechterhaltung und –stabilisierung (Monyer et al., 1994). Auch im noch nicht ausgereiften Nagetierhirn finden sich mehr NMDARs als im adulten Gehirn, ein Umstand, der mit der Notwendigkeit der erfahrungsabhängigen Modifikation von neuronalen Schaltkreisen bei juvenilen Tieren erklärt wird. Bei adulten Tieren spiegelt die hirnregionale NMDAR-Untereinheiten-Diversität die Einbindung der NMDARs bei unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Funktionszusammenhängen, wie synaptische Plastizität, Gedächtnis, Emotionen, Hyperaktivität oder Drogenabhängigkeit wieder.

Der NMDAR ist wie der AMPAR im gesamten Gehirn zu finden, vor allem aber im Telenzephalon. So findet man die NR1- und NR2A-Rezeptoruntereinheit ubiquitär im ZNS. Die höchste Dichte besteht dabei im HIPP (Palmer, 2001), während man die NR2B-Untereinheit vor allem im Cortex, dem HIPP, aber auch in den Basalganglien findet (Stark et al., 2000; Tsai et al., 2002). Im Cerebellum findet man NR2C als dominierende NR2-

Untereinheit (Akazawa et al., 1994; Monyer et al., 1994), wohingegen NR2D die seltenste Untereinheit im adulten ZNS darstellt und hauptsächlich im Hirnstamm zu finden ist.

Die Zahl der NMDARs ist im jugendlichen Rattenhirn größer als bei der adulten Ratte, bei der dann vermehrt Kainat-Rezeptoren zu finden sind. Dabei ist die Expression der verschiedenen NMDAR-Untereinheiten für jede Entwicklungsstufe in jeder Gehirnregion der Ratte verschieden. So kommen die Untereinheiten NR2C und NR2D im Cortex und HIPP nur in der ganz frühen embryonalen Entwicklung vor, erst kurz vor der Geburt beginnt die Expression der NR2A und NR2B-Untereinheiten (Monyer et al., 1994; Perez-Velazquez et Zhang, 1994). Der Peak in der Expression des Gens, welches NR1 kodiert, liegt am zehnten postnatalen Tag und im frühen Erwachsenenalter der Ratte (Pujic et al., 1993).

Darüber hinaus gibt es intrazelluläre Unterschiede bezüglich der synaptischen Lokalisation. Die NR2A-Rezeptoruntereinheit findet man hauptsächlich an distalen apikalen Dendriten, während die NR2B-Untereinheit eher an basalen Dendriten in der Synapse von Pyramidzellen des Cornu Ammonis 3 (CA3) des HIPP lokalisiert ist (Ito et al., 1997).

### 1.1.3.3. Das glutamaterge System

Die Synapsen des ZNS sind zu 40 Prozent glutamaterg, in der Großhirnrinde sogar zu 90 Prozent, was die Bedeutung der Aminosäure L-Glutamat als wichtigstem exzitatorischen Neurotransmitter des ZNS, hier vor allem im Cortex und HIPP, verdeutlicht. Glutamaterge Synapsen spielen eine entscheidende Rolle bei den meisten Aspekten physiologischer Hirnfunktionen, vor allem auch bei der Kognition, dem Gedächtnis und Lernen, aber auch während der ZNS-Entwicklung bei der Synapseninduktion, Zellmigration und -differenzierung (Collingridge et Lester, 1989; Headley et Grillner, 1990; Danbolt, 2001). Das Glutamat liegt vorwiegend intrazellulär, dabei ist die Glutamatkonzentration besonders hoch in den präsynaptischen glutamatergen Terminalen mit bis zu 100mM in den synaptischen Vesikeln (Cousin et Robinson, 1999), wohingegen die extrazelluläre Konzentration im synaptischen Spalt mit 1µM sehr gering ist, sie kann kurzfristig bei synaptischer Freisetzung auf 3mM ansteigen (Almers et Tse, 1990).

Glutamaterge Projektionen findet man häufig in primär afferenten Neuronen, wie beispielsweise als Projektionsbahn vom gesamten Cortex zum Corpus striatum, dem Eingangskern der Basalganglien, aber auch als glutamaterge Projektionsbahnen vom

Thalamus zum Cortex. Sie greifen somit über die cortico-basalgangliäre-thalamocorticale Schleife modulierend in die Motorik ein, besitzen allerdings auch afferente Projektionsbahnen zum limbischen System mit glutamatergen Projektionen vom Cortex zum HIPP, zudem besitzen sie auch intrahippocampale Verbindungen (Smith et al., 1998).

Studien belegen, dass ein ausgeglichenes glutamaterges System von elementarer Bedeutung ist, wobei der aktivierte NMDAR das Überleben der Neuronen während der Entwicklung zu sichern scheint; ein Mangel führt zur Apoptose der Neuronen in diesem Bereich. So führt beispielsweise ein Mangel an Glutamat oder NMDA in Granulazellkulturen zur Apoptose, was für eine Hemmung neuronaler Apoptoseneigung durch NMDAR-Aktivierung spricht. Eine Überstimulation von Glutamatrezeptoren führt hingegen zur exzitatorischen Neuronendegeneration (Yan et al., 1994). Es ist bekannt, dass „NR1-Knockout-Mäuse“ nicht überlebensfähig sind. Dabei sind die einzelnen Hirnregionen in den einzelnen Abschnitten der Gehirnentwicklung unterschiedlich sensibel für apoptotische Neuronendegeneration durch fehlende NMDARs.

## 1.2 DAS DOPAMINERGE SYSTEM

### 1.2.1 Dopamin

Dihydroxyphenylethylamin (Dopamin) ist ein biogenes Amin aus der Gruppe der Katecholamine und ein wichtiger Neurotransmitter des ZNS.

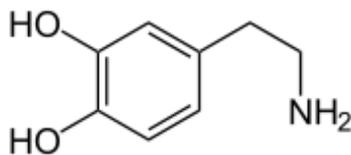


Abb.15 Strukturformel des Dopamins.

Das cerebrale dopaminerge System ist an vielen physiologischen Prozessen, wie Motorik, Emotionen, Wahrnehmung und neuroendokrine Sekretion, aber auch an pathologischen Prozessen, wie Morbus Parkinson, Schizophrenie und ADHD beteiligt (Missale et al., 1998; Jaber et al., 1996).

Drogenmissbrauch führt nach neusten Untersuchungen zu Veränderungen im dopaminergen System (Joyce et Millan, 2005), dabei scheint es einen wichtigen Zusammenhang hinsichtlich belohnender und verstärkender Effekte bei Suchterkrankungen zu geben.

In der Peripherie ist es unter anderem an der Modulation kardiovaskulärer Funktionen und der Nierenfunktion beteiligt (Missale et al, 1998).

### 1.2.2 Synthese, Metabolismus, Inaktivierung

Die Biosynthese des Dopamins (Abb.16 und Abb.17) erfolgt im Cytoplasma katecholaminerger Neuronen aus der aromatischen Aminosäure L-Tyrosin (Vallone et al., 2000), welches in der Leber aus der Aminosäure L-Phenylalanin gebildet und über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn aufgenommen wird. Dabei entsteht zunächst Thyrosinhydroxylase-vermittelt das intermediäre L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA). Die Thyrosinhydroxylase wird dabei durch Dopamin im Sinne einer negativen Rückkopplung gehemmt. Daran schließt sich die Dopadecarboxylase-vermittelte Umwandlung zu Dopamin an, welches über vesikuläre Monoamintransporter (VMAT) in die Vesikel transportiert wird, in denen es dann gespeichert wird.

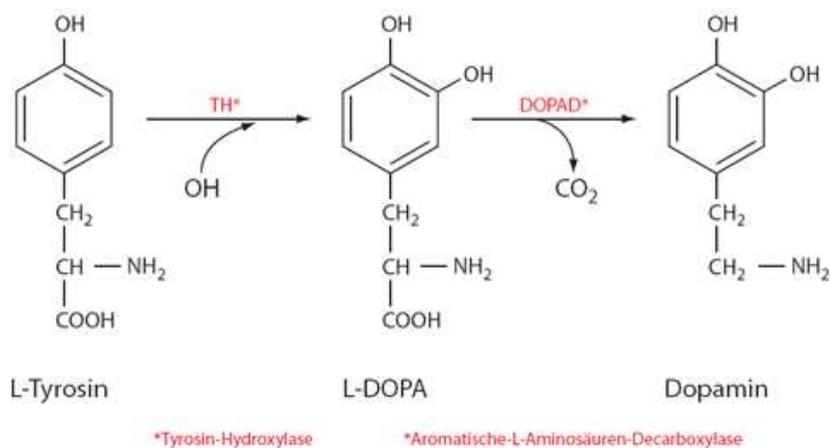


Abb.16 Biosynthese des Dopamins aus der Aminosäure L-Tyrosin.

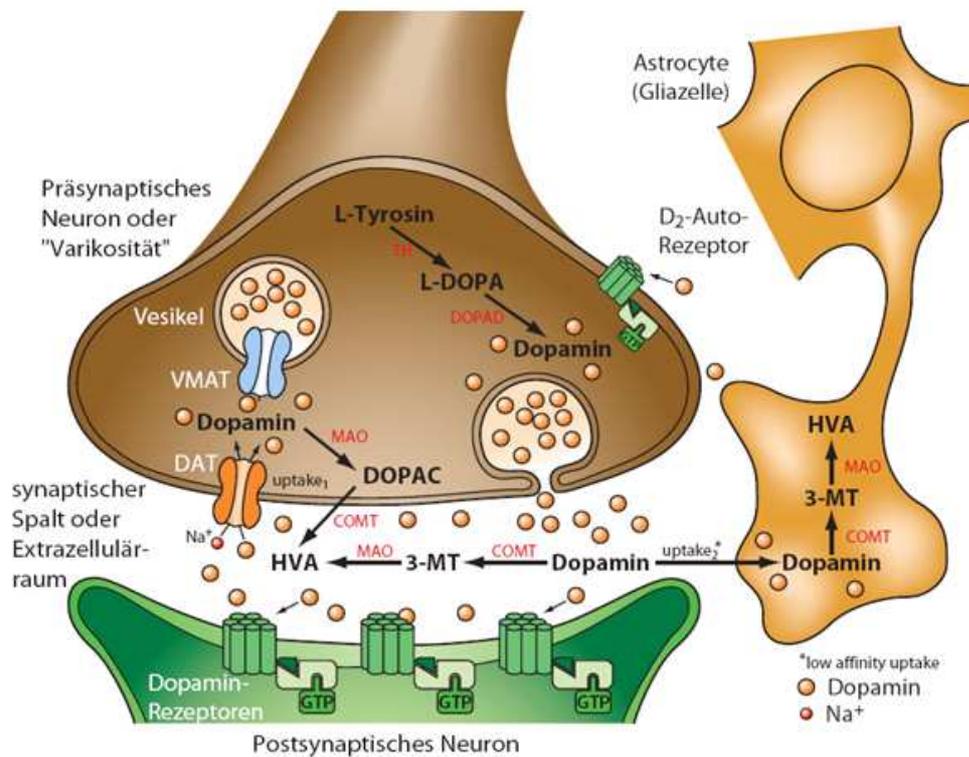


Abb.17 Metabolismus des Dopamins. Die Beschreibung der verschiedenen Stoffwechselwege des Dopamins sind dem Text zu entnehmen.

Die Speicherung erfolgt in bisher drei identifizierten Kompartimenten (Abb.18), welche miteinander kommunizieren (Kristensen et al., 1994), dabei werden ungefähr 76 Prozent des Dopamins im cytoplasmatischen Kompartiment, wo auch Synthese und Katabolisierung ablaufen, gespeichert. Über den Dopamintransporter (DAT) steht es mit dem Extrazellulärraum in Verbindung. Ein zweites Kompartiment bildet der so genannte vesikuläre Kurzspeicher, welcher über filamentöse Strukturen mit der präsynaptischen Membran verbunden ist. Dopamin wird auch hier über einen VMAT in die Vesikel transportiert und mittels Exocytose, abhängig von der intrazellulären Kalziumionenkonzentration, in den synaptischen Spalt freigesetzt. Des Weiteren gibt es noch den vesikulären Langzeitspeicher, welcher eine Art Reservoir für den vesikulären Kurzzeitspeicher und das vesikuläre Kompartiment darstellt (Justice et al., 1988).

In noradrenergen und adrenergen Neuronen schließen sich noch eine Hydroxylierung und eine Methylierung an, wodurch die anderen Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin aus Dopamin metabolisiert werden.

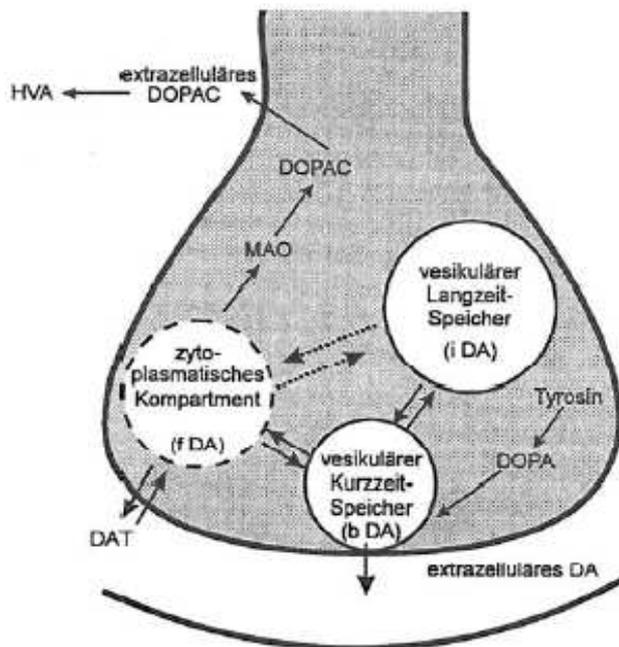


Abb.18 Schematische Darstellung des Dopaminpools. Dopamin wird im Wesentlichen in den drei dargestellten Kompartimenten vesikulär gespeichert.

Die Ausschüttung des Dopamins in den synaptischen Spalt erfolgt kalziumabhängig entweder über Exocytose oder über den DAT (Abb.17). Bei der Exocytose werden mittels eines Aktionspotentials spannungsabhängige Kalziumkanäle geöffnet, was wiederum über Phosphorylierungsprozesse zu einer Mobilisierung der dopaminhaltigen Vesikel in Richtung der präsynaptischen Membran führt. Die Vesikelmembran fusioniert mit der Neuronenmembran, und Dopamin tritt in den synaptischen Spalt aus, auch Kalium kann diese Kaskade in Gang setzen. Die Freisetzung über den DAT, welche mit Amphetaminen ausgelöst wird, zeigt, dass Dopamin auch in Abwesenheit eines Aktionspotentials freigesetzt werden kann, was für eine NMDAR-vermittelte Umkehr der eigentlichen DAT-Funktion spricht (Iravani et Kruk, 1996). Eine Besonderheit der Dopaminausschüttung findet sich in der Substantia nigra pars compacta (SNc) und in der Area tegmentalis ventralis (VTA), da hier das Dopamin nicht nur aus den Axonen der Terminalgebiete, sondern auch aus Dendriten und Soma (Bjorklund et al., 1975) freigesetzt wird.

Die Inaktivierung des synaptisch freigesetzten Dopamins ist für die zeitliche Limitierung der Signaltransduktion des Neurotransmitters unerlässlich. Sie kann einerseits durch den Rücktransport von Dopamin über einen präsynaptisch gelegen DAT zurück in das Neuron erfolgen (Abb.17), was für die räumliche und zeitliche Termination des Dopaminsignals den

mit Abstand wichtigsten Mechanismus darstellt. Dort wird es entweder mittels VMTA wieder in die Speichervesikel aufgenommen oder enzymatisch abgebaut. Dabei erfolgt der Katabolismus mittels Enzymen im Cytoplasma oder nach der Aufnahme in dopaminergen Neuronen und Gliazellen in erster Linie durch zwei Enzyme (Abb.19), die mitochondrialmembrangelegene Monoaminoxidase A und B (MAO-A; MAO-B) und die cytoplasmatische Catechol-O-Methyltransferase (COMT). Durch MAO wird Dopamin entweder zu Dihydroxyphenylessigsäure (DOPAC), einem der beiden Hauptabbauprodukte, oxidiert, es kann allerdings dann COMT-vermittelt weiter zu Homovanillinsäure (HVA) methyliert werden, welches das andere Hauptabbauprodukt darstellt. Dopamin kann aber auch extraneural COMT-vermittelt zu 3-Methoxytyramin(3-MT) umgebaut werden, welches ein guter Indikator für den Katabolismus von synaptischem Dopamin ist. Allerdings spielen diese Mechanismen nur eine untergeordnete Rolle, das Fehlen von DAT kann, laut einer Studie mit Knockout-Mäusen (Jones et al., 1998a et 1998b), durch andere Inaktivierungsmechanismen nicht kompensiert werden.

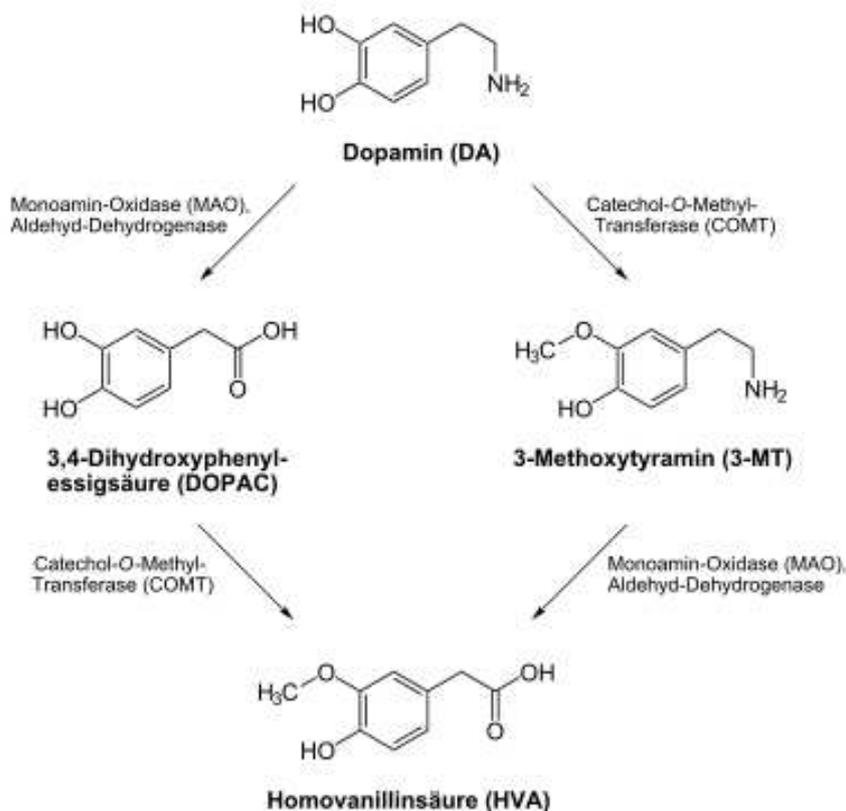


Abb.19 Der Dopaminkatabolismus erfolgt hauptsächlich über die beiden dargestellten Stoffwechselwege.

### 1.2.3 Rezeptoren

Man unterscheidet insgesamt fünf verschiedene Dopaminrezeptoren D1-D5, die auf Grund unterschiedlicher intrazellulärer Signalwege und Wirkungen in zwei Gruppen von Dopaminrezeptoren (Abb.20), die D1-ähnlichen und die D2-ähnlichen Rezeptoren, eingeteilt werden. Beide Gruppen stellen integrale Membranproteine dar, ihre intrazelluläre Signaltransduktion ist wie bei den mGluRs an G-Proteine gekoppelt.

Die D1-ähnlichen Dopaminrezeptoren, zu denen der D1- und D5-Rezeptor gehört, wirken durch die Aktivierung der Adenylatcyklase exzitatorisch, die postsynaptische Zelle wird depolarisiert. D2-, D3- und D4- Rezeptoren gehören hingegen zu der Gruppe der D2-ähnlichen Rezeptoren und hemmen die Adenylatcyklase, wodurch sie inhibitorisch wirken; es kommt zur postsynaptischen Hyperpolarisation (Kebabian et Calne, 1979).

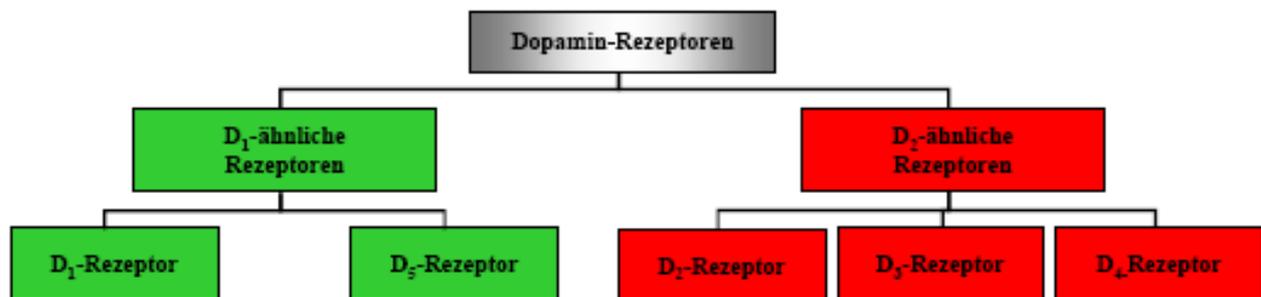


Abb.20 Klassifizierung der verschiedenen Dopamin-Rezeptoren.

Dopaminrezeptoren finden sich nicht nur postsynaptisch, sondern auch als präsynaptische Autorezeptoren, sie führen mittels verminderter Dopaminsynthese und -freisetzung zu einer Senkung der Feuerungsrate der Neuronen.

Alle Dopaminrezeptoren besitzen einen extrazellulären N-Terminus, sieben transmembranäre Domänen (Abb.21: TM1-TM7), mit drei extrazellulären und drei intrazellulären Schleifen, sowie einen intrazellulären C-Terminus. Das G-Protein steht in Wechselwirkung mit der dritten intrazellulären Schleife des Dopaminrezeptors (Vallone et al., 2000). Die Dopaminbindung an einem Rezeptor erfolgt innerhalb der hydrophoben transmembranären Domäne, wobei bestimmte Reste innerhalb des Rezeptors eine Art Bindungstasche bilden. So bindet ein Aspartat-Rest der TM3 die kationische Aminogruppen des Dopamins, Serin-Reste der TM5 binden die Hydroxy-Gruppen, und ein Phenylalanin-Rest der TM6 interagiert

mit den aromatischen Bestandteilen. Auch andere agonistische und antagonistische Moleküle binden in dieser „Rezeptorspalte“, die sich in die transmembranären Domänen erstreckt, wobei die Bindung wahrscheinlich durch andere Proteinstrukturen vermittelt wird (Shi et al., 2001; Kalani et al., 2004). Allgemein kann man sagen, dass für die Bindung und Aktivierung eines Dopaminrezeptors eine basische Aminogruppe, ein aromatischer Ring und eine zur Wasserstoffbrückenbildung befähigte Gruppe nötig ist (Claudi et al., 2000).

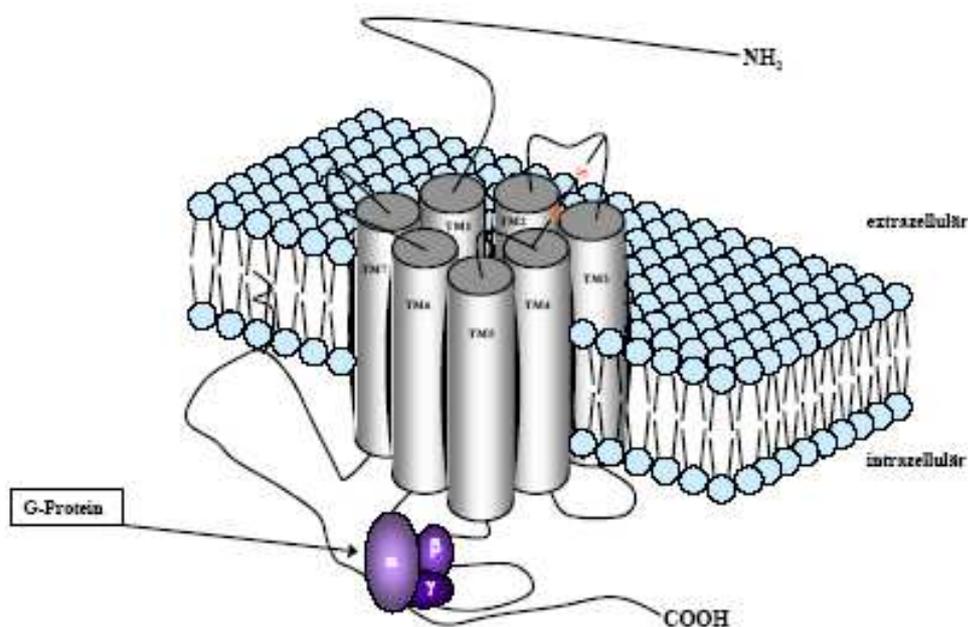


Abb.21 Die Struktur des Dopaminrezeptors.

Strukturelle Unterschiede zwischen den D1- und D2-ähnlichen Rezeptoren bestehen in einem kürzeren C-Terminus und einer längeren intrazellulären Schleife der D2-ähnliche Rezeptoren (Missale et al., 1998). Der D2-Rezeptor wird nochmals in zwei Isoformen, den D2-short- und den D2-long-Rezeptor unterteilt, wobei letzterer die dominierende Isoform darstellt (Vallone et al., 2000). Sie besitzen allerdings keine Unterschiede in der Pharmakologie (Mills, 1992).

Wie oben bereits erwähnt, führt die Stimulation der Dopaminrezeptoren zu verschiedenen, G-Protein vermittelten Antworten (Vallone et al, 2000). Die Wirkung exzitatorischen D1-ähnlichen Rezeptoren ist an so genannte stimulierende G-Protein (GS) gekoppelt, welche die membranständige Adenylatcyklase (AC) aktiviert (Abb.22), wobei ein Second-

Messenger, das cyclische Adenosinmonophosphat (cAMP), gebildet wird, welcher wiederum die Proteinkinase A (PKA) aktiviert, und letztendlich zur Phosphorylierung verschiedener Funktionsproteine, wie beispielsweise Ionenkanäle, führt. Zudem bewirken D1-ähnliche Rezeptoren auch die Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern, wobei die membranständige Phospholipase C (PLC) aktiviert wird, welche die Produktion des kalziumfreisetzenden Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) anregt. Im Gegensatz dazu sind D2-ähnliche Rezeptoren an inhibitorische- oder so genannte G<sub>0</sub>-Proteine gekoppelt. Dadurch wird einerseits die AC und somit die Phosphorylierung von Funktionsproteinen gehemmt, andererseits aktivieren sie selbst oder über weitere G-Proteine Ionenkanäle, was zu einer Hyperpolarisation führt. An der präsynaptischen Membranen inhibieren sie als so genannte Autorezeptoren die Dopaminfreisetzung, was als negative Rückkopplung bezeichnet wird.

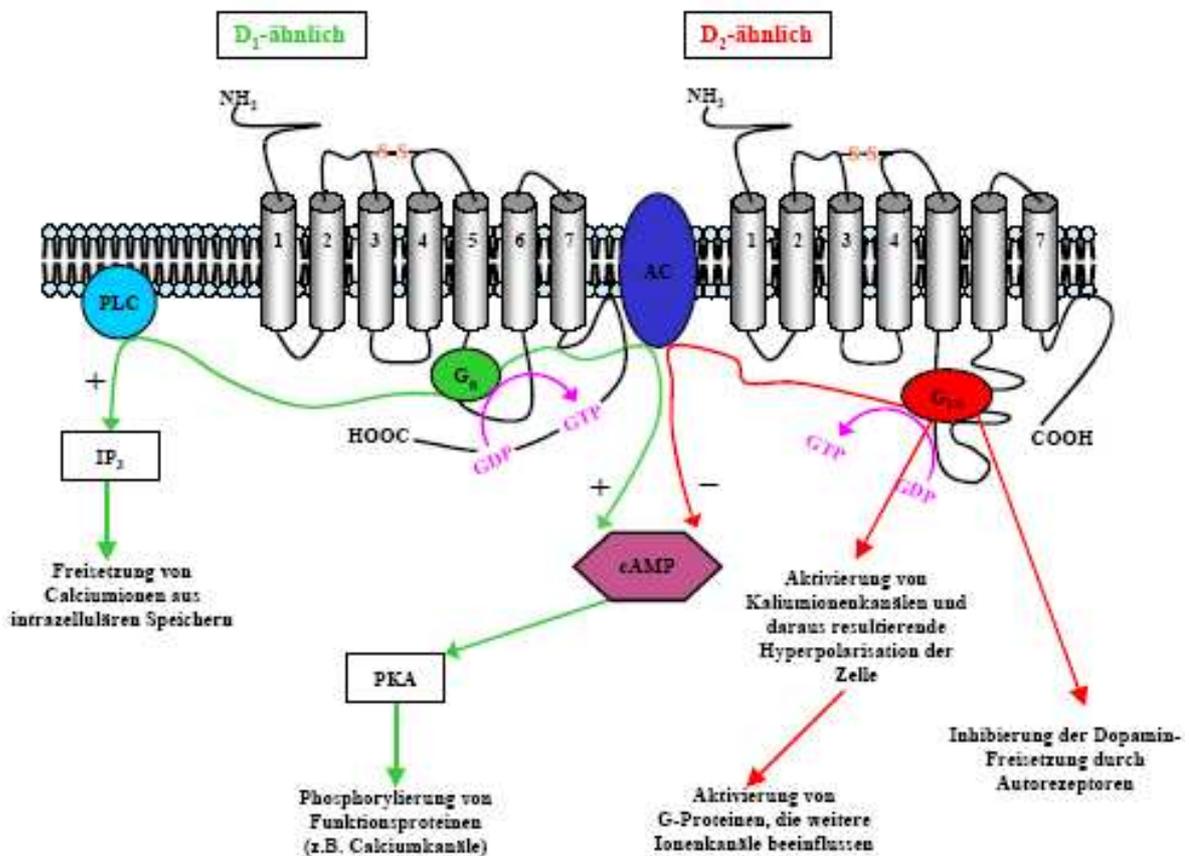


Abb.22 Die Signaltransduktion der D1- und D2-ähnlichen-Rezeptoren. Während D1-ähnliche Rezeptoren über ihre Signalkaskade zur Erregung des Neurons führen, kommt es bei D2 ähnlichen Rezeptoren hingegen zu einer Inhibition des Neurons.

#### 1.2.4. Dopamintransporter (DAT)

Der DAT ist auf dem Perikaryon, den Axonen und Dendriten dopaminerger Neuronen lokalisiert (Ciliax et al., 1995), und da er ausschließlich auf diesen Neuronen vorkommt, stellt er einen hochsensiblen Marker für dieses System dar (Freed et al., 1995).

Der in der präsynaptischen Membran lokalisierte Dopamintransporter (DAT) ist der wichtigste Mechanismus zur Inaktivierung des synaptisch wirksamen Dopamins. Dabei wird der Transportmechanismus energieabhängig aktiviert, das Transportprotein verändert seine Konformation, wodurch Dopamin wieder aus dem synaptischen Spalt in den cytosolischen Speicherpool zurücktransportiert wird. Die Energie für diesen Transportmechanismus wird durch die Natrium-Kalium-Pumpe, welche einen Natriumionengradienten bedingt, bereitgestellt. Vermutlich muss ein Natrium- und ein Chloridion an der Außenseite des Dopamintransporters binden, damit ein Dopaminmolekül durch den Kanal treten kann, wobei die Ionen mit ins Cytoplasma transportiert werden (Hurd et Ungerstedt, 1989).

Das mittels eines einzelnen Aktionspotentials freigesetzte Dopamin (<5 Hz) wird hauptsächlich über den DAT aus dem synaptischen Spalt eliminiert, wodurch die dopaminerge Feuerungsrate reguliert wird (Grace et Bunney, 1984a et 1984b). Ohne DAT käme es, wie bei der hohen Aktionspotentialfrequenz (> 15Hz) mit seriell freigesetztem Dopamin, zu einer Akkumulation des synaptischen Dopamins (Chergui et al., 1994), was eine konstante Feuerungsrate des Dopamins mit Aktivierung von präsynaptischen D2-Autorezeptoren und postsynaptischen D1-Rezeptoren führt (Chergui et al, 1996), die singuläre Feuerungsrate wäre nicht mehr durch Steigerung der seriellen Feuerungsrate modulierbar (oit-Marand et al., 2000). So zeigen Knockout Mäuse mit fehlendem DAT Hyperaktivität und Beeinträchtigung im räumlichen Lernen (Gainetdinov et al., 1999), was vermutlich dadurch bedingt ist, dass die neuronale Feuerungsrate nicht in phasische Veränderungen der synaptischen Dopaminkonzentration übersetzt werden kann (oit-Marand et al., 2000).

Daneben ist der DAT essentiell für die Auffüllung der intraneuronalen Dopaminvesikel (Gainetdinov et al., 1998), wobei anhand einer DAT-Knockout-Mäusestudie belegt werden konnte, dass bei diesen Tieren die Dopaminfreisetzung durch eine höhere Dopaminsynthese kompensiert wird (Jones et al., 1998; oit-Marand et al., 2000).

Für die postsynaptische D1-Rezeptor-Aktivierung ist eine genügend hohe Dopaminkonzentration nötig, ist sie zu niedrig, stimuliert der DAT in mesenzephalen dopaminerger Neuronen einen Anionenstrom, der zu einer exzitatorischen Reaktion führt (Ingram et al.,

2002). Bei höheren synaptischen Dopaminkonzentrationen wird dieser Effekt durch präsynaptische D2-Rezeptoren gehemmt.

Neuste Studien lassen vermuten, dass der DAT über die Umkehr der Transportrichtung die Dopaminkonzentration zu beeinflussen vermag (Falkenburger et al., 2001), dabei wird Dopamin kalziumunabhängig durch den DAT freigesetzt. Dies soll dann der Fall sein, wenn Dendriten über die für den DAT erforderliche Änderung des Membranpotentials hinaus depolarisiert werden.

### 1.2.5. Lokalisation des dopaminergen Systems im ZNS

Dopaminerge Neuronen sind im Gehirn im Mesencephalon, im Diencephalon, im Bulbus olfactorius und in der Retina zu finden. Das Besondere des dopaminergen Systems ist seine spezifische und eng abgegrenzte Innervation einzelner Hirngebiete. Circa 75 Prozent der dopaminergen Neuronen sind im ventralen Mesencephalon, mit der höchsten Dichte in nigrostriatalen Projektionsbahnen, gefolgt vom mesolimbischen System mit einer mittleren Dichte und der geringsten mesokortikalen dopaminergen Neuronendichte zu finden (Lowenstein et al., 1990a et 1990b). Zusammenfassend sind die Zellkörper der dopaminergen Neuronen des Gehirns also hauptsächlich in der Substantia nigra pars compacta (SNc) und im ventralen tegmentalen Areal (VTA) zu finden. Dabei besitzt die Maus ca. 20 bis 30 Tausend mesencephale, dopaminerge Neuronen, der Mensch sogar bis zu 600 Tausend (Bjorklund und Dunnett, 2007a et 2007b).

Da dopaminerge Neuronen verschiedener Ursprungsgebiete in gleiche Terminationsgebiete und umgekehrt projizieren, ist in der Literatur die Aufteilung und Benennung der dopaminergen Faserzüge sehr uneinheitlich. Beispielsweise werden anhand der Gehirnregionen vier neuronale dopaminerge Systeme unterschieden, das mesotelencephale, das diencephale, das periglomeruläre und das retinale System, wobei die beiden erstgenannten in weitere wesentliche Untersysteme gegliedert werden. Dabei handelt es sich im Mesencephalon um die drei axonalen dopaminergen Verarbeitungspfade (Abb.23), das nigrostriatale- (oder auch mesostriatale-), das mesolimbische- (oder auch Belohnungs-) und das mesocorticale-System. Die dargestellte tuberoinfundibuläre-Projektionsbahn gehört zu dem System des Diencephalon, welches die hypophysäre Prolaktinfreisetzung regelt. Des Weiteren gehören das diencephalospinale, das periventriculäre und das incerto-hypothalamische System zu den diencephalen, dopaminergen Projektionsbahnen. Das mesolim-

bische und mesocorticale System werden auf Grund ihres gemeinsamen Ursprungs in der VTA auch zum mesolimbocorticalen-System zusammengefasst. Sie alle entspringen dem Mesencephalon und dem Hypothalamus (Jones et Pilowsky, 2002).

Da circa 75 Prozent der dopaminergen Neuronen im Mesencephalon lokalisiert sind, beschränkt sich die weitere Beschreibung der dopaminergen Neuronenverteilung auf den mesozephalen Bereich. Entsprechend der oben aufgeführten Unterteilung werden drei aufsteigende dopaminerge Systeme unterschieden.

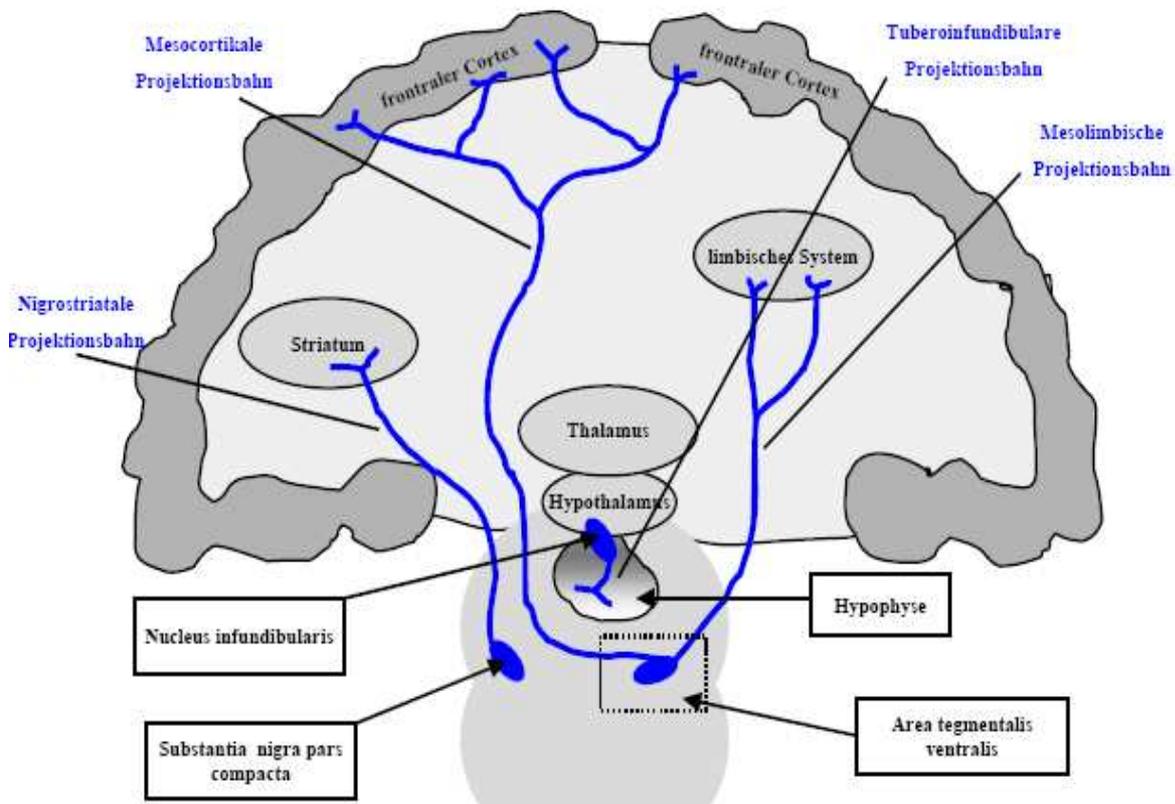


Abb.23 Die dopaminergen Verarbeitungspfade im ZNS.

Das nigrostriatale-System innerviert, wie der Name schon sagt, ausgehend von der Substantia nigra pars compacta (SNc) das Neostriatum, bestehend aus Putamen und Nucleus caudatus. Es spielt eine wichtige Rolle bei Regulation der Motorik, in dem es die Bewegungsinitiation und -koordinierung, aber auch den Muskeltonus beeinflusst (Zeiss, 2005). Als zweite dopaminerge Projektionsbahn zieht das mesocorticale-System von der VTA zu verschiedenen Regionen des präfrontalen Cortex (PFC), sie ist wahrscheinlich an

Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt. Auch das mesolimbische-System, welches emotionale und kognitive Funktionen beeinflusst, zieht von der Area tegmentalis ventralis hin zu den einzelnen Bereichen des limbischen Systems, wie Nucleus accumbens (NcA), Corpus amygdaloideum (Amyg) und dem HIPP. Eine andere Einteilung des mesencephalen, dopaminergen Systems, modifiziert nach Björklund und Lindvall, ist tabellarisch dargestellt (Tab.2), wobei die Unabhängigkeit des Ursprungsgebietes betont wird.

Tab.2 Einteilung des mesencephalen dopaminergen Systems nach Björklund et Lindvall.

	<b>MESOSTRIATALE-/ NIGROSTRIATALE- SYSTEM</b>	<b>MESOLIMBOKORTIKALE- SYSTEM (mesolimbische und mesokortikale)</b>
<b>Ursprungsgebiet</b>	v.a. SN (VTA, Area retrorubralis)	v.a. VTA (SN, Area retrorubralis)
<b>Terminalgebiet</b>	Dorsale Striatum: Ncl caudatoputamen, NcA, Tuberculum olfactorium; Globus pallidus, Nucleus subthalamicus)	Mesokortikal: PFC Mesolimbisch: limbische System (NcA, Amygdala, EHC, HIPP...)
<b>Funktion der Terminalregion</b>	Regulation der Motorik (Bewegungssteuerung)	Mesokortikal: Lern- und Gedächtnisprozessen, Mesolimbisch: emotionale und kognitive Funktionen

Wichtig zu erwähnen ist auch, dass die einzelnen Terminalgebiete unterschiedlich starke dopaminerge Afferenzen enthalten. Während das dorsale Striatum und der NcA mit 65-90 Prozent eine hohe dopaminerge, afferente Innervation erhalten, ist der PFC hauptsächlich GABAerg innerviert, dopaminerge Afferenzen machen nur circa 30-40 Prozent der mesencephalen Afferenzen aus (Fallon, 1981; Carr et Sesack, 2000).

Die einzelnen Rezeptortypen sind in verschiedenen Gehirnregionen lokalisiert und an unterschiedlichen physiologischen Prozessen beteiligt. Allgemein sind D1-ähnliche-Rezeptoren nur postsynaptisch lokalisiert, D2-ähnliche-Rezeptoren hingegen auch präsynaptisch (Jaber et al., 1996). Am häufigsten sind die D1-, dann die D2-, D3-, D5- und am seltensten die D4-Rezeptoren vertreten (Dearry et al., 1990). Die genaue Verteilung und Funktion ist der Übersicht halber in Tabelle 3 dargestellt.

Tab.3 Lokalisation und Funktion der verschiedenen Dopaminrezeptoren.

Subtypen		Lokalisation (zentral)	Funktion (zentral)	Lokalisation (peripher)	Funktion (peripher)
D <sub>1</sub> -ähnliche	D <sub>1</sub>	Striatum, Nucleus accumbens, limbisches System, Thalamus, Hypothalamus	Regulation von Motorik, Kognition, Motivation, Sekretion der Nebenschilddrüsen- hormone	Blutgefäße, Nebenniere, Niere	Vasodilatation, Stimulation von Adrenalin- Freisetzung, Erhöhung der Filtrationsrate, Renin-Freisetzung und Erniedrigung der Na <sup>+</sup> - Reabsorption
	D <sub>5</sub>	Hippocampus, Thalamus	Lernen, Gedächtnis (nicht gesichert)		
D <sub>2</sub> -ähnliche	D <sub>2</sub>	Striatum, Nucleus accumbens, Substantia nigra pars compacta, Area tegmentalis ventralis	Regulation von Motorik, Kognition, Motivation, neuronale Dopaminaktivität, Sekretion der Hypophysen- hormone	Blutgefäße, Nebenniere, Niere	Inhibierung von Noradrenalin- Freisetzung, Inhibierung der Aldosteron- Freisetzung
	D <sub>3</sub>	limbisches System, Striatum (gering)	Regulation emotionaler und kognitiver Funktionen		
	D <sub>4</sub>	Frontaler Cortex, Medulla oblongata, Amygdala, Hypothalamus, Mesencephalon	Emotionen, Kognition (nicht gesichert)		

### **1.3 INTERAKTIONEN ZWISCHEN DEM GLUTAMATERGEN- UND DEM DOPAMINERGEN SYSTEM**

Eine Vielzahl von Verhaltensweisen wird durch Interaktionen des dopaminergen und glutamatergen Systems reguliert (Carlsson et Carlsson, 1990; Carlsson et al., 1999), aber auch andere Transmitter beeinflussen die komplexen Kreisläufe der Informationsverarbeitung des Gehirns.

Die Mausmutanten zeigen eine induzierte Deletion der NR1-Untereinheit des NMDAR auf dopaminergen Neuronen, welche zu 75 Prozent im ventralen Mesencephalon in der VTA und SN liegen. Deswegen werden in dieser Arbeit nur dopaminerge Projektionsbahnen und die Bedeutung ihres glutamatergen Inputs auf die Dopaminfreisetzung dopaminergener Neuronen der VTA und SNc betrachtet. Zusätzlich zu den exzitatorischen Projektionsbahnen sind natürlich auch noch inhibitorische, beispielsweise GABAerge Projektionsbahnen, bei der Verschaltung mesencephaler Neuronen beteiligt. Dadurch wird die Komplexität dieser Kreisläufe noch erhöht.

Dopaminerge Neuronen des Mesencephalon sind mittels afferenten und efferenten Projektionsbahnen vielfältig in das komplexe Verschaltungsgeschehen neuronaler Hirnstrukturen integriert. Die Einwirkung der inhibitorischen und exzitatorischen Afferenzen auf die Dopaminfreisetzung sind in der VTA und in der SNc ganz unterschiedlich geprägt (Chen et Rice, 2002). Sie führen neben einer axonalen Dopaminausschüttung auch zu einer somatodendritischen Dopaminfreisetzung.

Das Ursprungsgebiet des mesolimbocorticalen, dopaminergen Systems, in welchem die Zellkörper der dopaminergen Neuronen lokalisiert sind, liegt zum größten Teil in der VTA. Ihr hauptsächlich afferenter Input ist mit über 70 Prozent exzitatorisch (Smith et al., 1996), wobei die exzitatorisch wirkenden glutamatergen Afferenzen hauptsächlich aus dem PFC und daneben auch aus dem Pedunculo-pontinen Nucleus (PPN) stammen. Als weitere wichtige afferente Projektionsbahnen sind die inhibitorischen Afferenzen zu nennen, die sich hauptsächlich als kollaterale GABAerge Projektionen in der VTA, daneben aber auch im NAc und im PPN finden lassen. Neben diesen beiden Hauptafferenzen bestehen auch noch noradrenerge Projektionsbahnen aus dem Locus coeruleus und serotonerge Projektionen aus dem dorsalen Raphe nukleus. Zusätzlich bestehen zwischen afferenten Projektionen und VTA-Subpopulationen Verschaltungen, die entweder zu negativen bzw. positiven Rückkopplungsschleifen oder auch zur Feedforward-Inhibition führen. Exzitatorische Afferenzen aus dem PFC aktivieren beispielsweise mesocorticale, dopaminerge und

mesoaccumbale, GABAerge Neuronen (Carr et Sesack, 2000). Exzitatorische Afferenzen des Nucleus laterodorsalis tegmentalis (LDT) innerviert selektiv dopaminerge Neuronen, die den NcA innervieren. Dagegen sind dessen inhibitorische Bahnen auf mesoaccumbale GABAerge Neuronen beschränkt. Es wird auch eine indirekte Aktivierung mesoaccumbaler dopaminergener Neuronen durch den PFC über eine Verschaltung mittels LDT vermutet (Fields et al., 2007). Die hauptsächlich exzitatorischen, afferenten Bahnen wirken auf zwei verschiedene Zelltypen in der VTA, die mit 55 Prozent überwiegenden dopaminergen und die GABAergen Neuronen (Johnson et al., 1992). Die GABAergen Neuronen wirken teilweise als Interneuronen über lokale Projektionen inhibitorisch auf die dopaminergen Neuronen der VTA. Der andere Teil der GABAergen Neuronen und die dopaminergen Neuronen der VTA ziehen mit ihren Afferenzen zu den Terminalgebieten PFC und limbischen Strukturen, wie dem NcA und der Amygdala (Steffensen et al., 1998; Margolis, 2006). Die dopaminergen Neuronen der VTA besitzen als iGluRs sowohl NMDAR als auch AMPAR, deren Aktivierung zu einer Zelldepolarisation mit langsamen und schnellen exzitatorischen postsynaptischen Membranpotentialen führt. Daraus resultiert eine erhöhte Feuerrate bzw. burst firing. Zudem besitzen die dopaminergen Neuronen auch die beiden GABAergen Rezeptoren A und B, welche bei Aktivierung die Zellmembran hyperpolarisieren und somit ein inhibitorisches, postsynaptisches Membranpotential (IPSP) nach sich ziehen. Dies geht mit einer verminderten Feuerrate einher (Chen et Rice, 2002). Ihre dopaminergen, afferenten Terminalgebiete liegen vorwiegend im PFC und dem limbischen System, wie dem NcA, dem ventralen Striatum und der Amygdala. Neben der klassischen afferenten Dopaminfreisetzung besteht, wie oben bereits erwähnt, auch eine somatodendritische Dopaminfreisetzung. Diese führt zum einen, über D2-Autorezeptoren mittels einer Hyperpolarisation, zu einer verminderten somatodendritischen und axoterminalen Dopaminfreisetzung, zum anderen beeinflusst die somatodendritische Dopaminfreisetzung mittels D1-Rezeptoren das Belohnungsverhalten.

Das andere Ursprungsgebiet dopaminergener Neuronen stellt die SNc vor allem in Form des nigrostriatalen Systems dar. In der SNc überwiegen mit 90 Prozent die dopaminergen Neuronen als vorherrschender Zelltyp. Ihr vorwiegender afferenter Input ist mit circa 70 prozentigen GABAergen Projektionsbahnen inhibitorisch. Diese Afferenzen stammen vorwiegend aus dem Striatum und zusätzlich auch aus dem Globus pallidus, kollateralen Projektionen aus der Substantia nigra pars reticularis (SNr) und dem Nucleus pedunculopontine. GABAerge A- und B-Rezeptoren bewirken mittels einer Hyperpolarisation inhibitorische postsynaptische Membranpotentiale (IPSP). Daneben wirken allerdings nur im geringen Maße exzitatorische Afferenzen vorwiegend aus dem Nucleus subthalamicus und

dem Cortex, daneben auch aus dem Nucleus pedunculopontine auf die Neuronen der SNc ein. Diese werden über schnelle AMPARs und langsame NMDARs vermittelt (Hausser et Yung, 1994), was fast gleichzeitig ein EPSP und IPSP zur Folge hat. Auch hier wirkt das somatodentrisch freigesetzte Dopamin über D2-Autorezeptoren reduzierend auf die somatodentritische, dopaminerge Feuerrate der SNc und der axoterminalen, dopaminergen Neuronen des dorsalen Striatums. Des Weiteren aktiviert das somatodentritisch freigesetzte Dopamin D1 Rezeptoren nicht-dopaminerge Zellen der SNr und beeinflusst so die Motorik (Chen et Rice, 2002). Leider ist bisher nichts über eine glutamaterge Koaktivierung nicht-dopaminergener Neuronen bekannt, doch deuten verschiedene Versuchsergebnisse auf eventuelle glutamataktivierte inhibitorische Transmitter zusätzlich zu den GABAergen hin, wie Adenosin, Taurin, Glycin oder Dynorphin. Ihr Terminalgebiet stellt der Caudatus putamen des dorsalen Striatum dar.

Wichtig zu erwähnen ist auch, dass die einzelnen Terminalgebiete unterschiedlich starke dopaminerge Afferenzen enthalten. Während das dorsale Striatum und der NcA mit 65-90 Prozent eine hohe dopaminerge, afferente Innervation erhalten, ist der PFC hauptsächlich GABAerg innerviert. Dopaminerge Afferenzen machen nur circa 30-40 Prozent der mesencephalen Afferenzen aus (Fallon, 1981; Carr et Sesack, 2000).

## **1.4 SÄUGETIERMODELLE ZUR IN VIVO CHARAKTERISIERUNG VON NMDA-REZEPTOREN**

### **1.4.1 Die Maus als Modellorganismus**

Die Maus spielt als Modellorganismus aus mehreren Gründen eine zentrale Rolle, da sie beispielsweise neben dem Menschen das genetisch am besten charakterisierte Säugetier darstellt (Beck et al., 2000). Im Mai 2002 wurde die abgeschlossene Sequenzierung des Genoms des weit verbreiteten Mausstammes „C57BL/6J“ zusammenfassend publiziert (Waterston et al., 2002). Dabei kommt die Maus mit geschätzten 30 Tausend Genen auf eine ähnliche Zahl an Erbinformation wie der Mensch, allerdings ist das Genom mit 2,5 Milliarden Basenpaaren etwas kleiner. 99 Prozent der DNA-Abschnitte haben ein entsprechendes Pendant im menschlichen Erbgut, und 96 Prozent liegen sogar in ähnlicher Nachbarschaft. Zudem ähnelt die Maus auch in ihrer Entwicklung und dem Stoffwechsel sehr dem Menschen. Ein weiterer Vorteil liegt in ihrer raschen Generationsfolge und ihrer einfachen Haltung, wodurch sie ein ideales Modell zur Erforschung physiologischer Vorgänge und

Krankheiten darstellt. Zudem haben Fortschritte in der Molekularbiologie und der experimentellen Embryologie das Spektrum der Manipulationen des Mausgenoms enorm erweitert. In den letzten Jahren wurden gerade im Bereich der Neurobiologie etliche neue Mausmutanten etabliert (Nagy et Mar, 2001).

### 1.4.2 Die Möglichkeiten der genetische Manipulation des Mausmodells

Um die Genfunktion „in vivo“ zu untersuchen sind mehrere Verfahren entwickelt worden. Der Ausdruck „transgen“ bezeichnet dabei allgemein Organismen, die eine „in vitro“ zusammengefügte DNA-Sequenz stabil in ihr Genom integriert haben. Ein Verfahren zur Untersuchung der Genfunktion ist die Erzeugung so genannter „transgener Tiere“. Dies geschieht durch ungerichtete Integration von Transgener-DNA (Desoxyribonucleinsäure), beispielsweise in Form von Pronukleusinjektion (Abb.24) (Gordon et al., 1980; Palmiter et al., 1982) oder durch Transfektion von rekombinierten Retroviren in frühen Embryonen. Nachteil dieser Methode ist, dass einerseits nur DNA-Sequenzen zum Genom hinzugefügt werden können und zudem auch nur ein gewisser Anteil der Nachkommen das gewünschte Transgen trägt. Eine gewebes- beziehungsweise zellspezifische Genveränderung ist mit dieser Methode nicht möglich, entweder erzeugt man durch Einbringen der Transgene in die Stammzellen der Keimbahn einen vollständigen transgenen Organismus oder eine Chimäre bei der Integration in somatische Zellen.

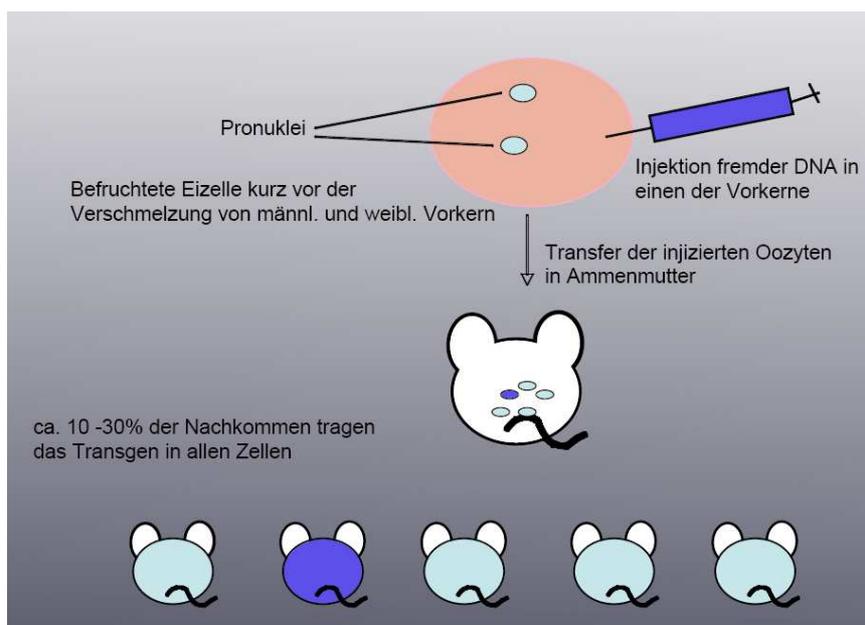


Abb.24 Generierung von transgenen Mäusen.

Eine weitere Möglichkeit, um die Funktion von Genen „in vivo“ zu erforschen, ist die „Knockout-Maus“ („Loss-of-function“ Veränderung), bei der es mittels homologer Rekombination zu einer gerichteten Entfernung eines ganz bestimmten Gens in embryonalen Stammzellen kommt. Das Gen wird also mittels homologer Rekombination gezielt so verändert, dass das durch das Gen kodierte Protein nicht mehr exprimiert werden kann. Eine „NR1-Knockout“ Maus beispielsweise ist also nicht mehr in der Lage, eine funktionstüchtige NR1-Untereinheit (NR1+) des NMDARs zu bilden, der NMDAR ist wirkungslos (NR1-).

In „vitro“ vermehrten embryonalen Stammzellen wird beispielsweise mittels Mikroinjektion ein so genannter Inaktivierungsvektor übertragen. Dieser besteht aus dem zu inaktivierenden Gen, welches eine Mutation im Exon trägt (NR1-) und dadurch entweder inaktiv vorliegt oder nicht mehr transkribiert werden kann, und aus benachbarten Genabschnitten (Abb.25). Um zu sehen, welche Zellen die Mutation in ihr Genom integriert haben, fügt man hinter dem mutierten Gen noch einen so genannten positiven Marker an, beispielsweise ein Neomycin-Resistenzgen (Abb.25 (b)). Gibt man später das Antibiotikum Neomycin in die Zellkultur, werden nur solche Zellen, die das Neomycin-Resistenzgen in ihre Zelle eingebaut und somit eine Neomycinresistenz erworben haben, überleben (positive Selektion). Um den Marker liegen zwei gleichgerichtete homologe LoxP-Sequenzen (ihre Funktion wird im Abschnitt: 1.4.3 Die Cre-Rekombinase zur induzierbaren, konditionalen Gendeletion, beschrieben), damit der Marker später wieder aus dem Genom eliminiert werden kann (Abb.25 (d): LxP). Die Bereiche direkt vor und hinter der veränderten Gensequenz bleiben unverändert, sie sorgen für die Hybridisierung mit dem Erbmateriale und somit für die Integration des veränderten Genabschnittes an der richtigen Stelle. Um dies zu überprüfen, wird beispielsweise bei generalisierten Knockouts zusätzlich der Marker Thymidinkinase des Herpes simplex Virus (HSVTK) in die veränderte Gensequenz integriert (Abb.25 (b)). Bei korrekter homologer Rekombination wird dieser nicht in das Erbgut integriert (Abb.25 (c)). Wird es allerdings an einer anderen Stelle in das Genom eingebaut, kommt es zur Integration des HSVTK. Durch Zugabe des Virostatikums Ganciclovir wird, falls das HSVTK in das Genom integriert wurde, ein Produkt gebildet, welches die Zellreplikation hemmt. Hier überleben also nur solche Zellen, bei denen die HSVTK bei der korrekten homologen Replikation eliminiert wurde (negative Selektion).

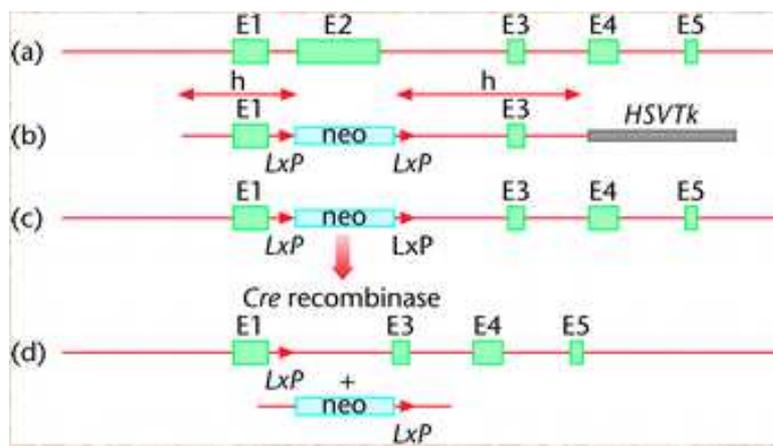


Abb.25 Schematische Darstellung der Integration von Fremd-DNA in einen bestimmten Genlokus einer Stammzelle (Eine genauere Beschreibung der einzelnen Schritte ist dem Text zu entnehmen).

- (a) ursprünglich unverändertes Gen;
- (b) veränderte Gensequenz mit Neomycin-Resistenzgen (neo) und Thyrimidinkinase des Herpes simplex Virus (HSVtk), die anderen Genaschnitte sind homolog (h);
- (c) richtig integrierte veränderte Gensequenz nach homologer Rekombination, das HSVtkGen wurde bei der homologen Rekombination eliminiert;
- (d) Deletion des Neomycinresistenzgens mittels Cre-Rekombinase. Das verbleibende Gen ist defekt, da ihm das Exon 2 fehlt.

Diese genetisch veränderte Stammzelle wird dann in eine Blastozyste eingebracht und diese wiederum einer scheinchwangeren Maus implantiert. Dadurch erhält man so genannte Chimären. Die Körperzellen enthalten zum Teil Zellen mit dem implantierten veränderten Erbgut (NR1-), andererseits auch Zellen mit dem ursprünglichen Erbgut (NR1+). Chimäre Tiere werden nun mit Tieren mit unverändertem Genom gekreuzt. Die Nachkommen mit heterozygotem Genom (NR1+/-) für das veränderte Gen werden anhand von Erbgutuntersuchungen herausgefiltert und untereinander verpaart. 25 Prozent der Nachkommen dieser Verpaarung sind für diese Genomveränderung (NR1-) dann homozygot, 25 Prozent sind für das ursprüngliche Genom (NR1+) homozygot, und 50 Prozent sind heterozygote (NR1+/-) Tiere (Forrest et al., 1994; Galli-Taliadoros et al., 1995; Moreadith et Radford, 1997; Picciotto et Wickmann, 1998; Soriano, 1995; Rudolph et Mohler, 1999).

Neben dieser gezielten Modifikation chromosomaler DNA kommt bei der konditionalen Geninaktivierung noch eine Gewebs- und Zellspezifität der Gendeletion hinzu (Doetschman et al., 1987, Gu et al., 1994; Thomas et Capecchi, 1987; Wang et al., 1996a et 1996b). Dazu werden zwei transgene Mausstämme, denen zusätzliche Gene in das Genom eingeschleust

wurden, miteinander gekreuzt. Die erste Mauslinie enthält ein LoxP flankiertes Gensegment (gefloxte Zielmaus), welches gewebsspezifisch mittels Cre-Rekombinase deletiert werden soll. Da sich die LoxP-Sequenzen in den Introns des zu eliminierenden Genabschnitts befinden, bleibt das Gen zuerst einmal funktionsfähig. Wildtyp und „gefloxte Maus“ unterscheiden sich phänotypisch nicht. Die zweite Mauslinie enthält als Transgen die gewebsspezifische Cre-Rekombinase, welche unter Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors steht. Dadurch wird beispielsweise bei einem DAT-spezifischen Promotor die Cre-Rekombinase nur in Zellen, die einen DAT enthalten, exprimiert, also in allen dopaminergen Zellen. Durch Verpaarung der beiden Mauslinien wird also mittels der Cre-Rekombinase das geflochte Gen nur in den promotorhaltigen Zellen, hier also der DAT-haltigen, dopaminergen Zellen, herausgeschnitten. Alle anderen Zellen exprimieren das Gen unverändert.

Mittels eines zusätzlich eingeschleusten Reportergens in die geflochte Mauslinie, beispielsweise der „LacZ-Inserts“ und eines davor liegenden Stop-Kodons, welches sich innerhalb des geflochten Bereiches befindet, kann das Rekombinationsprofil der Cre-Rekombinase überprüft werden. Das Transgen „LacZ-Insert“ wird erst aktiv, wenn durch die Cre-Rekombinase, die ja nur in den gewebsspezifischen Zellen exprimiert wird, das geflochte Gen inklusive Stop-Kodon deletiert wird. Das aktive LacZ-Gen produziert erst dann  $\beta$ -Galactosidase, welche mittels Substanz X-Gal angefärbt werden kann. So färben sich  $\beta$ -Galactosidase produzierende Zellen blau, was bedeutet, dass das geflochte Gen aus diesen Zellen deletiert wurde; in den ungefärbten Zellen ist das geflochte Gen nicht deletiert worden, es ist funktionsfähig (Feil et al., 1996a et 19996b; Lobe et Nagy, 1998, Tsien, 1998; Tsien et al., 1996; van der NR, 1997; Wang et al., 1996a et 1996b).

Bei induzierbaren Gen-Knockouts, welche später noch genauer beschrieben werden, kann das Gen nicht nur gewebes- und zellspezifisch inaktiviert werden, sondern der Gendeletionsprozess kann auch zeitlich gesteuert werden. Die oben erwähnte konditionale und induzierbare Gendeletion hat gegenüber den konventionellen Knockouts mehrere Vorteile. Häufig führt die Inaktivierung eines Gens von Anfang an, wie es bei den klassischen Nullmutationen der Fall ist, zu einem embryonalen letalen Phänotyp, da das Gen für die Entwicklung des Organismus von essentieller Bedeutung ist. Dieses Problem kann man eventuell einerseits durch konditionale Knockouts umgehen, in dem man nur in solchen Bereichen das Gen deletiert, in welchen es nicht essentiell für die Entwicklung ist. Die konditionale Gendeletion bietet sich auch an, wenn man die Genfunktion nur in einem bestimmten zell- beziehungsweise gewebsspezifischen Ort untersuchen möchte, um die primäre Funktion eines Zielgens in einem bestimmten Zell- beziehungsweise Gewebetypen

explizit bestimmen zu können. Möchte man Gene in Bereichen ausschneiden, die essentiell für die Entwicklung sind, benötigt man induzierbare Knockouts.

### 1.4.3 Die Cre-Rekombinase zur induzierbaren, konditionalen Gendeletion

Ziel dieser induzierbaren, konditionalen Genmutation ist die zeitliche und gewebespezifische Gendeletion mit Hilfe des Cre-/LoxP-Systems. Die verschiedenen Zelltypen des Gehirns exprimieren häufig die gleichen Gene, was die Bestimmung des Anteils eines speziellen Gens in einer spezifischen Stelle an einer bestimmten Funktion sehr schwierig gestaltet. Das Cre-/Lox-System (Abb.26) besteht aus zwei Komponenten. Zum einen aus der Lokus-spezifischen Cre-Rekombinase („causes recombination“) und zum anderen aus der LoxP-Sequenz („locus of crossover“ x aus dem Bakteriophagen P1). Mittels der Rekombination kommt es zur Spaltung und Neuverknüpfung von DNA, was eigentlich der Reparatur von Mutationen dient, aber auch genetische Diversität ermöglicht. Die Cre-Rekombinase, ein 38kDA großes Protein der Familie der ortsspezifischen Tyrosin-Integrasen, katalysiert die konservative Rekombination der DNA zwischen zwei LoxP-Erkennungssequenzen (Hamilton et Abremski, 1984; Sternberg et Hamilton, 1981) ohne weitere Cofaktoren zu benötigen. Die LoxP-Sequenz ist eine 34 Basenpaare (bp) lange DNA-Sequenz, welche aus zwei palindromischen Sequenzen, die eine Spacer-Region (gefloxtes DNA-Segment) umgeben, besteht. Je zwei Moleküle der Cre-Rekombinase binden an eine LoxP-Sequenz (Mack et al., 1992). Flankieren die beiden LoxP-Sequenzen einen DNA-Abschnitt in der gleichen Orientierung (palindromisch), wird dieses in Form eines zirkulären Produkts herausgeschnitten und abgebaut, zurück bleibt eine LoxP-Sequenz, die sich aus den beiden ursprünglichen zusammensetzt (Abremski et al., 1983).

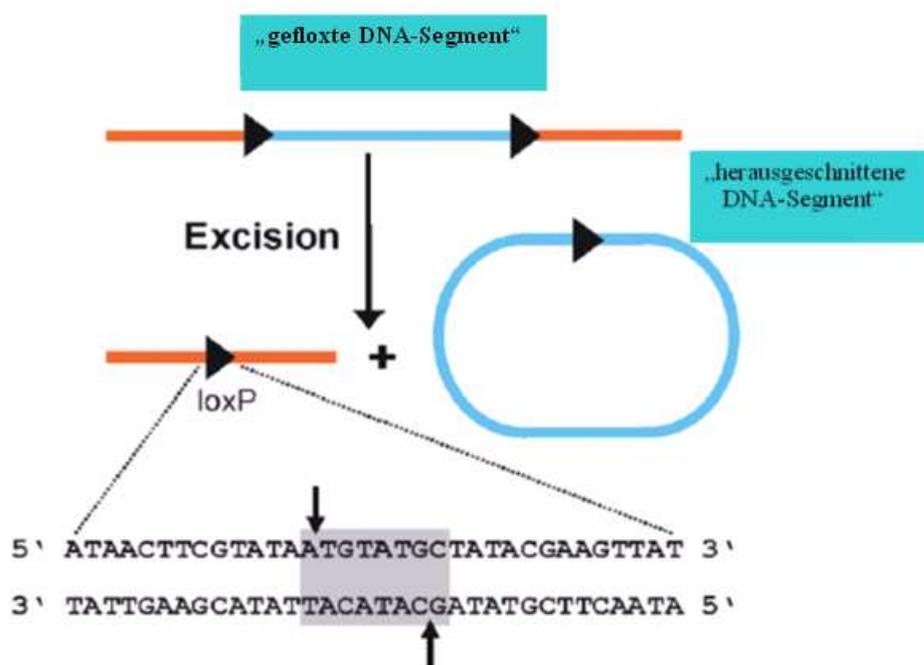


Abb.26 Die Cre-/LoxP-vermittelte Excision von DNA-Segmenten. Das geflochte DNA-Segment (blau), das zwischen den beiden loxP-Sequenzen ( ▶ ) liegt, wird mittels Cre-Rekombinase als zirkuläres Produkt aus dem Chromosom herausgeschnitten und zellulär abgebaut.

Das Prinzip der Cre-/LoxP-vermittelten, zellspezifischen Mutation besteht auf der Generierung zweier Mauslinien. Bei der ersten Mauslinie exprimieren die Mäuse die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promotors (Abb.27 A, grüne Cre-Maus) (Nagy, 2000; Metzger et Feil, 1999), welcher sich nur in gewebsspezifischen Zellen befindet, wodurch die Cre-Rekombinase nur in den Zellen dieses Gewebes gebildet wird. Die zweite Linie trägt eine geflochte NR1-Untereinheit des NMDAR-Gens, das durch zwei gleichgerichtete LoxP-Sequenzen flankiert wird, welche nicht mit der normalen Expression des Gens in der Maus interferieren, womit sich die geflochte Maus (Abb.28 A, blaue Maus) phänotypisch nicht vom Wildtyp unterscheidet. Dies geschieht durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen, wobei die LoxP-Sequenz in den Introns platziert wird (Guy et al., 2001; Sakai et al., 2001). Durch die Kreuzung der beiden Mauslinien kommt es zu doppeltransgenen Nachkommen. Bei allen Zellen, die die Cre-Rekombinase exprimieren, kommt es nun zur Deletion des flankierten NR1-Genabschnitts, alle anderen nicht-Cre-Rekombinase exprimierenden Zellen zeigen in ihrem Phänotyp keinen Unterschied zum Wildtyp (Abremski et al., 1983).

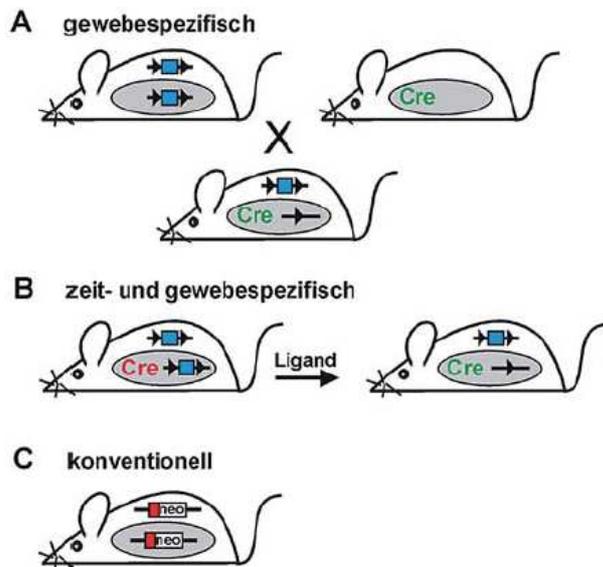


Abb.27 (A) gewebespezifische Gendelektion: Eine „geflochte Maus“ wird mit einer „gewebespezifischen Cre-Maus“ gekreuzt. Bei den Nachkommen wird das „geflochte Exon“ aus den Zellen herausgeschnitten, welche die gewebespezifisch Cre-Rekombinase bilden.

(B) zeit- und gewebespezifische Gendelektion: Die gewebespezifische Cre-Rekombinase liegt inaktiv (Cre) vor, erst nach Gabe eines Liganden wird sie aktiviert (Cre) und das „geflochte Exon“ eliminiert.

(C) konventionelle „Knockout-Maus“: Durch das Neomycinresistenzgen (neo) wird ein Exon permanent zerstört.

Wie bereits erwähnt, kommt es bei der konventionellen Nullmutation mit der Deletion entwicklungsphysiologischer wichtiger Gene zu Phänotypen mit schwerwiegenden Entwicklungsstörungen bis hin zum embryonalen Tod. Zur posttranslationalen Kontrolle der Cre-Rekombinase-Aktivität wurden sogenannte ligandenaktivierbare Cre-Rekombinasen generiert. Hierzu wurden verschiedene experimentelle Ansätze verwendet, bei denen Fusionsproteine, bestehend aus der Cre-Rekombinase mit Ligandenbindungsdomänen von mehreren cytosolischen Hormonrezeptoren, entwickelt wurden (Brocard et al., 1998; Metzger et al., 1995, Tsujita et al., 1999). Ziel war zum einen die so genannte „leakiness“ des Cre-Systems, was bedeutet, dass in Abwesenheit des synthetischen Liganden keine Basalaktivität bestehen soll, die exprimierte Cre-Rekombinase sollte also inaktiv vorliegen (Abb.27 (B) Cre). Zum anderen soll die ligandenspezifische Cre-Rekombinase natürlich auch in allen Zellen des Zielgewebes exprimiert werden und keine mosaikartige Expression erfolgen. Der synthetische Ligand sollte auch keine anderen Wirkungen auf den Organismus haben und möglichst schnell im gewünschten Zielgewebe verfügbar sein.

### 1.4.4 Das Mausmodell „DATCreERT2-NR1“

Durch die Fusion der Cre-Rekombinase mit einer mutierten Ligandenbindungsdomäne (LBD) des steroidalen Östrogenrezeptors (ÖR) am C-Terminus der Cre-Rekombinase (Brocard et al., 1997; Feil et al., 1996a et 1996b; Metzger et al., 1995; Schwenk et al., 1998) erhielt man eine tamoxifeninduzierbare Cre-Rekombinase. Die mutierte LBD besitzt keine Affinität zum endogenen Liganden 17 $\beta$ -Östrogen und liegt somit basal inaktiv vor (Abb.28 B rote Cre-Maus). Sie kann nur mittels des synthetischen Liganden „Tamoxifen“ aktiviert werden (Abb.28 B grüne Cre-Maus). Das Fusionsprotein „inaktive Cre-Rekombinase“, welches unter einem zelltypspezifischen Promotor, in unserem Falle dem Dopamintransporter (DAT), exprimiert wird, ist im Cytosol an zwei Hitzeschockmoleküle gebunden, womit der Transport an den Transkriptionsort Zellkern verhindert wird. Erst durch die Ligandenbindung Tamoxifen werden die Hitzeschockmoleküle freigesetzt, die liganden-aktivierte Cre-Rekombinase kann in den Zellkern transportiert werden. Dort binden zwei Fusionsmoleküle an die gleichgerichteten LoxP-DNA-Erkennungssequenzen, welche als zirkuläres Fragment herausgeschnitten und abgebaut wird (Abb.28).

Durch diese gewebespezifische Expression der Tamoxifen-Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinase (Logie et Stewart, 1995; Schwenk et al., 1998) kommt es zu einer örtlichen dopaminergen und zeitlichen tamoxifenvermittelten induzierten Deletion der NMDAR-Untereinheit NR1.

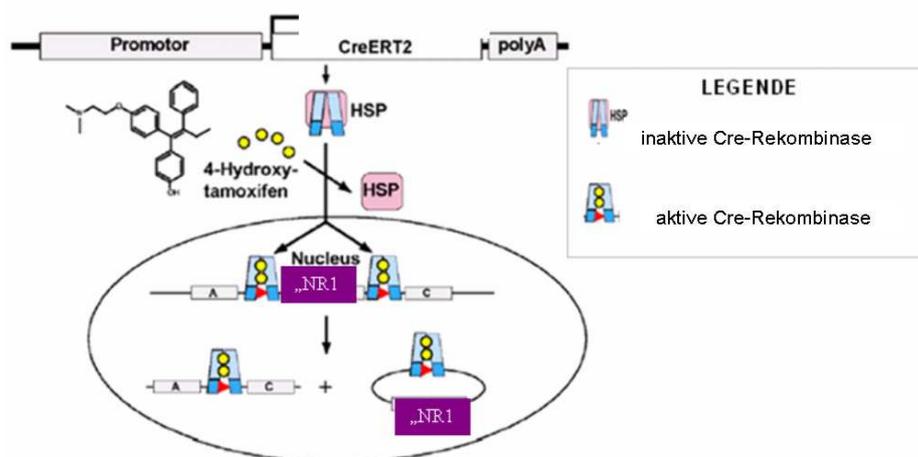


Abb.28 Mechanismus der tamoxifeninduzierten Deletion der NR1-Untereinheit (NR1) des NMDAR in einem dopaminergen Neuron. (Weitere Erklärung siehe Text.)

Von den drei verschiedenen tamoxifeninduzierbaren Varianten der Cre-Rekombinase wurde hier das humane ERT mit G521R Mutation (Feil et al., 1996a et 1996b; Li et al., 2000; Logie et Stewart 1995; Metzger et al., 1995) verwendet. Auch die anderen zwei Variationen, murines ERTM mit G525R Mutation und humanes ERT2 mit G400V/ M543A/ L544A Mutation sprechen nicht auf endogenes  $17\beta$ -Estrogen, sondern nur auf den synthetischen Estrogenagonisten 4-Hydroxytamoxifen (OHT) an. Das preiswertere, applizierte Tamoxifen wird in der Leber in OHT und N-Desoxymethyltamoxifen umgewandelt. Das CreERT2-System ist zurzeit das am besten charakterisierte und am häufigsten verwendete System zur konditionellen Gendeletion (Garcia-Otin et Guillou, 2006).

Die Behandlung mit dem synthetischen Östrogenanalog Tamoxifen erfolgte bei adulten „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten an fünf aufeinander folgenden Tagen, zweimal täglich intraperitoneal in einer Dosierung von 1mg pro Maus. Die Kontrolltiere, welche ein unverändertes Genom enthielten, erhielten ebenfalls an fünf aufeinander folgenden Tagen einmal täglich intraperitoneal die Tamoxifenlösung.

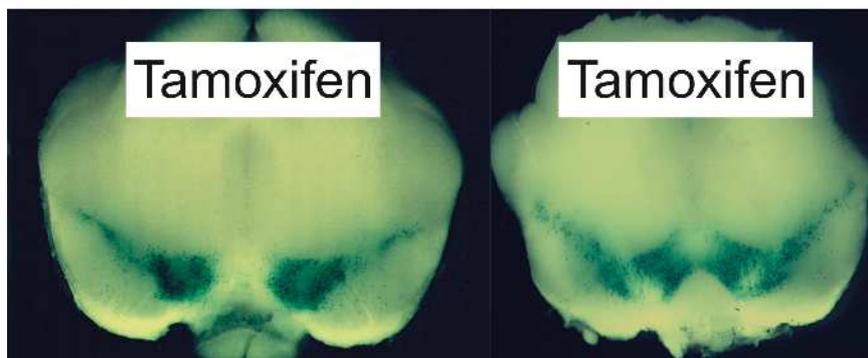


Abb.29 Lokalisation der Mutation im Gehirn.

Durch das Einbringen des oben beschriebenen Reportgens „lacZ-Gen“, welches sich außerhalb der geflochten Gensequenz befindet und eines Stop-Kodon, das sich innerhalb des geflochten DNA-Abschnittes befindet, färben sich Zellen mit deletierter NMDAR-NR1-Untereinheit und lacZ induzierter, exprimierten  $\beta$ -Galactosidase blau an (Abb.29 und Abb.30), alle anderen Zellen mit der nicht deletierten NMDAR-NR1-Untereinheit werden nicht angefärbt.

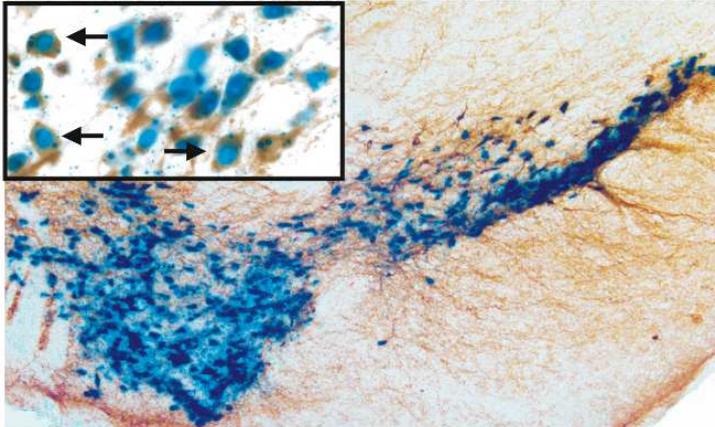


Abb.30 Analyse des Rekombinationsprofils einer Cre-Maus durch Reporter-Mäuse. Nur Zellen mit deletierter DNA-Sequenz für die NR1-Untereinheit und dem Stop-Kodon für lacZ färben sich nach histochemischer Anfärbung blau.

## 1.5 VERHALTENSTESTS

Durch Verhaltensanalysen können phänotypische Unterschiede zwischen genmanipulierten Mäusen und beispielsweise deren Wildtypen charakterisiert werden. Sie sind ein wichtiges Hilfsmittel, um zugrunde liegende neurobiologische Mechanismen von Verhaltensweisen zu erkennen. Da Verhaltensuntersuchungen immer Reaktionen des Gesamtorganismus darstellen, sind Aussagen über Funktionen bestimmter Hirnareale oder spezieller Leitungssysteme nur bedingt möglich.

### 1.5.1 Lokomotorische Aktivität im Offenfeld

Die Lokomotion im Offenfeld basiert auf der natürlichen Tendenz von Nagetieren, neue Umgebungen zu explorieren, um neue Nahrungs-, Reproduktions-, Schutz- und Nestressourcen ausfindig zu machen. Die Häufigkeit der explorativen Verhaltensweisen in einem unvertrauten Offenfeld wird begrenzt durch die gegensätzliche Motivation, potentielle Gefahrenquellen, beispielsweise Angriffe von Feinden, zu vermeiden. Das beobachtete Verhalten ist also immer ein Kompromiss zwischen diesen beiden entgegengesetzten Verhaltenstendenzen, der Exploration und der Neophobie. Welche der diametralen Motivationstendenzen überwiegt, wird durch den aktuellen Bedürfnisstatus, wie beispielsweise erhöhtes Explorationsverhalten bei Hunger des Tieres, moduliert. Durch Habituation, einer wiederholten Darbietung einer einst neuen Umgebung, kommt es zu einer

Aktivitätsabnahme, da das Tier genug Informationen über die neue Umgebung gesammelt und sich an diese gewöhnt hat.

Das Verhalten der Mäuse in der Aktivitätsbox wird maßgeblich von der Thigmotaxis, was auch als „wall seeking behaviour“ bezeichnet wird, geprägt. Es ist ein typisches Verhalten von Beutetieren, sich bevorzugt am Rand des Käfigs aufzuhalten und sich meist in unmittelbarem Kontakt zur Käfigwand fortzubewegen. So kommt es physiologischerweise durch den aversiven Reiz der neuen Umgebung zu einem signifikant geringeren Explorationsverhalten des inneren Felds und zu einer erhöhten Thigmotaxis.

Die lokomotorische Aktivität, welche bei den Nagetieren zum Spontanverhalten gehört, wird über komplexe Schaltkreise reguliert, an welchem die Basalganglien Regelkreise zur Kontrolle und Modifizierung motorischer, assoziativer und limbischer Informationen bilden (Joel et Weiner, 2000). Für ein zielgerichtetes räumliches Explorationsverhalten ist die motorische Aktivität eine essentielle Voraussetzung. Der Lokomotion liegt die Verarbeitung interner motivationaler und externer Stimuli zugrunde, vermittelt wird sie von anatomisch und funktionell interagierenden Systemen (Mogenson et al., 1980), wobei die Interaktion zwischen dem cortico-limbischen und motorischen System vor allem auf der Ebene des dorsalen (CPu: Caudate putamen) und ventralen Striatums (NcA: Nucleus accumbens) stattfindet. Dabei wird die Motorik ständig an die sich verändernden Umweltbedingungen angeglichen, was auch als Verhaltensanpassung bezeichnet und über hierarchisch angeordnete motorische Bahnen im ZNS gesteuert wird. An der Spitze steht der Cortex, welcher verhaltensrelevante Informationen über verschiedene Projektionsbahnen über den motorischen Cortex an die Motoneuronen im Rückenmark leitet, die die Skelettmuskulatur innervieren, welche dann ein motorisches Verhalten ausführen. Das Cerebellum, welches hauptsächlich Lage und Koordination im Raum beeinflusst und die Basalganglien, welche grundlegend an der Initiierung, Richtung und Durchführung der Verhaltensantwort beteiligt sind, wirken modulierend auf die motorischen Bahnen.

### 1.5.2 Nestbauverhalten

Als Nest wird ein erbautes Gebilde bezeichnet, das von verschiedensten Tierarten, wie beispielsweise Vögeln, Säugetieren, Fischen und Insekten gestaltet wird. Nestbau ist bei Nagetieren ein natürlicher, genetisch determinierter Verhaltenskomplex, der für das Überleben in freier Wildbahn von großer Bedeutung ist. Das erbaute Nest ist der Ort zum

Gebären und Aufziehen der Nachkommen und bietet Schutz vor Feinden und Umwelteinflüssen, vor allem vor extremer Kälte.

Trotz jahrelanger Selektion verschiedener Labornagetierstämme ist das Nestbauverhalten immer noch im Verhaltensrepertoire der Tiere vorhanden. Die dabei erbauten Nester sind bei Labormäusen etwa von gleicher Größe oder etwas größer als bei Wildmäusen, allerdings unterscheiden sich die Nestformen der einzelnen Labormausstämme. Das Verhalten kann bei einzelnen als auch bei in Gruppen gehaltenen Tieren beobachtet werden, die ein gemeinschaftliches Nest errichten. Nagetiere, die zuvor keine Möglichkeit zum Nestbau hatten, errichten ebenso Nester wie Tiere, deren Nest täglich zerstört wird. Bei Labor- und domestizierten Nagetieren wird das Nistmaterial manipuliert und wirkt so der Langeweile in Standardhaltungen entgegen. Zum anderen erfüllt es, wie in der Wildbahn, auch hier eine Schutzwirkung vor aversiven Stimuli, wie beispielsweise Licht und akustischen Reizen. Ebenso herrschen im Nest gegenüber dem restlichen Käfig ein anderes Klima, andere Licht- und andere akustische Verhältnisse. Man unterteilt das Nestbauverhalten in maternales, bei Weibchen zur Aufzucht der Jungtiere, und das in dieser Arbeit näher untersuchte nicht maternale Nestbauverhalten. Dabei erbauen Männchen in der Wildbahn meist in der Mitte ihres Territoriums ihr Nest, welches sie gegenüber Eindringlingen verteidigen.

Auf den Käfigdeckel aufgebracht Nistmaterial wird durch die Gitterstäbe ins Käfiginnere gezogen. Man kann die Manipulation des Nistmaterials, wie Tragen, Sammeln und Zernagen als Bestandteil des Nestbauverhaltens sehen, es kann allerdings auch als Beschäftigung gewertet werden. Da Nagetiere nachtaktiv sind, errichten sie ihre Nester vor allem in der Nacht. Insbesondere vor Sonnenaufgang während der Hellphase werden diese dann zum Ruhen genutzt. Nach Ergebnissen mehrerer Nestbaustudien werden die Nester hauptsächlich unter der Futterraufe gebaut, also dem Ort, an dem Labormäuse auch ohne Nistmaterial bevorzugt schlafen.

Die Auswirkungen des Nestbaus auf das Verhalten der Nagetiere sind vielfältig. So zeigten Mäuse, deren Käfig mit Nestmaterial angereichert war, mehr Explorationsverhalten als Mäuse, denen kein Nestmaterial zur Verfügung stand. Auch das Aggressionsverhalten der Mäusemännchen wird durch die Möglichkeit des Nestbaus gesenkt.

In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Läsionen der medial preoptic area, dem Septum oder dem HIP, zu einem geringeren Nestbauverhalten führen. Genetisch veränderte Mäuse zeigen ebenfalls ein verändertes Verhalten im Nestbau. Somit ist der Test, zusammen mit

anderen Verhaltenstests, zur Charakterisierung des Verhaltens der Phänotypen neuer Mausmutanten geeignet.

### 1.5.3 Soziale Interaktion

Soziale Interaktion bezeichnet das wechselseitig aufeinander bezogene Handeln zwischen Akteuren, die aufeinander reagieren, einander beeinflussen und steuern. Das Ziel ist die Abstimmung des Verhaltens der Beteiligten bzw. des korrekten Handelns der Kooperationspartner. Es umfasst somit Formen des einträchtigen Zusammenlebens genauso wie konflikthafte Verhalten und dient der innerartlichen Verständigung.

Olfaktorische Signale des Partners stellen einen wichtigen Faktor für soziale und sexuelle Beziehungen von Tieren dar. Diese entstehen durch spezielle Duftdrüsen, aber auch durch die über den gesamten Körper verteilten Talgdrüsen sowie die Umgebungsgerüche, vor allem den urinalen und fäkalen Geruch. Dabei hat jede Gruppe ihren eigenen Geruch, der auch ihr Territorium prägt. So beginnt beispielsweise die erste Kontaktaufnahme, insbesondere von fremden Artgenossen, mit der anogenitalen Kontrolle.

Das Sozialverhalten der Mäuse, welches ein Leben lang konstant bleibt und keinen altersbedingten Schwankungen unterliegt, wird im Sozialen Interaktionstest („social interaction test“ nach Angelis et File, 1979) mit Jungtieren (juvenilen Mäusen) untersucht. Neben dem sozialen Interesse beinhaltet ein unbekannter Sozialpartner per se auch immer eine Angstkomponente, ebenso wie beispielsweise eine neue Umgebung. In diesem Test interferiert also soziales Interesse mit der Angst, das Revierverhalten wird durch eine neue Umgebung unterbunden.

### 1.5.4 Wiedererkennungstest (object recognition test)

Um das Erinnerungsvermögen von Nagetieren zu testen, wird der so genannte Objekt-Wiedererkennungstest verwendet. Die Fähigkeit, bereits bekannte Objekte von unbekanntem zu unterscheiden, wird dabei als Wiedererkennung bezeichnet. Man nutzt hierfür das spontane Explorationsverhalten von Nagetieren, welches, wie in Versuchen gezeigt werden konnte, bei einem neuen, unbekanntem Objekt wesentlich stärker ausgeprägt ist als bei einem bekannten (Ennaceur et Delacour, 1988). Dies setzt voraus, dass das Versuchstier

charakteristische Merkmale des Objektes wahrnimmt, unterscheidet, identifiziert und diese mit den charakteristischen Eigenschaften bereits bekannter Objekte vergleicht (Steckler et al., 1998). Die Zeit zwischen den beiden Präsentationen wirkt sich deutlich auf das Explorationsverhalten der zweiten Präsentation aus. Dies zeigt, dass diesem Test Gedächtnisprozesse zugrunde liegen. Die Maus ist in der Lage, ein erstmalig präsentiertes Objekt nach einem halbstündigen, präsentationsfreien Intervall bei einer zweiten Präsentation zu erkennen, wodurch die Explorationszeit des bekannten Objekts bei der zweiten Präsentation gegenüber einem zusätzlich unbekanntem Objekt vermindert ist. Da ein unbekanntes Objekt allerdings auch einen aversiven Reiz darstellt, findet die Exploration des neuen Objekts meist mit einer größeren Latenz statt (Adriani et al., 2000; Hode et al., 2000; Belzung et al., 2001).

Somit analysiert der Wiedererkennungstest Veränderungen der kognitiven Fähigkeiten, wobei die längere Exploration eines bekannten Objekts in Relation zu einem unbekanntem Objekt als Indiz für eine verminderte Gedächtnisleistung interpretiert wird (Ennaceur et Delacour, 1988; Spreng et al., 2001).

## 1.5.5 Emotionales Verhalten

### 1.5.5.1 Erhöhtes Plus-Labyrinth (elevated plus-maze)

Angst ist zunächst einmal ein notwendiger und normaler Affekt. Sie ist eine emotionale Reaktion, welche durch Reize, die ein stark negatives Ereignis erwarten lassen, ausgelöst wird und Reaktionen auf Verhaltens- und physiologischer Ebene nach sich zieht. Durch die erwartete Bedrohung wird der Körper in eine Art „Alarmzustand“ versetzt, bei welchem Energie mobilisiert wird, um das Überleben in Form von Angriff oder Flucht zu ermöglichen. Im Gegensatz dazu ist Furcht eine emotionale Reaktion mit ebenfalls begleitenden Reaktionen auf der Verhaltens- und physiologischen Ebene, wobei auslösende Umweltreize zuerst mit unkonditionierten, aversiven Reizen gepaart werden müssen, somit muss Furcht erst erlernt werden. Furcht ist also, im Gegensatz zur Angst, durch wiederholte Darbietung des Reizes, gekoppelt mit unaversiven Konsequenzen, extinktierbar.

Das „elevated plus-maze“ (EPM) ist ein Test zur Messung eines unkonditionierten, explorationsbasierten, angstassoziierten Verhaltens (Handley et Mithani, 1984). Auch hier ist das natürliche Verhalten von Nagetieren, neue Umgebungen zwecks Suche nach überlebenswichtigen Ressourcen wie Futter, Sexualpartner und neue Lebensräume, Grundvoraus-

setzung für diesen Test und steht im Konflikt mit der angeborenen Aversion bezüglich erhöhten, offenen, relativ stark beleuchteten und ungeschützten Bereichen. Mäuse die das EPM explorieren, verbringen die meiste Zeit in den „geschlossenen“ Armen und meiden die „offenen“ Arme der Testapparatur. Als Ursache hierfür wird, da das EPM erhöht ist, eine natürliche Furcht vor der Tiefe (Treit et Fundytus, 1988), aber auch mangelnde thigmotaxische Reize in den offenen Armen gesehen, da Nagetiere ihre Umgebung durch das Abtasten mit ihren Vibrissen erkunden. Des Weiteren ist auch die stärkere Beleuchtung, die in den „offenen“ Armen höher als in den „geschlossenen“ ist, als ein nicht konditionierter Reiz für Angst und somit für das Vermeidungsverhalten der „offenen“ Arme zu sehen. Mit diesem Test ist es möglich, die Tendenz der genetisch manipulierten Mäuse, das anxiogene- oder explorative Verhalten verstärkt zu zeigen, zu erfassen. So sind eine verminderte Zahl an Eintritten und des verminderten Gesamtaufenthalts in den „offenen“ Armen ein Hinweis auf eine Dominanz des Angstverhaltens gegenüber dem Explorationsverhalten. Beim Dominieren des anxiolytischen Verhaltens kommt es hingegen zu einer erhöhten Zahl an Eintritten und des Gesamtaufenthalts in den „offenen“ Armen (File et al., 1993; Pellow et al., 1985a et 1985b).

#### 1.5.5.2 Hell-Dunkel-Box (light-dark-emergence test)

Auch die Hell-Dunkel-Box ist ein wichtiger Test zur Erfassung von kongenitalem, angstassoziiertem Verhalten (Costall et al., 1989). Es beruht auf einer Konfliktsituation, neue unbekannte Areale explorieren zu wollen, um natürliche Instinkte zu befriedigen und andererseits instinktiv helle, ungeschützte Areale aus Furcht vor angreifenden Feinden zu meiden.

Die Testbox besteht aus einem kleinen, ringsum geschlossenen, dunklen Bereich. Das durch eine Öffnung mit dem dunklen Bereich verbundene, helle Areal stellt also einerseits einen Reiz für exploratives Verhalten dar, auf der anderen Seite bewirkt es auch ein angstassoziiertes Verhalten. Anfangs überwiegt die Furcht vor dem neuen, hellen Areal, der keinerlei Schutz vor potentiellen Feinden bietet. Je nach Ängstlichkeit der Versuchstiere beginnen sie nach einer gewissen Zeit allerdings das neue, helle Areal beispielsweise nach möglichem Futter oder Sexualpartnern zu erkunden. Auch die Frequenz und Dauer der Explorationen spiegelt den Konflikt des unkonditionierten, explorationsbedingten, angstassoziierten Verhaltens wieder.

### 1.5.6 Präpulsinhibition (PPI) der akustisch ausgelösten Schreckreaktion (ASR)

Bei unerwarteten und starken Reizen wie beispielsweise akustischen, taktilen oder visuellen, kommt es bei Säugetieren zu einem protektiven Verhaltensmuster, der so genannten Schreckreaktion. Charakteristisch für eine Schreckreaktion ist ein stereotipes Muster: anfangs erfolgt ein Lidschlag mit Kiefer- und Ohrmuschelbewegung, darauf folgt die Kontraktion der Nacken- und Extremitätenmuskulatur. Dabei werden gerade stattfindende Verhaltensweisen unterbrochen, die Herzfrequenz steigt (Koch, 1999). Beim Menschen kann sie mit einer elektromyographischen Aufnahme des Muskulus orbicularis oculi während des Lidschlags bestimmt werden. Bei der Maus und Ratte wird die ASR in der Regel als Ganzkörperreaktion durch die Auslenkung einer bewegungssensitiven Kammer bestimmt. Durch verschiedene Parameter, wie Reizintensität, Habituation und Hintergrundrauschen, wird die Reaktionsstärke beeinflusst (Koch et Schnitzler, 1997; Koch, 1999). Die Amplitude der akustisch ausgelösten Schreckreaktion (Abb.31A) kann durch angenehme und aversive Emotionen abgeschwächt, beziehungsweise verstärkt werden. So genannte Präpulse, die 30 bis 35 Millisekunden vor dem eigentlichen Schreckreiz präsentiert werden und selbst aber keine Schreckreaktion hervorrufen (Abb.31B), vermögen die Amplitude der akustisch ausgelösten Schreckreaktion (Abb.31C) abzuschwächen. Sie ist ein operationales Maß für die sensorimotorische Reaktionsunterdrückung (Koch et Schnitzler, 1997; Koch, 1999; Swerdlow et al., 2001).

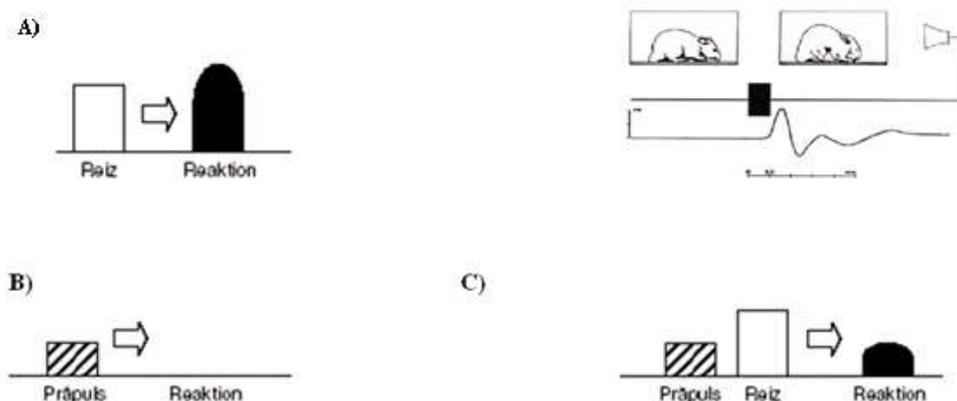


Abb.31 Schema A) der akustisch ausgelösten Schreckreaktion (ASR);  
 B) des Präpulses alleine;  
 C) der Präpulsinhibition (PPI) der ASR.

Eine zentrale Rolle spielt dabei der Nucleus reticularis pontis caudalis (PnC), der auch als sensomotorisches Interface bezeichnet wird, da er zusätzlich Afferenzen anderer Hirnregionen erhält (Abb.32), die modulierend auf die Schreckreaktion einwirken (Koch, 1999). Der akustische Reiz wird dabei von Neuronen des vestibulo-cochleären Ganglions, der cochlear root, über glutamaterge Bahnen auf das Riesenneuron des PnC übertragen. Von dort erfolgt die Projektion auf spinale und craniale Motoneuronen, die für die motorische Antwort zuständig sind (Koch et Schnitzler, 1997; Koch, 1999; Yeomans et Frankland, 1995). Durch den Präpuls wird vermutlich eine neuronale Hemmschleife aktiviert, die eine Verarbeitung nachfolgender, möglicherweise konkurrierender, sensorischer, motorischer und kognitiver Sinneseingänge unterdrückt und dadurch die ungestörte Verarbeitung des Präpulses gewährleistet, sowie Interferenzen von Verhaltensabläufen verhindert (Koch et Schnitzler, 1997). Dieser Mechanismus schützt somit den initialen Stimulus, dient der Filterung von Informationen und verhindert dadurch sensorische Überflutung und kognitive Fragmentierung, die bei zahlreichen psychiatrischen Erkrankungen auftritt (Geyer et al., 2001; Van den BM et al., 2003).

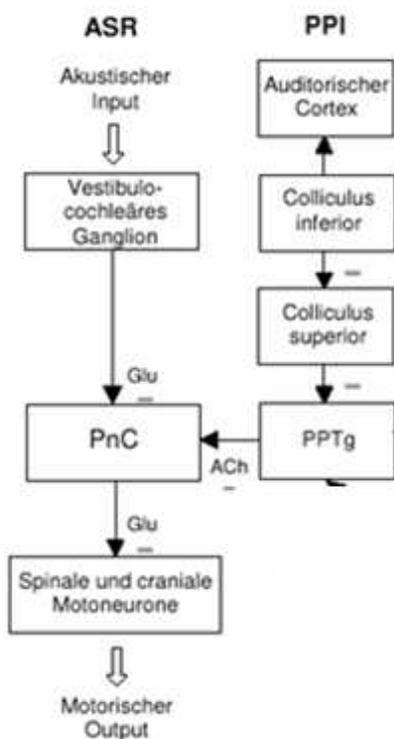


Abb.32 Auswirkung der PPI auf die ASR.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit dient der in vivo Charakterisierung des Phänotyps einer Mausmutante mit Tamoxifeninduzierter Deletion der NMDAR-Untereinheit NR1 in dopaminergen Neuronen.

Anhand von verschiedenen Tests soll untersucht werden, ob die „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten im Vergleich zu den tamoxifenbehandelten Wildtypen Veränderungen

- in der lokomotorischen Aktivität,
- im Nestbauverhalten,
- bei der sozialen Interaktion,
- in der Kurz- und/ oder Langzeitgedächtnisleistung,
- im emotionalen Verhalten,
- in der sensomotorischen Filterung

zeigen.

Außerdem wird getestet, ob diese zeit- und zellspezifische Deletion der NR1-Untereinheiten der NMDARs auch Auswirkungen auf das Gewicht der „DARCreERT2-NR1“-Mausmutanten im Verhältnis zu den Tamoxifenbehandelten Wildtypen hat.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Versuchstiere

#### 2.1.1 Tiere und Tierzucht

Alle Mäuse für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden aus der Tierversuchsanlage des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg bezogen, wo sie gezüchtet wurden. Es handelte sich um 42 männliche Mäuse vom Genotyp „DATCreErt2-NR1“, die zwischen Januar und Februar 2007 geboren wurden. Zu Beginn des Versuchs waren sie ungefähr sechs Monate alt.

#### 2.1.2 Tierhaltung

Für die Dauer der Versuche wurden die Tiere in einem Tierhaltungsraum des Zentralinstituts für seelische Gesundheit in Mannheim untergebracht. Die Tiere wurden unter einem künstlichen 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus (zeitgeschaltete Leuchtstoffröhren), in ca. 25,5 x 20 x 14cm<sup>3</sup> großen Makrolon ®-Einzelkäfigen Typ II bei einer Raumtemperatur von 22°C und einer relativen Luftfeuchte von 50-60% gehalten. Die Hellphase begann um 7:00 Uhr und endete um 19:00 Uhr. Sie hatten freien Zugang zu Nagetierfutterpellets (Sniff, Soest) und Trinkwasser. Einmal in der Woche, immer freitags nach Beendigung der Versuche, wurden die Käfige, Wasser und Futter gewechselt, so dass die Tiere Zeit hatten, sich über das Wochenende an die neuen Käfige und deren Einrichtung zu gewöhnen. Dadurch sollte der Stressfaktor einer neuen und unbekanntenen Umgebung als Auswirkung auf die Versuche ausgeschlossen werden. Die Tiere mussten zu Beginn der Versuche getrennt werden, da sie „barbering“, ein häufig beobachtetes Dominanzverhalten bei in Gruppen gehaltenen Labormäusen, zeigten. Die Vibrissen sind für die Sensorik der Maus bei der Orientierung, Hilfe beim Riechen, Futtersuche, Hören, Balancieren und Sozialverhalten unerlässlich. Nach Isolierung der Mäuse in Einzelkäfigen wuchsen die Vibrissen nach, und es konnte mit den Verhaltenstests begonnen werden. Des Weiteren wurde ihnen bei jedem Käfigwechsel Nistmaterial angeboten, um eine möglichst artgerechte Haltung zu gewährleisten.

Vor Beginn der Verhaltenstests wurden die Tiere an fünf aufeinander folgenden Tagen an die Hand der Versuchsleiterin gewöhnt. Zu diesem Zweck wurden die Tiere aus dem

Heimkäfig heraus- und mehrere Male in die Hand der Versuchsleiterin genommen und in Positionen gebracht, die auch später in den Versuchen benötigt werden.

## 2.2. Verhaltenstests

Alle Verhaltenstests wurden in speziell dafür eingerichteten und nur für verhaltensphysiologische Untersuchungen genutzten Testräumen, an die die Tiere vorher habituiert wurden, durchgeführt. Häufig wurde die Datenerhebung mit Hilfe von computergestützten Überwachungssystemen getätigt, was die Möglichkeit bot, das Tierverhalten innerhalb der Testsituation digital zu filmen, ohne die Maus dabei durch die Anwesenheit des Experimentators zu beeinflussen. Alle Verhaltensapparaturen wurden nach jedem Testdurchlauf gründlich von den Mausexkrementen befreit und zur Vermeidung von Geruchsspuren mit einer 70%igen Alkohollösung ausgewischt. Um Aversionen vor eventuellen Alkoholresten zu vermeiden, wurden die Apparaturen anschließend noch einmal mit einem nassen Tuch gereinigt und anschließend trocken gewischt.

### 2.2.1. Lokomotorische Aktivität



Abb.33 Tru scan™ Photobeam sensor – E 63-12.

### **Apparatur**

Die lokomotorische Aktivität einer Maus kann selektiv im „Tru scan“ System (Tru scan <sup>TM</sup> Photobeam sensor –E63-12) analysiert werden. Die Box ist mit Lichtschranken ausgestattet, die automatisch jede Unterbrechung in drei Ebenen registrieren. Die Wände bestehen aus circa 39cm hohem, durchsichtigem Plexiglas, der Boden ist grau und hat eine Fläche von 26 x 26cm<sup>2</sup> (Abb.33). Durch die Boxen werden in x- und y-Richtung Infrarotstrahlen auf zwei Ebenen, deren Abstand zum Boden 2,5cm beziehungsweise 6cm beträgt, zum jeweils gegenüberliegenden Sensor geschickt. Die Daten des Sensors werden mittels einer Schnittstelle an einen PC übertragen. Aus der Unterbrechung der Infrarotstrahlen wird die jeweilige Position des Tieres ermittelt und daraus wiederum werden verschiedene Aktivitätsparameter mittels der „Tru Scan“ -Software berechnet. Die Beleuchtungsstärke am Boden beträgt dabei circa 30lux.

### **Durchführung**

Am Tag vor der Messung wurden die Tiere während 30 Minuten an den Raum habituiert. Für die Aktivitätsmessung am folgenden Tag wurden jeweils acht Mäuse pro Durchgang getestet, das heißt eine Maus pro Messstation. Dabei wurden die Tiere in der Mitte der Box platziert, die Messung per Computer dauerte jeweils 20 Minuten. Danach wurden sie wieder in ihren Heimkäfig gesetzt und in den Tierhaltungsraum zurück gebracht.

### **Gemessene Parameter**

1.) **AKTIVITÄTSZEIT (*move time*)**

Gesamtzeit der Bewegungen in der X-Y-Z Ebene in Sekunden.

2.) **ZURÜCKGELEGTER WEG (*distance*)**

Summe aller gerichteten Koordinatenänderungen in der X-Y Ebene (Bewegungen in der horizontalen Ebene).

3.) **AUFRICHTEN (*vertical-plane-entries/ rearings*)**

Anzahl, wie oft die Maus die Vertikale durchkreuzt (Aufrichtung der Maus).

4.) **AUFENTHALTSZEIT IM ZENTRUM (*center time*)**

Zeit, die die Maus in der Mitte der Box verbracht hat, in Sekunden.

5.) **ZENTRUMSEINTRITTE (*center entries*)**

Anzahl der Eintritte in die Mitte der Box.

## 2.2.2. Nestbauverhalten

### Apparatur/ Durchführung

Nach dem Wechseln der Heimkäfige werden den Mäusen zwei zu Dreiecken gefaltete Tissue-Tücher in die Gitterstäbe des Käfigdeckels gesteckt (Abb.34). Danach wird nach einem speziell erstellten Punkteschema (Tab.4) beurteilt, wie weit die Maus nach 3, 6 und 24 Stunden mit ihrem Nestbau gekommen ist. Zusätzlich wird nach 24 Stunden noch der Prozentsatz der Tücheranteile ermittelt, die nicht in das Käfiginnere gezogen worden ist.

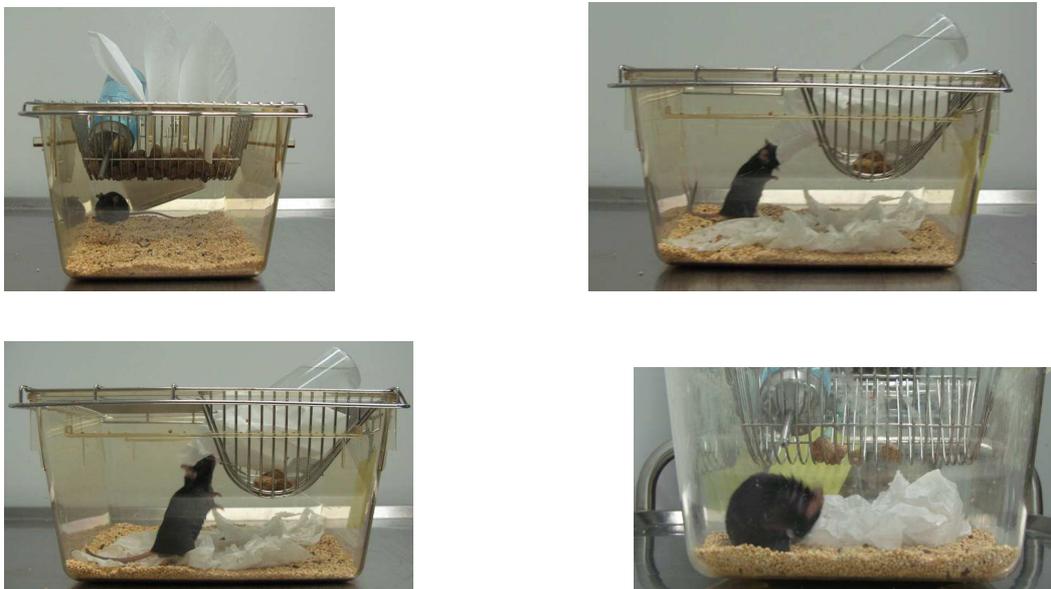


Abb.34 Die verschiedenen Phasen des Nestbaus.

Tab.4 Punkteschema zur Auswertung des Nestbaus.

Punkte	Auswertungskriterien
1	Tissues überhaupt nicht berührt
2	Tissues wenig hineingezogen, kein Nest* erkennbar
3	Tissues größtenteils hineingezogen, aber kein Nest* erkennbar
3.5	Tissues wenig hineingezogen, daraus Nest* gebaut
4	Tissues größtenteils hineingezogen, daraus Nest* gebaut
5	Tissues komplett hineingezogen, daraus perfektes Nest* gebaut

(\* Definition Nest: Tissues sind so angeordnet, dass sie von der Höhe mindestens so hoch wie die Maus sind und auf eine Fläche von ca.15 x 15cm<sup>2</sup> verteilt sind.)

### 2.2.3. Soziale Interaktion

In dieser Arbeit wird das Sozialverhalten gegenüber einer fremden, juvenilen, in Gruppen gehaltenen männlichen Maus getestet. Durch Benutzung einer neuen Testbox wird der Faktor des Revierverhaltens unterbunden.

#### **Apparatur/ Durchführung**

Der Test wird in einer 28,5 x 18,5cm<sup>2</sup> großen, durchsichtigen Plexiglasbox durchgeführt, deren Wand 20cm hoch ist. Einen Tag vor dem Test wird eine juvenile, sechs Wochen alte und in einer Gruppe gehaltene Maus fünf Minuten lang an die Testbox habituiert. Am Testtag wird die zu testende „NR1flox/DATCre-ERT2“-Maus fünf Minuten an die Plexiglasbox habituiert, und anschließend wird die juvenile Maus dazu gesetzt. Das Verhalten der zu testenden Maus gegenüber einer juvenilen Maus wird fünf Minuten lang über eine Panasonic-Videokamera aufgezeichnet und danach ausgewertet.

#### **Ausgewertete Parameter**

Das komplexe Sozialverhalten lässt sich in die Aspekte „social exploration“ (soziale Investigation), „contact behaviour“ (Kontaktverhalten) und „avoidance of interaction“ (Flucht- oder Vermeidungsverhalten) beziehungsweise „risk assessment behaviour“ (risikoabschätzendes Verhalten) klassifizieren.

#### **A) SOZIALE INVESTIGATION (*social exploration*)**

Als soziale Exploration wird das olfaktorische Erkunden durch Schnüffeln an sämtlichen Körperteile des fremden Sozialpartners gewertet. Hierunter fallen:

##### A.1) ANOGENITALKONTROLLE

**(*anogenital exploration*)** (Abb.35 A.1)

##### A.2) ERKUNDUNG DES NICHT-ANOGENITALBEREICHS

**(*non-anogenital exploration*)** (Abb.35 A.2)

##### A.3) VERFOLGEN

**(*approach/ follow*)** (Abb.35 A.3)



Abb.35 A.1



Abb.35 A.2

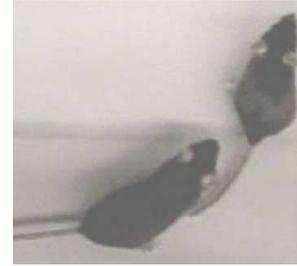


Abb.35 A.3

**B) KONTAKTVERHALTEN (*contact behaviour*)**

**B.1.) SOZIALE FELLPFLEGE (*social grooming*)** (Abb.36 B.1)

Das Putzen und Lecken des Fells des Partners zählt zur sozialen Fellpflege der Maus.

**B.2.) ÜBERKLETTERN (*crawl over*)** (Abb.36 B.2)

Die Maus klettert über ihren Sozialpartner hinweg, ein äußerst seltenes Verhalten.



Abb.36 B.1



Abb.36 B.2

**C) RISIKOABSCHÄTZENDES VERHALTEN (*risk assessment behaviour*)**

Defensive Verhaltensweisen sind als Ausdruck von Angst zu werten.

**C.1.) FLUCHT**

**(*evade*)** (Abb.37 C.1)

Der flüchtende wendet das Gesicht von dem angreifenden Sozialpartner ab und versucht sich durch Ausweichen vor Angriffen, vor allem auf sein Genick, zu schützen.

**C.2.) DURCHGESTRECKTE KÖRPERHALTUNG**

**(*stretched attention posture*)** (Abb.37 C.2)

Die flach gestreckte Körperhaltung ist eine typische Reaktion auf angstassoziierte Stimuli.



Abb.37 C.1



Abb.37 C.2

#### 2.2.4. Wiedererkennungstest (object recognition test)

Dabei unterscheidet man einerseits einen Test zur Analyse des Kurzzeitgedächtnisses, den Wiedererkennungstest nach 30 Minuten zwischen erster und zweiter Präsentation. Für das Langzeitgedächtnis nutzt man andererseits den Wiedererkennungstest nach 24 Stunden, wobei zwischen erster und zweiter Präsentation 24 Stunden liegen.

##### **Apparatur**

Der Test wird in den unter 2.2.1. beschriebenen „Tru scan-Boxen“ durchgeführt, in denen sich für die Tiere, je nach Test, bei der ersten Präsentation zwei gleiche (Abb.38; a1 und a2) und bei der zweiten Präsentation ein Objekt der ersten Präsentation (Abb.38; a) und ein für die Maus neues Objekt (Abb.38; b) befindet. Das Explorationsverhalten der Mäuse wird jeweils fünf Minuten aufgezeichnet und danach ausgewertet.

##### **Durchführung**

Einen Tag vor dem Versuchsbeginn wurden die Mäuse für jeweils eine halbe Stunde an die „Tru scan-Box“, ohne Objekte, habituiert (Abb.38; Habituation). Am Tag des Versuchs wurden zwei identische Objekte bei der so genannten ersten Präsentation, so in der Testbox platziert, dass sie der Maus von allen Seiten frei zugänglich waren (Abb.38; 1.Präsentation). Bei der zweiten Präsentation wurde der Maus ein bekanntes Objekt der ersten Präsentation und ein neues, unbekanntes Objekt zur Exploration angeboten (Abb.38; 2.Präsentation).

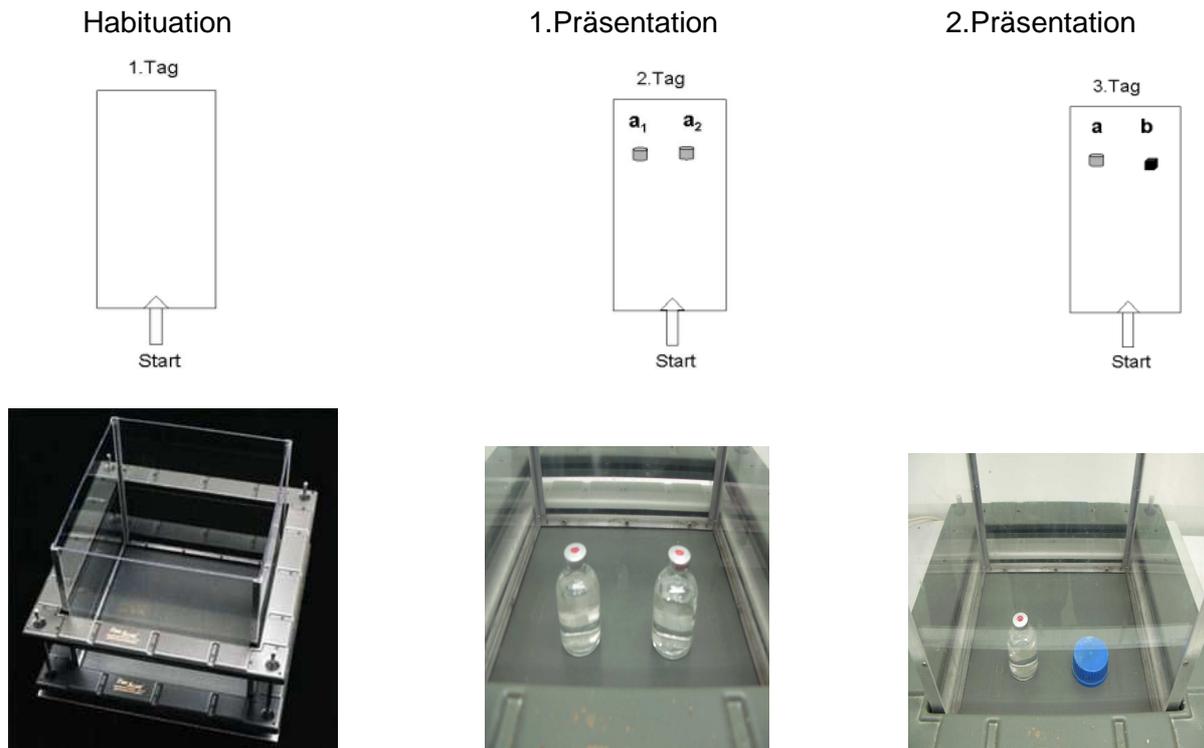


Abb.38 Versuchsablauf des selektiven Objektwiedererkennungstests.

Das Explorationsverhalten wird über fünf Minuten per Videokamera gefilmt und die einzelnen Parameter ausgewertet. Dabei wird jede Kontaktaufnahme der Maus mit dem Objekt als exploratives Verhalten gewertet.

Der Test gliedert sich dabei in zwei getrennte Versuchsabläufe mit verschiedenen Objekten und unterschiedlicher zeitlicher Pause zwischen der ersten und zweiten Präsentation.

### A.) selektiver Objektwiedererkennungstest nach 30 Minuten

Bei der ersten Präsentation (Abb.38, Habituation) können die Mäuse fünf Minuten lang zwei identische Glasflaschen (Abb.39, a<sub>1</sub> und a<sub>2</sub>) explorieren. Danach werden die Tiere in ihren Heimkäfig zurückgesetzt und in den Haltungsraum gebracht. Nach einer halben Stunde folgt für fünf Minuten die zweite Objektpräsentation (Abb.38, 1. Präsentation), bei der die Tiere die bekannte Glasflasche der ersten Präsentation (Abb.39, a) und eine unbekannte blaue Verschlusskappe (Abb.40, b) erkunden können.



Abb.39 1.Präsentation und 2.Präsentation  
„bekanntes Objekt“ (a1, a2, a)  
(50ml Injektionsflasche einer  
isotonischen Kochsalzlösung)



Abb.40 2.Präsentation  
„unbekanntes Objekt“ (b)  
(Blaue Verschlusskappe  
einer 500ml Glasflasche)

## B.) selektiver Objektwiedererkennungstest nach 24 Stunden

Bei der ersten Präsentation (Abb.38, 1.Präsentation) können die Mäuse fünf Minuten lang zwei identische „Tubes“ (Abb.41, a1 und a2) explorieren. Danach werden die Tiere in ihren Heimkäfig zurückgesetzt und in den Haltungsraum gebracht. Am nächsten Tag, vierundzwanzig Stunden nach der ersten Präsentation, folgt für fünf Minuten die zweite Objektpräsentation (Abb.38, 2.Präsentation), bei der die Tiere einen bekannten Tube der ersten Präsentation (Abb.41, a) und ein unbekanntes dosen- beziehungsweise korkenähnliches Objekt (Abb.42, b) erkunden können.



Abb.41 1.Präsentation und 2.Präsentation  
„bekanntes Objekt“ (a1, a2 und a)  
(50ml PP-Test Tubes der Firma  
Cellstar, mit Wasser gefüllt)



Abb.42 2. Präsentation  
„unbekanntes Objekt“ (b)  
(dosen- und korkenähnliches  
Objekt)

**Ausgewertete Parameter****A.) 1. PRÄSENTATION****A.1.) GESAMTZEIT DER OBJEKTEXPLORATION\* (Ennaceur et Delacour, 1988)**

Bildung der Summe der Zeiten, in der sich die Maus mit den Objekten „a1 und a2“ beschäftigt.

**A.2.) OBJEKTPRÄFERENZ**

Der Quotient ( $q_P$ ) aus den Explorationszeiten beider Objekte ( $a_1/a_2$ ) gibt an:

- wenn  $q_P = 1$  keine Objektpräferenz, beide Objekte werden gleich lang exploriert
- wenn  $q_P < 1$  Objektpräferenz für a2, Objekt a2 wird länger exploriert
- wenn  $q_P > 1$  Objektpräferenz für a1, Objekt a1 wird länger exploriert

**B.) 2. PRÄSENTATION****B.1.) GESAMTZEIT DER OBJEKTEXPLORATION**

Bildung der Summe der Zeiten, in der sich die Maus mit den Objekten „a und b“ beschäftigt.

**B.2.) OBJEKTWIEDERERKENNUNG****B.2.1.) DISKRIMINATIONSSINDEX (*discrimination index*)**

Die Differenz ( $q_D$ ) der Explorationszeiten beider Objekten ( $b - a$ ) gibt an:

- wenn  $q_D = 1$  keine Wiedererkennung, beide Objekte werden gleich lang exploriert
- wenn  $q_D < 1$  keine Wiedererkennung, Objekt a wird länger exploriert
- wenn  $q_D > 1$  Wiedererkennung, Objekt b wird länger exploriert

**B.2.2.) OBJEKTDISKRIMINIERUNG IN PROZENT**

Der Quotient aus der Exploration des neuen Objektes (b) und der Gesamtzeit der Objektexploration bei der 2. Präsentation multipliziert mit dem Faktor 100 ( $q\%$ ).

- wenn  $q\% = 50$  keine Wiedererkennung, beide Objekte werden gleich lang exploriert
- wenn  $q\% < 50$  keine Wiedererkennung, Objekt a wird länger exploriert
- wenn  $q\% > 50$  Wiedererkennung, Objekt b wird länger exploriert

(\* Als Objektexploration wird jede Kontaktaufnahme der Maus mit dem Objekt, wie beispielsweise Schnüffeln oder Lecken, gewertet.)

### B.2.3.) DISKRIMINATIONSRATE (*discrimination ratio*)

Der Quotient aus Diskriminationsindex und der Gesamtexplorationszeit während der 2. Präsentation (qR).

→ wenn  $qR = 0$  keine Wiedererkennung, beide Objekte werden gleich lang exploriert

→ wenn  $qR < 0$  keine Wiedererkennung, Objekt a wird länger exploriert

→ wenn  $qR > 0$  Wiedererkennung, Objekt b wird länger exploriert

## 2.2.5 Emotionales Verhalten

### 2.2.5.1 Erhöhtes Plus-Labyrinth (*elevated plus-maze*)

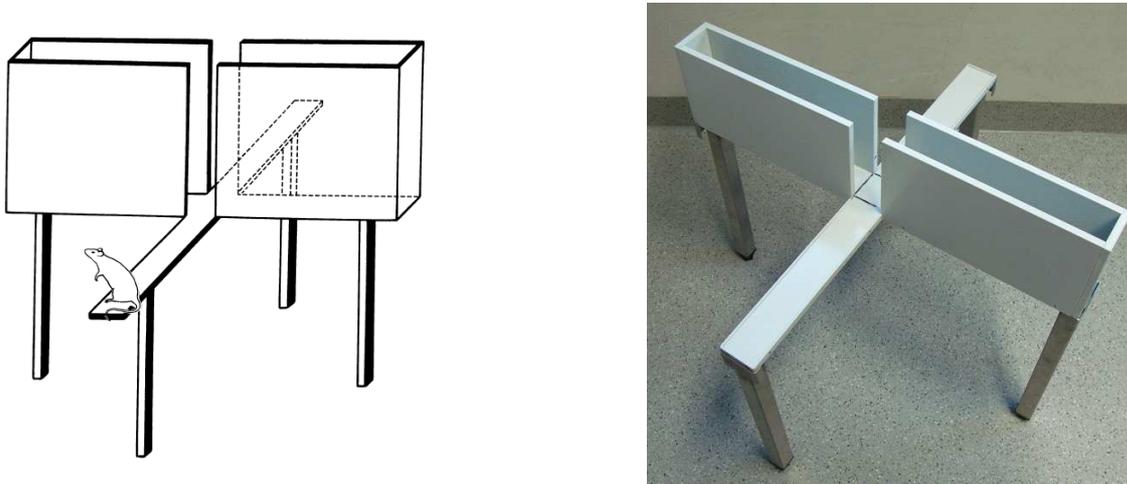


Abb.43 Das erhöhte Plus-Labyrinth (links: schematisch; rechts: Originalbild).

#### **Apparatur**

Das „elevated plus-maze“ (Abb.43) ist ein in der Verhaltensforschung zur Bestimmung von explorationsbedingtem, unconditioniertem, angstassoziiertem Verhalten bei Nagetieren weit verbreitete Testapparatur. Der Aufbau für Mäuse besteht aus vier im rechten Winkel verbundenen Armen mit einer Länge von 30cm und einer Breite von 5cm, sowie einer zentralen quadratischen Fläche von  $5 \times 5\text{cm}^2$  (neutrale Zone), der Abstand vom Boden beträgt 42cm. Zwei gegenüberliegende Arme werden jeweils von drei Seiten mit einer Wand von einer 15cm Höhe und 2cm Breite umgeben, nur zur neutralen Zone hin sind sie offen (geschlossene Arme), die anderen beiden Arme (offene Arme) sind lediglich an drei Seiten von einer 0,25cm hohen Umrandung umgeben. Das erhöhte Labirynth befindet sich in einem schallarmen Raum bei einer Beleuchtungsstärke von 100lux.

## Durchführung

Zu Beginn des Versuchs wurde die Maus so platziert, dass sie in den „offenen Arm“ hinein lief. Die Maus wird für fünf Minuten gefilmt, und anschließend werden verschiedene Parameter zur Beurteilung des Angstverhaltens ausgewertet.

## Ausgewertete Parameter

### A) ANGSTBEZOGENES VERHALTEN

#### A.1) ANZAHL DER EINTRITTE IN DEN „OFFENEN ARM“

Alle vier Füße der Maus müssen sich im „offenen Arm“ befinden.

#### A.2) ANZAHL DER EINTRITTE IN DEN „GESCHLOSSENEN ARM“

Alle vier Füße der Maus müssen sich im „geschlossenen Arm“ befinden.

#### A.3) GESAMTZEIT IM „OFFENEN ARM“

Die Zeit in Sekunden, die die Maus während der fünfminütigen Testphase im „offenen Arm“ verbracht hat.

#### A.4) GESAMTZEIT IM „GESCHLOSSENEN ARM“

Die Zeit in Sekunden, die die Maus während der fünfminütigen Testphase im „geschlossenen Arm“ verbracht hat.

### B) RISIKOABSCHÄTZENDES VERHALTEN

#### B.1) RISIKOBEWERTUNG (*risk assessment*)

Das Strecken des Kopfes in den „offenen Arm“, ohne dass alle vier Füße sich im „offenen Arm“ befinden.

### C) NEUGIER

#### C.1) HINUNTERBEUGEN DES KOPFES (*head dip*)

Häufigkeit des deutlichen Hinunterbeugens des Kopfes in die Tiefe über die Ränder der „offenen Arme“.

Aus diesen ausgewerteten Parametern werden die klassischen, charakteristischen Kenngrößen für das Angstverhalten errechnet:

#### 1.) PROZENTUALER ANTEIL DER EINTRITTE IN DEN „OFFENEN ARM“

Prozentualer Anteil der Eintritte in den „offenen Arm“ an der Gesamtzahl der Eintritte in den „geschlossenen Arm“ und „offenen Arm“.

- 2.) PROZENTUALER ANTEIL DER EINTRITTE IN DEN „GESCHLOSSENEN ARM“  
Prozentualer Anteil der Eintritte in den „geschlossenen Arm“ an der Gesamtzahl der Eintritte in den „geschlossenen Arm“ und „offenen Arm“.

### 2.2.5.2 Hell-Dunkel-Box (*light-dark-emergence test*)

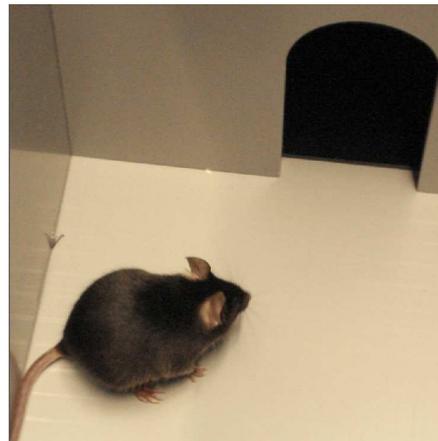


Abb.44 Hell-Dunkel-Box: Test bezüglich unkonditionierten Angstverhaltens.

#### **Apparatur**

Die Testbox besteht aus zwei Kompartimenten, die über einen Durchgang verbunden sind. Der größere, hellere Bereich ist 30 x 20cm<sup>2</sup> groß. Die Wandhöhe beträgt 30cm und die Wandstärke liegt bei 1cm. Der Durchgang in das kleinere, dunklere Areal ist 5cm breit und 10cm hoch. Der dunklere Bereich ist mit 15 x 20cm<sup>2</sup> kleiner. Auch hier beträgt die Wandhöhe 30cm. Die Decke des dunklen Areals wird durch einen 16 x 21cm<sup>2</sup> großen abnehmbaren Deckel gebildet. Die Lichtintensität liegt im hellen Boxenteil bei 100lux, im dunklen Areal bei 30lux.

#### **Durchführung**

Der Durchgang wird zu Beginn mit einer nach oben entfernbaren dunkelgrauen Kunststoffplatte verschlossen. Der Deckel des dunkleren Boxenbereichs wird geöffnet und die Maus darin platziert. Danach wird der Durchgangsbereich durch das Hochziehen der Platte frei gegeben. Die Maus wird für fünf Minuten gefilmt, und anhand der Aufnahme werden verschiedene Parameter zur Beurteilung des Angstverhaltens ausgewertet.

**Ausgewertete Parameter****A) ANGSTBEZOGENES VERHALTEN:****A.1) ANZAHL DER EINTRITTE IN DEN „HELLEN BEREICH“ (*frequency*)**

Alle vier Füße der Maus müssen sich im „hellen Areal“ befinden.

**A.2) AUFENTHALTSDAUER IM „HELLEN BEREICH“ (*duration*)**

Die Gesamtzeit in Sekunden, die die Maus während der fünf minütigen Testphase im „hellen Areal“ verbringt.

**A.3) LATENZ**

Zeitspanne, die vergeht, bis die Maus sich das erste Mal mit allen vier Füßen im „hellen Kompartiment“ befindet.

**A.4) RISIKOBEWERTUNG (*risk assessment*)**

Das Strecken des Kopfes in den „hellen Bereich“, ohne dass alle vier Füße sich im „hellen Areal“ befinden.

**A.5) KEINE EINTRITTE IN DEN HELLEN BEREICH (*no entry*)**

Falls die Maus den „hellen Bereich“ überhaupt nicht betritt, wird ihr der Wert 1 zugewiesen. Tiere, die den „hellen Bereich, egal wie oft, betreten, bekommen den Wert 0 zugewiesen.

**B) EXPLORATIONSVERHALTEN****B.1) AUFRICHTEN (*rearing*)**

Die Häufigkeit des deutlichen Aufrichtens der Maus auf die Hinterfüße, wobei sich beide Vorderbeine vom Boden gelöst haben müssen.

## 2.2.6 Präpulsinhibition (*PPI*) der akustisch ausgelösten Schreckreaktion (*ASR*)



Abb.45 A Test Box.



Abb.45 B Testzylinder.

### Apparatur

Das SR-LAB besteht neben der Software zur Steuerung der einzelnen Startle-Elementen und zur Datenanalyse aus folgenden Komponenten:

#### 1.) "TESTBOX" (*isolation cabinet*) (Abb.45 A)

Dabei handelt es sich um eine Box mit eigener Licht- und Luftversorgung. Jegliche Störfaktoren (Geräusche und Vibrationen aus der Umgebung) werden von der Box durch Schalldämpfung abgeschirmt. Die Box hat eine Grundfläche von 29 x 30,5cm<sup>2</sup>, und eine Höhe von 24cm. Während des Tests ist es in der Box dunkel, und die akustischen Stimuli werden durch eingebaute Lautsprecher präsentiert.

#### 2.) "TESTZYLINDER" (*animal enclosure*) (Abb.45 B)

Die Röhre, die eine stressfreie Fixierung des Tieres ermöglicht, besteht aus einer 13cm langen und 3,8cm hohen durchsichtigen Plexiglasröhre. Durch Schieber lässt sich die Röhre auf eine Länge von 10,5cm, 8,5cm oder wie in diesem Versuch 6,5cm einstellen, so dass sie der Maus individuell angepasst werden kann. Die Röhre ist auf einer 21 x 13cm<sup>2</sup> großen Platte fixiert, über deren Sensor am Boden Vibrationen durch Bewegungen der Maus mittels eines piezoelektrischen Akzelerometers über einen Analog-Digital-Wandler an den Computer geleitet werden, die zur Berechnung der PPI-Parameter benötigt werden.

## Durchführung

Nachdem die Maus in der Teströhre „fixiert“ wurde, wird die Röhre mittels eines Kabels an die Testbox angeschlossen. Danach wird die Tür der Testbox geschlossen und das Testprogramm gestartet. Dieses beginnt mit einer fünfminütigen Eingewöhnungsphase, in der die Maus keinen weiteren Stimulus außer dem Hintergrundrauschen mit einer Intensität von 55dB sound pressure level (SPL) erhält. Direkt im Anschluss an diese Habituationsphase startet das Testprogramm, dabei wird die Schreckreaktion der Maus anhand der Vibration gemessen. Das Testprogramm besteht aus sechs verschiedenen Trials, die der Testmaus pseudorandomisiert je 10mal dargeboten werden. Die Zeit zwischen den einzelnen Trails wurde zwischen 20.000 und 30.000ms randomisiert, die sechs verschiedenen Trails sind dabei wie folgt aufgebaut:

1. **TRIAL:** Schreckreiz von 110dB SPL für die Dauer von 40ms.
2. **TRIAL:** Kontrolle, kein akustischer Reiz, nur Hintergrundrauschen.
3. **TRIAL:** Präpuls von 10kHz und 74db SPL für die Dauer von 20ms, nach einer 20ms langen Pause erfolgt der Schreckreiz (Beschreibung 1.TRIAL).
4. **TRIAL:** Präpuls von 10kHz und 70db SPL für die Dauer von 20ms, nach einer 20ms langen Pause erfolgt der Schreckreiz (Beschreibung 1.TRIAL).
5. **TRIAL:** Präpuls von 10kHz und 66db SPL für die Dauer von 20ms, nach einer 20ms langen Pause erfolgt der Schreckreiz (Beschreibung 1.TRIAL).
6. **TRIAL:** Präpuls von 10kHz und 62db SPL für die Dauer von 20ms, nach einer 20ms langen Pause erfolgt der Schreckreiz (Beschreibung 1.TRIAL).

## Gemessene Parameter

### 1.) AMPLITUDE DER AKUSTISCH AUSGELÖSTEN SCHRECKREAKTION

#### **(ASR-Amplitude)**

Wert, der von dem SR-Lab Datenanalyseprogramm aus der Schreckreaktion der Maus anhand der Vibration ermittelt wird.

### 2.) PROZENTUALE REDUKTION DER ASR-AMPLITUDE

#### **(PPI [%])**

Die Abschwächung, der in 1.) ermittelten ASR-Amplitude durch einen zuvor Präsentierten Präpuls wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{PPI [\%]} = 100 - (\text{Amplitude der ASR mit Präpuls} / \text{Amplitude der ASR}) * 100$$

### 3. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der durchgeführten Verhaltenstests werden im Einzelnen statistisch oder graphisch dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte der erhobenen Daten inklusive deren Standardfehler (+S.E.M.). Die Daten der Tests werden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms EXCEL® (Microsoft, USA) aufgezeichnet. Anhand des Student's t-Test erfolgte ein paarweiser Vergleich der Mittelwerte. Bei den jeweiligen Testverfahren wurden Unterschiede dann als signifikant bewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  (graphisch als ★ dargestellt) betrug, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,1$  liegt hingegen lediglich ein Trend vor. Die deskriptive Statistik erfolgt durch die Berechnung von Mittelwerten und deren Standardfehlern (+/- S.E.M.).

#### 3.1 Gewicht

Bei der Ermittlung des Gewichts im Alter von circa 10 Monaten (Abb.46) zeigten die „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten im Vergleich zu ihren Wildtypen ein signifikant vermindertes Körpergewicht (Student's t-Test;  $p = 0,0046$ ).

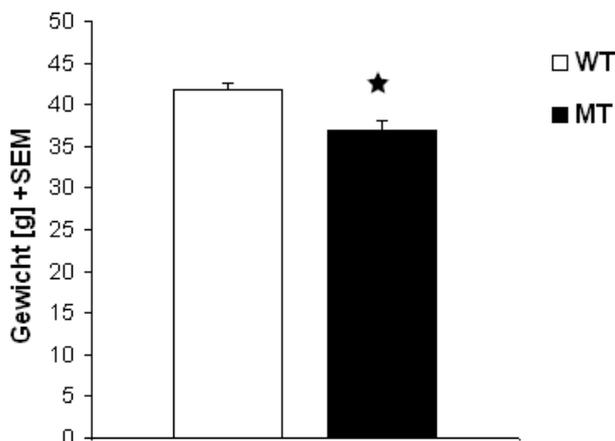


Abb.46 Die Mausmutanten (MT: n=11) zeigten im Vergleich zu ihren gleichaltrigen Tamoxifen-Wildtypkontrollen (WT: n=12) ein signifikant vermindertes Körpergewicht (Mittelwert + S.E.M.).

### 3.2 Lokomotorische Aktivität

Die Mausmutanten „DATCreERT2-NR1“ (MT) mit der induzierbaren Gendelektion der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 des Dopamintransporters zeigten signifikante Beeinträchtigungen in einigen der in der Aktivitätsbox getesteten Verhaltensweisen im Verhältnis zu ihren getesteten tamoxifenbehandelten Wildtypkontrollen (WT), wobei sie insgesamt eine verminderte motorische Aktivität aufwiesen.

Der Student's t-Test zeigt einen signifikanten Unterschied in der Aktivitätszeit ( $p=0,0082$ ) im Vergleich der MTs zu den WTs (Abb.47). Auch die zurückgelegte Strecke in der Aktivitätsbox und die Eintritte in das Zentrum sind im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erniedrigt (zurückgelegte Strecke:  $p=0,0050$ , Abb.48; Zentrumseintritte:  $p=0,0344$ , Abb.49).

Die „DATCreERT2-NR1“ Mäuse zeigten bei dem Aufenthalt im Zentrum der Aktivitätsbox ähnliche Werte wie ihre Wildtypkontrollen (Student's t-Test,  $p=0,9339$ ; Daten nicht gezeigt).

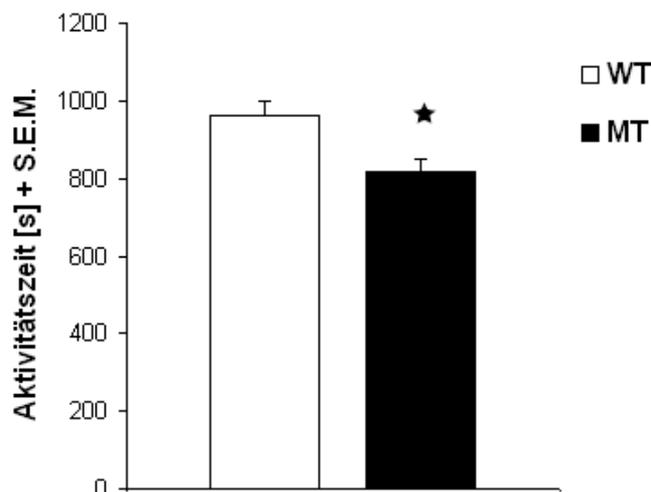


Abb.47 Die Mutanten (MT:  $n=11$ ) zeigen gegenüber den Wildtypen (WT:  $n=12$ ) eine signifikante Verminderung in ihrer Aktivitätszeit in Sekunden (Mittelwert + S.E.M.).

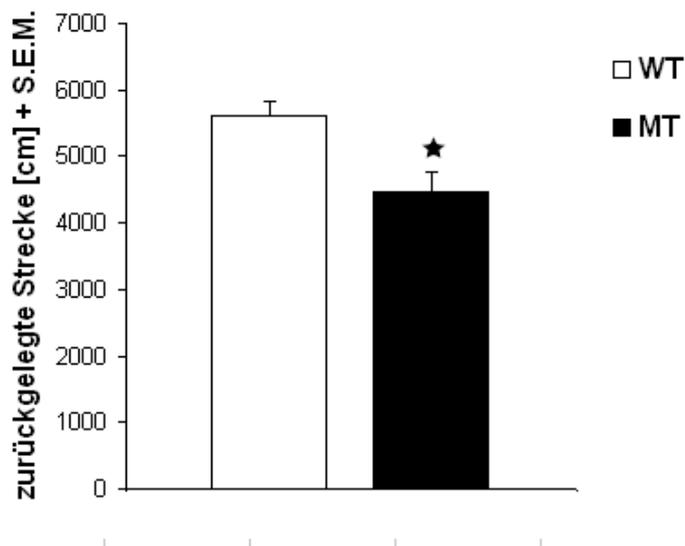


Abb.48 Die Mutanten (MT: n=11) zeigen gegenüber den Wildtypen (WT: n=12) einen signifikanten Unterschied bei der zurückgelegten Strecke in cm (Mittelwert + S.E.M.).

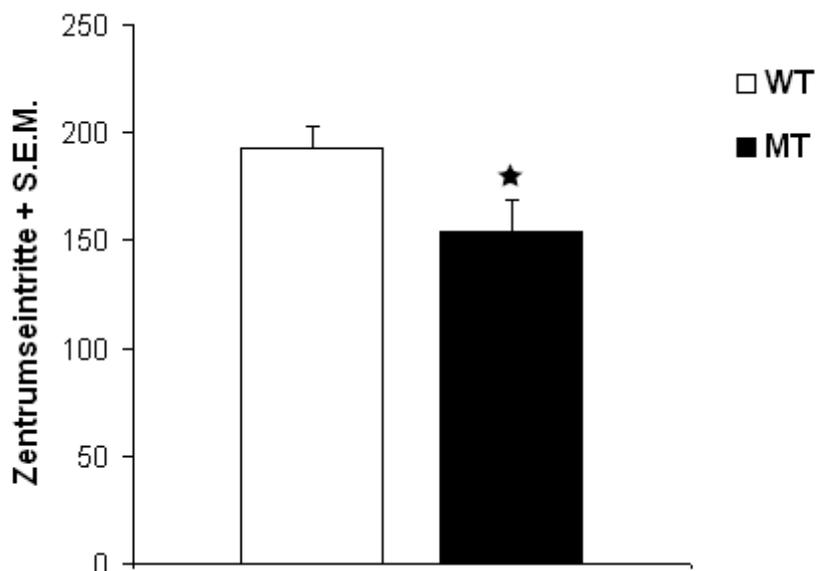


Abb.49 Die Mutanten (MT: n=11) zeigen gegenüber den Wildtypen (WT: n=12) eine signifikante Reduktion bei den Eintritten in das Zentrum der Aktivitätsbox (Mittelwert + S.E.M.).

### 3.3 Nestbauverhalten

Bei einem Vergleich der verschiedenen Phasen des Nestbaus zeigen die Mutanten im Vergleich zu ihren Wildtypkontrollen zu den jeweiligen Beurteilungszeitpunkten ein signifikant vermindertes Nestbauverhalten, ebenso wie eine Reduktion des Anteils an manipuliertem

Nestmaterial in Bezug auf die angebotenen Tissues. Im Abstand von 3, 6 und 24 Stunden wurden anhand eines Punkteschemas das Nestbauverhalten bezüglich der manipulierten Tissueanteile und der Stärke der Manipulation für den Nestbau bewertet. Die Mutanten zeigten gegenüber den Wildtierkontrollen bezüglich aller drei bewerteten Zeitpunkte eine signifikante Reduktion des Nestbauverhaltens in der Nestbaupunkteverteilung (Student's t-Test nach 3 Stunden:  $p=0,00007$ ; nach 6 Stunden:  $p=0,00003$  und nach 24 Stunden:  $p=0,00560$ , Abb.50).

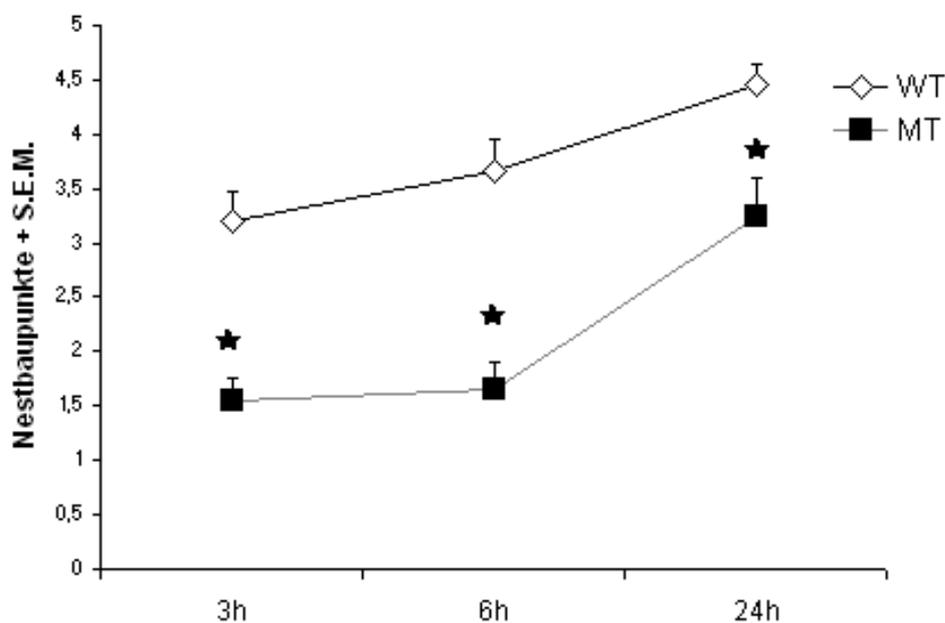


Abb.50 Die Mutanten (MT: n=11) zeigen gegenüber den Wildtypen (WT: n=12) einen signifikanten Unterschied während der einzelnen Nestbauphasen nach 3, 6 und 24 Stunden in den ermittelten Nestbaupunkten (Mittelwert + S.E.M.).

Zusätzlich zu dem Punkteschema wurde das Nestbauverhalten an Hand der Tissueanteile, die nicht manipuliert wurden und sich noch so wie zu Versuchsbeginn außerhalb des Käfiginneren in den Käfigdeckelgitterstäben befanden, prozentual beurteilt. Die Mutanten „DATCreERT2-NR1“ (Student's t-Test:  $p=0,00272$ ) zeigten auch hier ein vermindertes Nestbauverhalten in Form einer signifikanten Erhöhung des unmanipulierten Nestmaterials in den Käfigdeckelgitterstäben (Abb.51). Während sich bei den „DATCreERT2-NR1“ Mäusen unterschiedlich viel Nistmaterial nach 24 Stunden unmanipuliert außerhalb des Käfigs befand, hatten alle Wildtypen das gesamte Nistmaterial in das Käfiginnere gezogen.

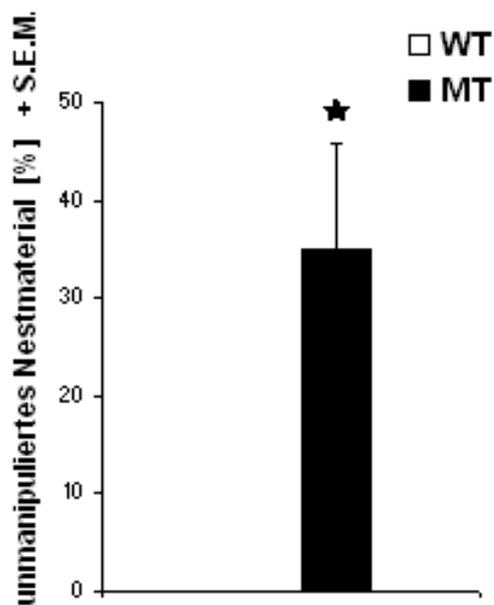


Abb.51 Die Mutanten (MT: n=11) zeigen gegenüber den Wildtypen (WT: n=12) eine signifikante Erhöhung des prozentualen Anteils an unberührtem Nestmaterial (Mittelwert + S.E.M.).

### 3.4 Soziale Interaktion

Die einzelnen Verhaltensparameter der sozialen Interaktion zwischen zwei Mäusen sind bei den Mutanten im Vergleich zu deren Wildtypkontrollen in den drei Bereichen Explorations-, Kontakt- und angstassoziiertem Verhalten signifikant verändert.

Im Explorationsverhalten (Abb.52) zeigen die „DATCreERT2-NR1“ Mausmutanten ein signifikante vermindertes Explorationsverhalten sowohl im gesamten Explorationsverhalten (Student's t-Test:  $p=0,0015$ ), als auch in den Einzelbereichen der anogenitalen Exploration (Student's t-Test:  $p=0,0037$ ), der non-anogenitalen Exploration (Student's t-Test:  $p=0,0022$ ), sowie dem Folgeverhalten (Student's t-Test:  $p=0,0015$ ).

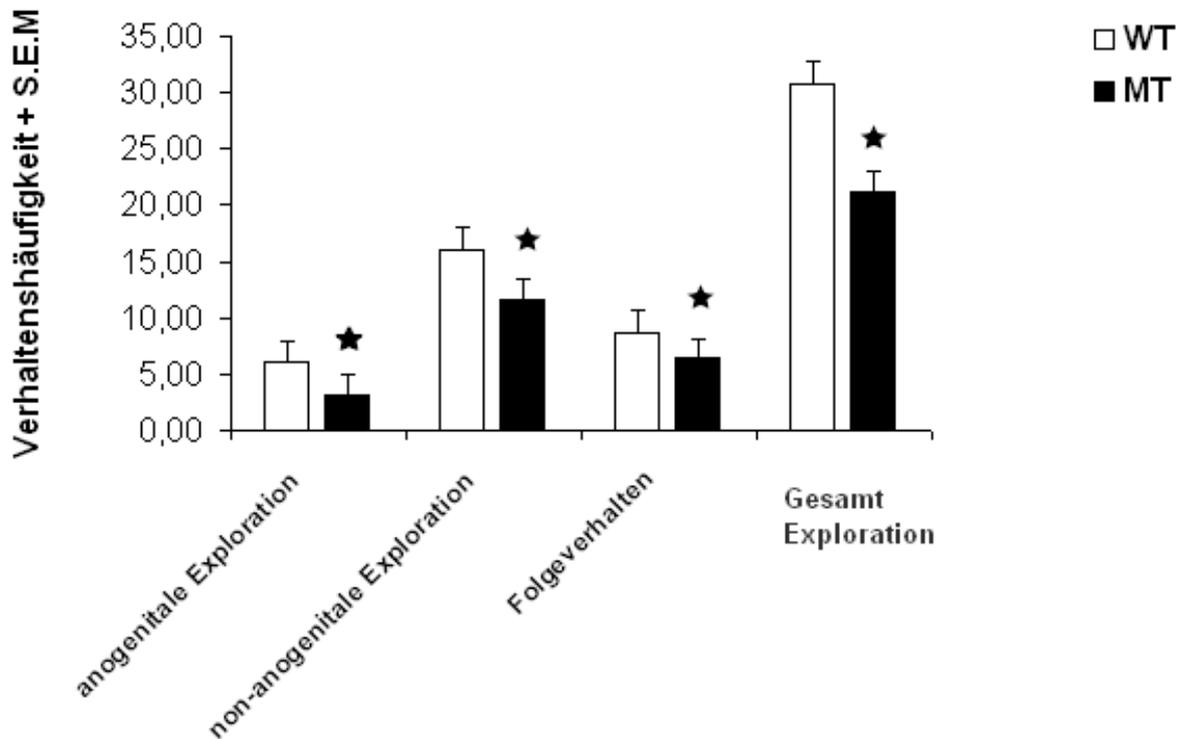


Abb.52 Die Mutanten (MT: n=11) zeigen gegenüber den Wildtypen (WT: n=12) eine signifikante Reduktion des Gesamtexplorationsverhaltens als auch der Einzelbereiche des Explorationsverhaltens (Mittelwert + S.E.M.).

Im zweiten Bereich, dem Kontaktverhalten zum Sozialpartner, zeigen die Mausmutanten ebenfalls eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den Wildtypkontrollen im gesamten Kontaktverhalten (Student's t-Test:  $p=0,0046$ ) und dem Verhalten des Überkletterns (Student's t-Test:  $p=0,0360$ ). Der Vergleich der Mutanten und Wildtypkontrollen im Kontaktverhalten des gegenseitigen Putzens beziehungsweise der sozialen Fellpflege (Student's t-Test:  $p=0,1711$ ) erbrachte keinen signifikanten Unterschied. Da die beiden Einzelverhalten des Überkletterns und des sich gegenseitigen Putzens nur äußerst selten beobachtet wird, fasst man die beiden Verhaltensweisen als so genanntes Gesamtkontaktverhalten zusammen.

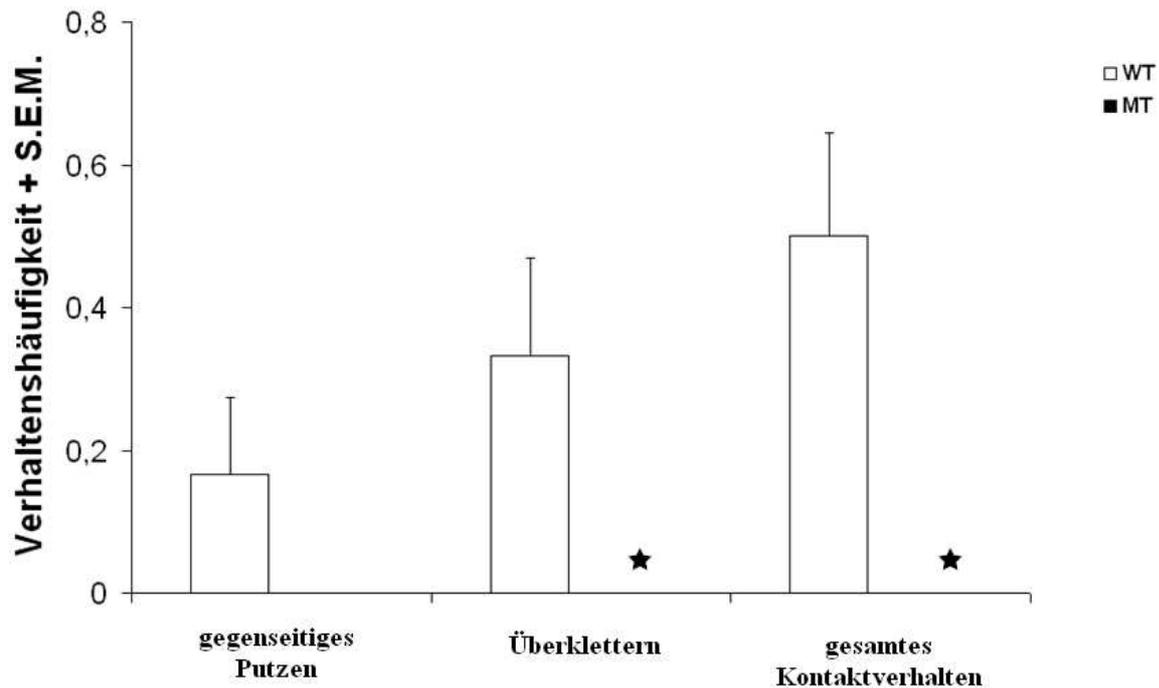
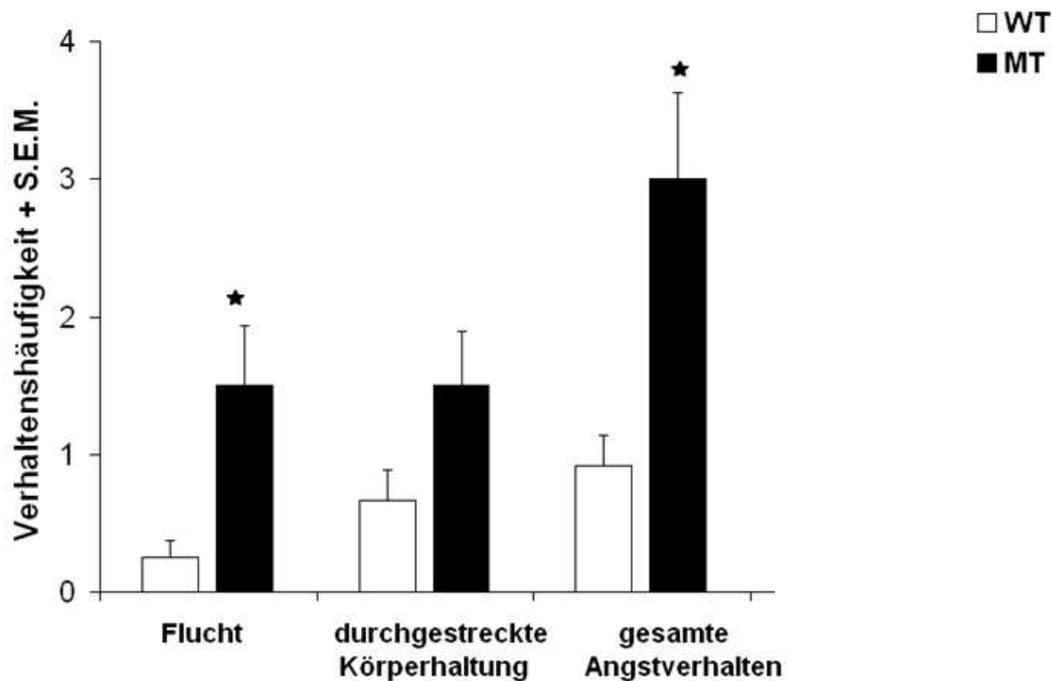


Abb.53 Die Mutanten (MT: n=11) zeigen gegenüber den Wildtypen (WT: n=12) eine signifikante Reduktion des Gesamtkontaktverhaltens, als auch im Bereiche des Überkletterns (Mittelwert + S.E.M.).

Fasst man die beiden Bereiche Explorations- und Kontaktverhalten zusammen, zeigt sich in dem als Gesamtsozialverhalten bezeichneten Bereich ebenfalls eine signifikante Reduktion (Student's t-Test:  $p=0,0010$ ; Daten nicht gezeigt) der Mausmutanten im Vergleich zu ihren Wildtypkontrollen.

Der letzte untersuchte Bereich des sozialen Interaktionsverhaltens zwischen zwei Mäusen, dem risikoabschätzenden beziehungsweise angstassoziierten Verhalten (Abb.54), zeigt wiederum eine signifikante Erhöhung bei den Mutanten sowohl im gesamten Angstverhalten (Student's t-Test:  $p=0,0113$ ) als auch im Fluchtverhalten (Student's t-Test:  $p=0,0279$ ) bezüglich deren Wildtypkontrollen. Die Mutanten zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede in der durchgestreckten Körperhaltung (Student's t-Test:  $p=0,1008$ ).



**Abb.54** Die Mutanten zeigen gegenüber den Wildtypen eine signifikante Erhöhung des gesamten Angstverhaltens und des Fluchtverhaltens. Bei der durchgestreckten Körperhaltung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen MT und WT (Mittelwert + S.E.M.).

### 3.5 Wiedererkennungstest (object recognition test)

Die Daten des Objektwiedererkennungstests wurden mittels einer Zwei-Faktoren Varianzanalyse untersucht.

Dabei ergab die Untersuchung der Explorationszeiten bei der 1. Präsentation zwischen den beiden identischen Objekten a1 und a2 als auch zwischen den „DATCreERT2-NR1“ Mausmutanten und deren Wildtypenkontrollen keinerlei Unterschiede (Student'st-Test:  $p > 0,05$ ; Tab. 5, Tab. 6), allerdings mussten die Versuchsdaten eines Tieres der Mutantengruppe bei dem Objektwiedererkennungstest nach 30 Minuten aus der Studie herausgenommen werden, da sie bei der initialen ersten Objektpräsentation keinerlei Explorationsverhalten zeigte.

Bei der Objektwiedererkennung nach 30 Minuten und 24 Stunden zeigen die Mausmutanten bei der 2. Präsentation einen signifikanten Unterschied, das bekannte Objekt weniger zu erkunden als die Mäuse der Wildtypkontrolle (bei 30 Minuten im Student's t-Test:  $p = 0,0481$ ,

Abb.55 und Abb.56; bei 24 Stunden im Student's t-Test:  $p=2,6425$ , Abb.57 und Abb.58). Die Explorationszeiten der unbekannt Objekte und die Gesamtexplorationszeit sind bei allen Mäusen annähernd identisch (Student's t-Test:  $p>0,05$ ; Daten nicht gezeigt).

### A) ERGEBNISSE DER SELEKTIVEN OBJEKTWIEDERERKENNUNG NACH 30 MINUTEN

Der Diskriminationsindex (Abb.55) zeigt, dass die Mäuse der Mutantengruppe mit einem Diskriminationsindexmittelwert von  $qD=1,98$  ebenso wie ihre Wildtypenkontrolle  $qD=5,92$  das bekannte Objekt länger als das Unbekannte erkunden. Der Vergleich der Mutantengruppe mit den Wildtypen zeigt dabei eine signifikante Reduktion des Diskriminationsindex der Mutantengruppe im Vergleich zu den Wildtypen (Student's t-Test:  $p=0,0481$ ).

Tab. 5 Vergleich der Explorationszeiten von Mutanten (MT:  $n=10$ ) und Wildtypen (WT:  $n=12$ ) für die identischen Objekte a1 und a2 bei der 1.Präsentation (Mittelwert + S.E.M.).

Objekt	Mutanten		Wildtypen	
	a1	a2	a1	a2
Mittelwert	3.83	4.43	3.89	4.94
Standartfehler	0.64	0.56	0.44	0.45

Sowohl bei der Diskriminationsrate als auch bei der prozentualen Objektdiskriminierung (Abb.56) wird nicht alleine der Explorationsunterschied wie bei dem Diskriminationsindex (Abb.55) ermittelt, sondern dieser Wert auch noch in das Verhältnis zum allgemeinen Explorationsverhalten der 2. Präsentation gesetzt.

Der Vergleich der Mutanten gegenüber ihren Wildtypkontrollen zeigt dabei eine signifikant erhöhte prozentuale Objektdiskriminierung der Mausmutanten (Student's t-Test:  $p=0,0072$ , Abb.56), als auch der Diskriminationsrate (Student's t-Test:  $p=0,0072$ ).

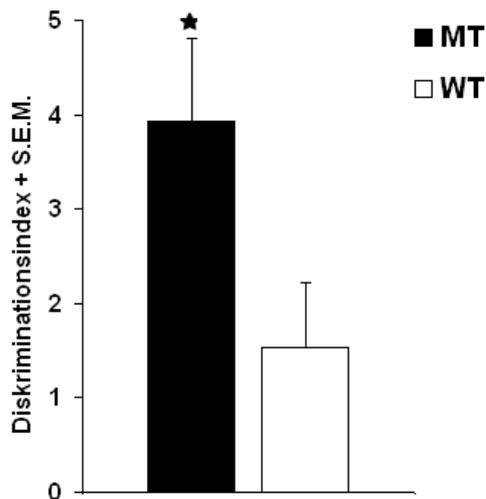


Abb.55 Vergleich des Diskriminationsindex der Mutanten (MT: n=10) und Wildtypen (WT: n=12) bei der 2.Objektpräsentation nach 30 Minuten (Mittelwert + S.E.M.).

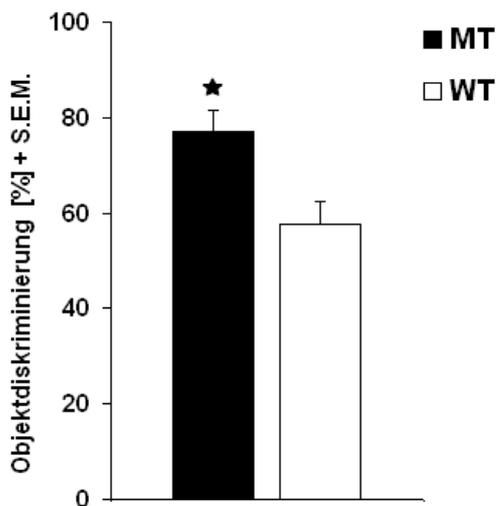


Abb.56 Vergleich der prozentualen Objektdiskriminierung [%] der Mutanten (MT: n=10) und Wildtypen (WT: n=12) bei der 2.Objektpräsentation nach 30 Minuten (Mittelwert + S.E.M.).

## B) ERGEBNISSE DER SELEKTIVEN OBJEKTWIEDERERKENNUNG NACH 24 STUNDEN

Anhand des Diskriminationsindex (Abb.57) lässt sich erkennen, dass die Mäuse der Mutantengruppe mit einem Diskriminationsindexmittelwert von  $qD=1,29$  das bekannte Objekt länger als das unbekannte erkunden, im Gegensatz zu den Wildtypkontrollen, die das unbekannte Objekt bei der zweiten Präsentation länger explorieren

(Diskriminationsindexmittelwert vom  $qD=-0,37$ ). Der Vergleich der beiden Gruppen gibt dabei eine signifikante Reduktion des Diskriminationsindex der Mutantengruppe im Vergleich zu den Wildtypen an (Student's t-Test:  $p=0,0073$ ).

Tab. 6 Vergleich der Explorationszeiten von Mutanten (MT:  $n=10$ ) und Wildtypen (WT:  $n=12$ ) für die identischen Objekte a1 und a2 bei der 1. Präsentation (Mittelwert + S.E.M.).

Objekt	Mutanten		Wildtypen	
	a1	a2	a1	a2
Mittelwert	2.67	2.64	2.62	2.53
Standardfehler	0.69	0.50	0.32	0.36

Sowohl bei der Diskriminationsrate als auch bei der prozentualen Objektdiskriminierung (Abb.58) wird nicht alleine der Explorationsunterschied wie bei dem Diskriminationsindex ermittelt, sondern dieser Wert auch noch in das Verhältnis zum allgemeinen Explorationsverhalten bei der 2. Präsentation gesetzt.

Der Vergleich der „DATCreERT2-NR1“ Mausmutanten gegenüber ihren Wildtypkontrollen zeigt dabei eine signifikant erhöhte prozentuale Objektdiskriminierung der Mausmutanten (Student's t-Test:  $p=0,0017$ , Abb.58), als auch der Diskriminationsrate (Student's t-Test:  $p=0,0017$ ).

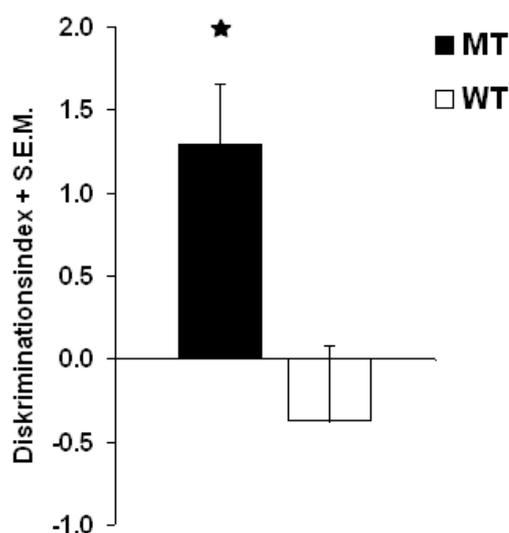


Abb.57 Vergleich des Diskriminationsindex der Mutanten (MT:  $n=10$ ) und Wildtypen (WT:  $n=12$ ) bei der 2.Objektpräsentation nach 24 Stunden (Mittelwert + S.E.M.).

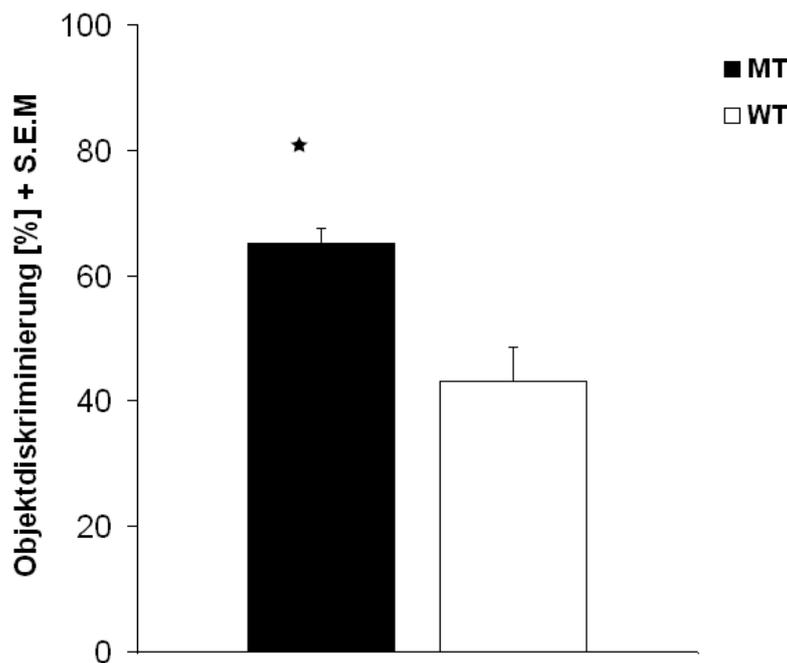


Abb.58 Vergleich der prozentualen Objektdiskriminierung [%] der Mutanten (MT: n=10) und Wildtypen (WT: n=12) bei der 2.Objektpräsentation nach 24 Stunden (Mittelwert + S.E.M.).

### 3.6 Emotionales Verhalten

#### 3.6.1 Erhöhtes Plus-Labyrinth (*elevated plus-maze*)

Bei diesem unkonditionierten, angstassoziierten Verhaltenstest zeigen erwartungsgemäß beide Gruppen eine deutliche Explorationspräferenz für die „geschlossenen“ Arme. Ein Tier aus der Gruppe der Mutanten sprang nach einer Minute von der Testapparatur, so dass seine Daten nicht für diesen Test verwendet werden konnten. Im Gesamtexplorationsverhalten und bei der Erkundung der „offenen“ Arme, die in beiden Gruppen circa 1% der gesamten Explorationszeit ausmachte, kann zwischen den „DATCreERT2-NR1“ Mausmutanten und deren Wildtypkontrollen kein Unterschied festgestellt werden (Studentt's t-Test:  $p > 0,05$ ; Daten nicht gezeigt), wohingegen der Aufenthalt in den „geschlossenen“ Armen einen Trend (Student's t-Test;  $p = 0,0688$ , Abb.59) der Mutanten zeigt, diese Arme im Vergleich zu ihren Wildtypkontrollen verstärkt aufzusuchen. Die anderen untersuchten Parameter des angstbezogenen Verhaltens weisen keinerlei Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen auf (Student's t-Test:  $p > 0,05$ ; Daten nicht gezeigt).

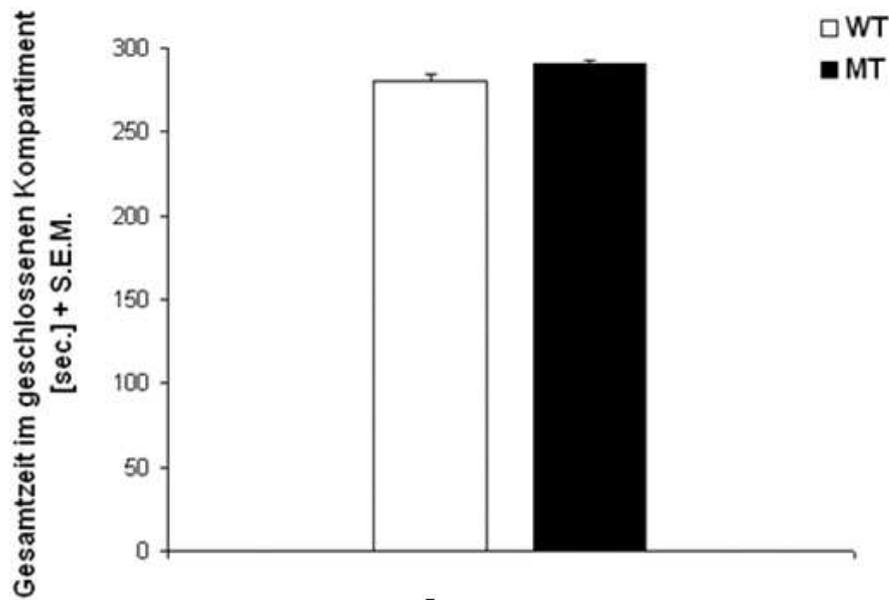


Abb.59 Die Mutanten (MT: n=10) zeigen gegenüber den Wildtypen (WT: n=12) einen Trend für eine Erhöhung der Gesamtzeit, die sie sich in den geschlossenen Armen aufhalten (Mittelwert + S.E.M.).

In der Verhaltensweise des Herabbeugens des Kopfes zeigten die Mutanten einen Trend (Student's t-Test:  $p=0,08252$ , Abb.60) dieses neugierige Verhalten weniger zu zeigen als ihre Wildtypkontrollen. Auch im Bereich des angstassoziierten Verhaltens sind Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu erkennen, so zeigen die Mäuse der Mutantengruppe eine signifikant vermindertes Verhalten der Risikobewertung (Student's t-Test:  $p=0,0298$ , Abb.60) im Vergleich zu ihren Wildtypkontrollen.

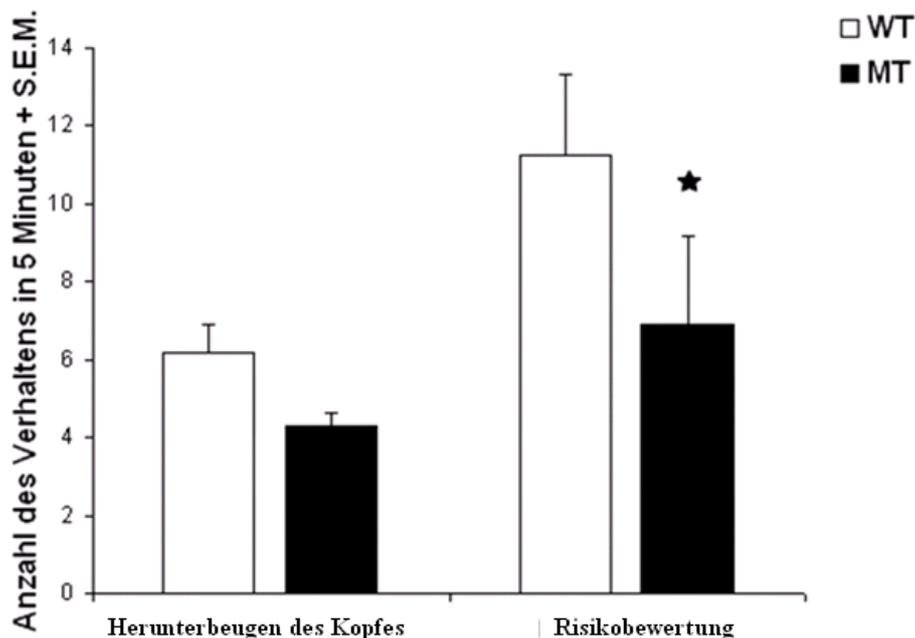


Abb.60 Die Mutanten (MT: n=10) zeigen gegenüber den Wildtypen (WT: n=12) eine signifikante Verminderung des risikobewertenden Verhaltens, bei dem Herunterbeugen des Kopfes zeigte sich ein Trend der Mausmutanten, dieses Verhalten weniger zu zeigen (Mittelwert + S.E.M.).

### 3.6.2 Hell-Dunkel-Box-Test (light-dark-emergence test)

Als weiteren emotionalen Test zur Untersuchung des angstbezogenen Verhaltens wurde der Hell-Dunkel-Box-Test durchgeführt. Dabei zeigten die Mäuse der Mutantengruppe mit der induzierbaren Gendelektion der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 der Dopamintransporter bezüglich der vergleichenden Wildtypkontrollen im Bereich des explorativen Verhaltens eine annähernd gleiche Aufrichthäufigkeit (Student's t-Test:  $p > 0,05$ , Abb.65) ebenso wie in vielen anderen Untersuchungsparametern auf das angstbezogene Verhalten (Student's t-Test:  $p > 0,05$ , Abb.62, Abb.63 und Abb.64). Zudem wurde noch als weiterer Parameter des angstassoziierten Verhaltens eine Aussage darüber getroffen, ob die Tiere überhaupt das helle Kompartiment betreten (Student's t-Test:  $p > 0,05$ , Abb.66), unabhängig von der Häufigkeit, wobei auch hier ein ähnliches Verhalten der Tiere beider Gruppen, den hellen Bereich zu betreten zu beobachten war. Bei der Zeit bis zum ersten Eintritt der so genannten „Latenz“, in das helle Kompartiment zeigten die Mäuse der Mutantengruppe allerdings einen Trend, eine längere Zeitspanne zu benötigen (Student's t-Test:  $p = 0,0696$ , Abb.61).

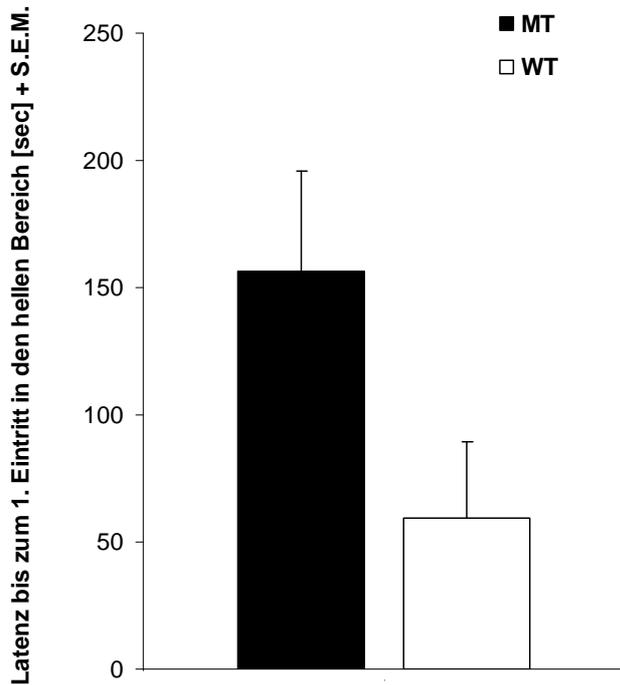


Abb.61 Die Mutanten (MT: n=11) zeigen gegenüber den Wildtypen (WT: n=12) einen Trend, eine längere Latenz bis zum 1. Eintritt in das hellere Kompartiment zu benötigen (Mittelwert + S.E.M.).

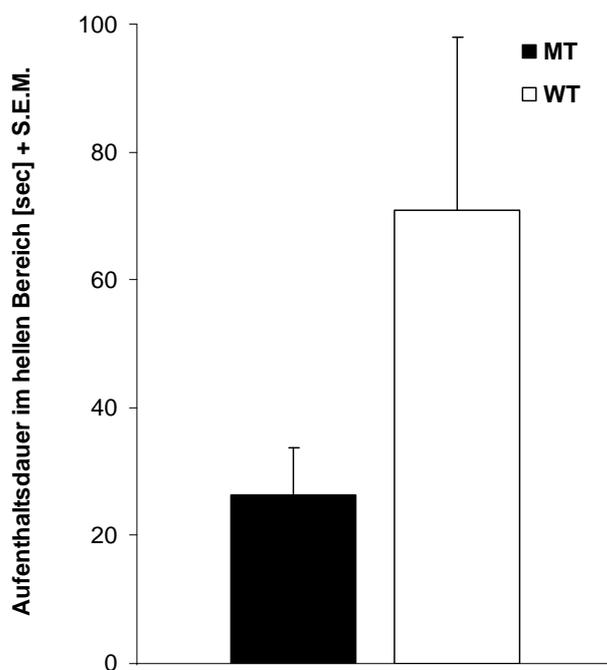


Abb.62 Die Mutanten (MT: n=11) zeigen gegenüber den Wildtypen (WT: n=12) eine ähnliche Aufenthaltsdauer im hellen Kompartiment (Mittelwert + S.E.M.).

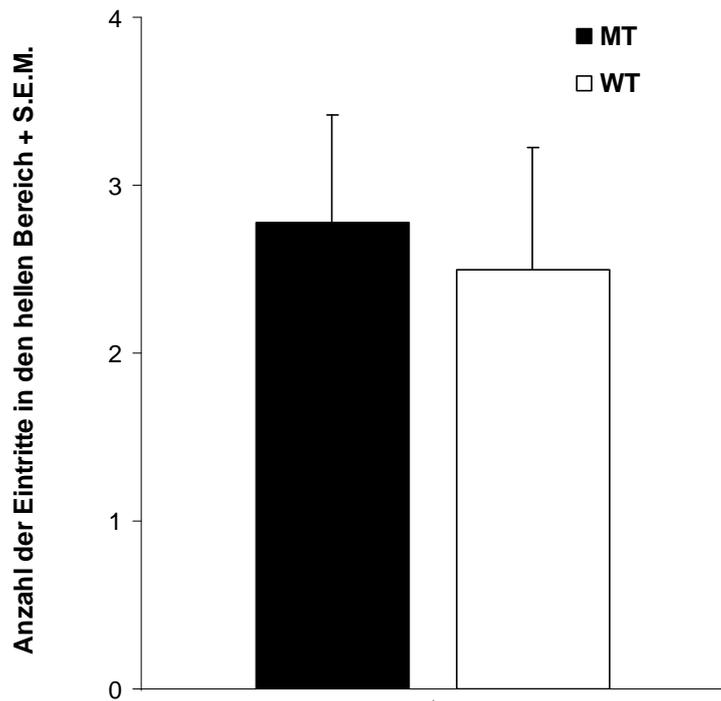


Abb.63 Die Mutanten (MT: n=11) zeigen gegenüber den Wildtypen (WT: n=12) auch bei der Eintrittshäufigkeit in das helle Kompartiment ein ähnliches Verhalten (Mittelwert + S.E.M.).

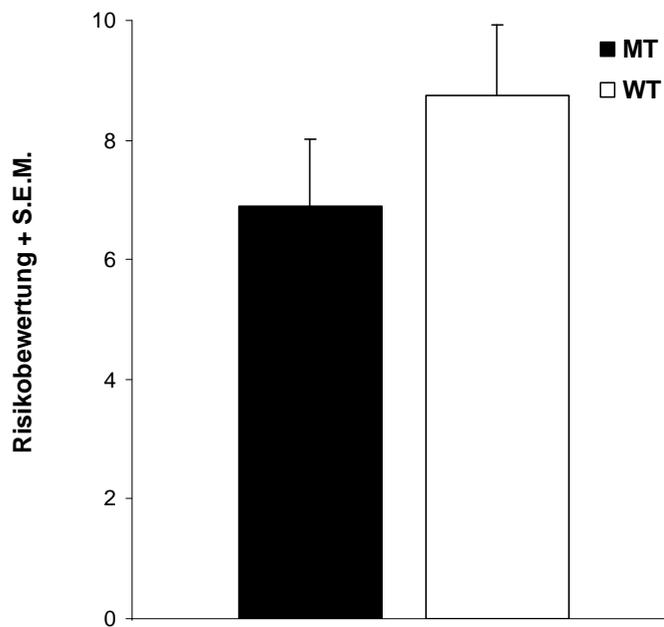


Abb.64 Auch die Risikobewertung der Mutanten (MT: n=11) ähnelt dem der Wildtypen (WT: n=12) (Mittelwert + S.E.M.).

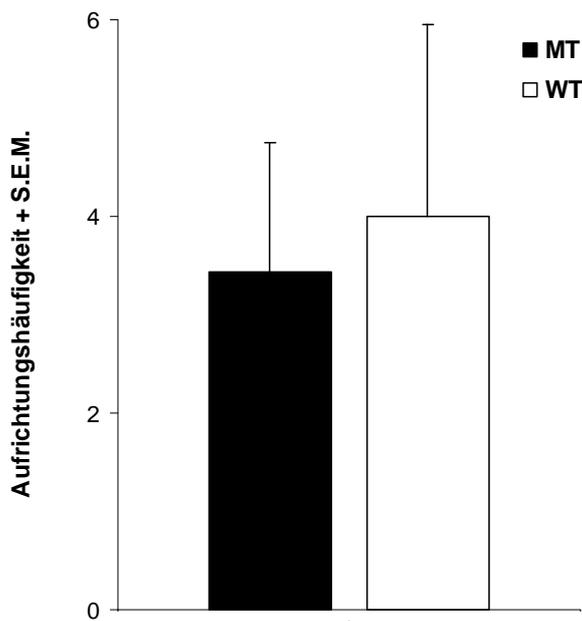


Abb.65 Die Mutanten (MT: n=11) zeigen gegenüber den Wildtypen (WT: n=12) bei der Aufrichtungshäufigkeit ein annähernd gleiches Verhalten (Mittelwert + S.E.M.).

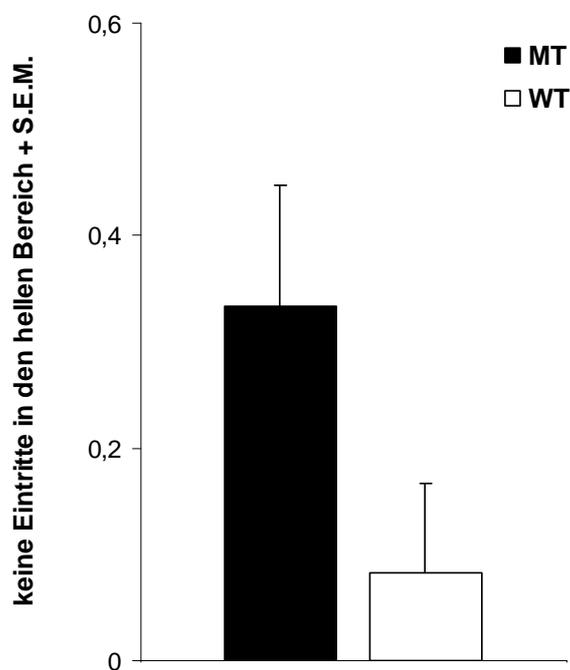


Abb.66 Bei der Bewertung, ob das helle Kompartiment überhaupt betreten wird, zeigen die Mutanten (MT: n=11) gegenüber den Wildtypen (WT: n=12) ein ähnliches Verhalten. Dabei wurde den Mäusen, die den hellen Bereich betraten, der Wert 1 zugewiesen. Betraten die Mäuse das helle Kompartiment hingegen nicht, erhielten sie den Wert 0 (Mittelwert + S.E.M.).

### 3.7 PPI der ASR

Für die Messung der Präpulsinhibition wurden vier verschiedene Präpulse, die sich in ihrer Intensität von 74dB, 70dB, 66dB und 62dB unterschieden, verwendet. Die Daten eines Tieres aus der Wildtypkontrollgruppe mussten wegen keinerlei Reaktion auf den Schreckreiz, vermutlich durch Taubheit des Tieres, aus den ausgewerteten Daten herausgenommen werden, so dass die Daten von jeweils 11 Tieren aus beiden Gruppen zur Auswertung kamen.

Der Student's t-Test ergab bei den verschiedenen Präpulsen ähnliche prozentuale Reduktion der ASR bei den Tieren der Mutanten und deren Tamoxifen-Wildtypkontrollen (Student's t-Test bei 62dB:  $p=0,9606$ ; bei 66dB:  $p=0,6508$ ; bei 70dB:  $p=0,9004$  und bei 74dB:  $p=0,5567$ , Abb.67).

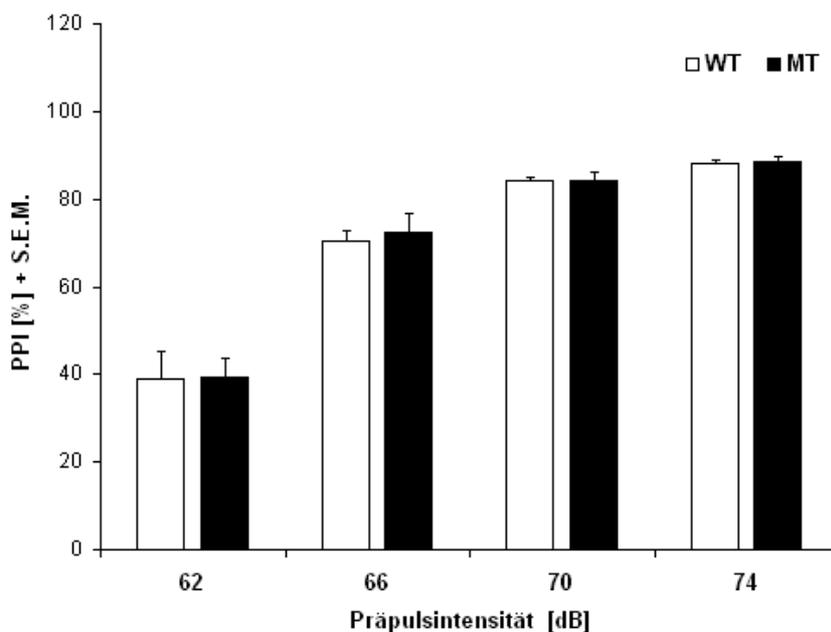


Abb.67 Die Mausmutanten (MT: n=11) zeigten gegenüber ihren Tamoxifen-behandelten Wildtypkontrollen (WT: n=11) bei den verschiedenen Präpulsen eine ähnliche prozentuale Reduktion der ASR (Mittelwert + S.E.M.).

Zusätzlich zur PPI der ASR wurde auch die Höhe der ASR-Amplitude ohne vorhergehenden Präpuls gemessen. Die Tiere der Mutantengruppe zeigen keine signifikanten Veränderungen auf die ASR-Amplituden-Effekte (Student's t-Test:  $p=0,3460$ , Abb.68).

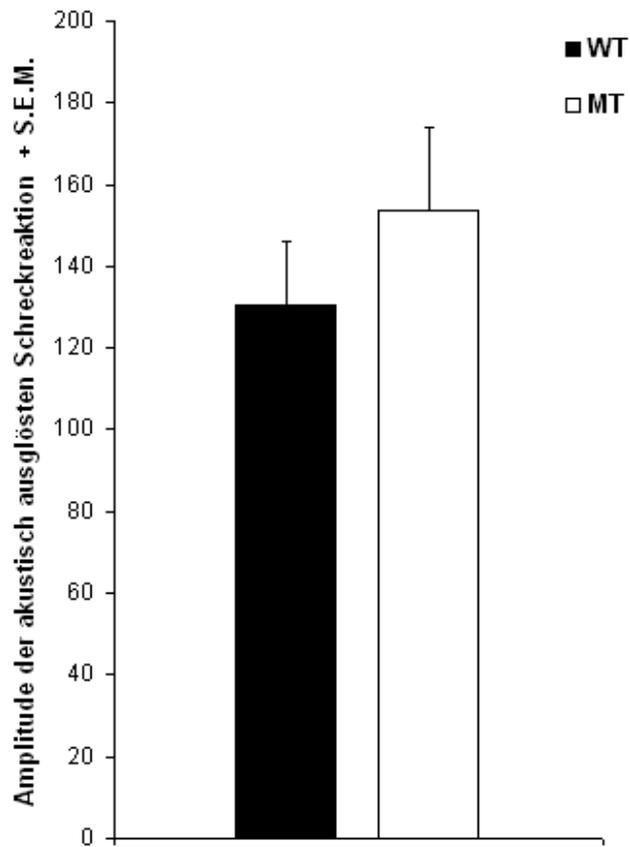


Abb.68 Die Mausmutanten (MT: n=11) zeigten im Vergleich zu ihren Tamoxifen-Wildtypkontrollen (WT: n=11) bei der ASR eine ähnliche Amplitude der ASR (Mittelwert + S.E.M.).

## 4. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war eine „in vivo“ Charakterisierung des Phänotyps einer Mausmutante „DATCreERT2-NR1“ mit einer konditionalen Deletion der NMDA Rezeptoruntereinheit NR1 der dopaminergen Neuronen. Dabei sollten die Auswirkungen der zeitlich tamoxifen-induzierten, dopamintransporterspezifischen Deletion der NR1-Untereinheit der NMDARs auf die Beeinflussung des Gewichts und auf bestimmte Verhaltensweisen untersucht werden.

### 4.1 Gewicht

Das Körpergewicht beschreibt die physikalische Masse eines Lebewesens und wird durch die Bilanz der Kalorienaufnahme und des Kalorienverbrauchs beeinflusst.

Die „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten zeigten bezüglich ihres Gewichts eine signifikante Reduktion gegenüber den Wildtypkontrollen. Da anhand der lokomotorischen Untersuchung im Abschnitt 4.2 sogar eine Reduktion der Motorik festgestellt werden konnte, ist die Gewichtsreduktion mit allerhöchster Wahrscheinlichkeit nicht auf einen erhöhten Kalorienverbrauch durch vermehrte Lokomotion zurückzuführen.

Bei der Kalorienzufuhr mittels Nahrungsaufnahme kann zwischen zwei verschiedenen, durch Dopamin beeinflussten Systemen unterschieden werden. Zum einen gibt es das System, welches die lebenserhaltende Kalorienzufuhr regelt. In ihr wird vermutlich anhand der Energiebilanz das Gefühl Hunger an das Gehirn vermittelt, was über einen noch nicht geklärten dopaminergen Mechanismus im CPU zu einer lebenserhaltenden Nahrungsaufnahme führt. Eine Studie belegt, dass ein Defizit in der Dopamintransmission im CPU zu einer letalen Reduktion der Nahrungsaufnahme führt (Szczyпка et al., 2001). Defizite in der Dopamintransmission im NcA führen hingegen zu einer reduzierten Aufnahme unbekannter, sonst präferierter (eventuell konditional) oder süßer Nahrung. Mäuse mit einem Defizit in beiden Bereichen verloren 20 Prozent ihres Körpergewichts in 48 Stunden und starben. Diese Studie bekräftigt die experimentell ermittelte signifikante Gewichtsreduktion der „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten im Vergleich zu den WT als Folge eines verminderten dopaminergen Inputs im Mesencphalon, vor allem des CPU.

Die „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten bekamen das gleiche Futter wie die Wildtypen, allerdings wurde nicht untersucht, wie viel Futter von den Tieren aufgenommen wurde. So kann das reduzierte Gewicht einerseits auf eine verminderte Kalorienzufuhr durch

verminderte Futteraufnahme, andererseits auf einen erhöhten Stoffwechsel zurückgeführt werden. Hypothetisch könnte die verminderte Kalorienzufuhr auf einen Dopaminmangel der lebenserhaltenden Futteraufnahme, die über die Dopamintransmission im CPU reguliert wird, zurückzuführen sein. Der CPU erhält seinen dopaminergen Afferenzen aus der SNc, welche zu 90 Prozent dopaminerge Neuronen enthält. Da ihre NMDARs funktionslos sind, kommt es vermutlich auch hier durch einen verminderten exzitatorischen Impuls zu einer verminderten Dopamintransmission in das CPU. Über welchen Mechanismus das Dopamin allerdings genau die Nahrungsaufnahme reguliert, ist bisher noch nicht bekannt (Sawchenko, 1998; Elmquist et al., 1999; Woods et al., 1998; Nicola et al., 2000; Szczypka et al., 2001).

Da auch eine erhöhte Stoffwechselleistung der „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten als Ursache für die Gewichtsreduktion im Vergleich zu den Wildtypen nicht auszuschließen ist, bleibt der genaue Grund weiter abzuklären.

## 4.2 Lokomotorische Aktivität

Wie bereits einleitend erwähnt, wird die lokomotorische Aktivität von anatomischen und funktionell interagierenden Systemen vermittelt und über komplexe Schaltkreise reguliert. Die Anpassung der Motorik an die Umweltbedingungen wird über hierarchisch angeordnete motorische Bahnen im ZNS gesteuert und durch das Cerebellum und die Basalganglien moduliert (Joel et Weiner, 2000). Über den motorischen Cortex werden die Informationen an die Motoneuronen des Rückenmarks geleitet, die ihrerseits die motorisch ausführende Skelettmuskulatur innervieren.

Die Basalganglien bilden parallele, interagierende Rückprojektionsschleifen, die die Informationen aus dem Cortex modulieren, um sie dann wieder an assoziierte Cortexregionen zu projizieren. Bisher sind fünf parallele verschiedene Basalganglienschleifen bekannt, die anhand ihrer zugehörigen corticalen Areale unterschieden werden (Alexander et al., 1986). Während das Cerebellum die Feinabstimmung der Bewegungsabläufe übernimmt, adaptieren die Basalganglien die limbischen Bewegungsimpulse durch Verstärkung oder Abschwächung. Beide Systeme laufen im Thalamus zusammen, der seinerseits Impulse an den motorischen Cortex sendet (Hoshi et al., 2005), in welchem das unwillkürliche

extrapyramidale System auf das pyramidale System und somit auf das Rückenmark verschaltet wird.

Die „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten dieser Arbeit zeigten eine Reduktion der lokomotorischen Aktivität und eine verminderte Eintrittshäufigkeit in das Zentrum.

Eine die Informationen des Cortex modulierende Rückprojektionsschleife ist die dorso-lateralen-präfrontalen Basalganglienschleife. Der NcA stellt dabei die Eingangsstruktur dar und wird auf Grund seiner Vermittlerfunktion zwischen limbischen Afferenzen und motorischen Efferenzen auch als limbo-motorisches Interface bezeichnet (Mogenson et al., 1980; Groenewegen et al., 1996 et 1997). Seine limbischen, glutamatergen Afferenzen erhält er aus dem PFC, der Amygdala und dem HIPP (Heimer et al., 1991), zudem erhält er dopaminerge Projektionen aus der VTA, welche vermutlich filternde Eigenschaften auf den NcA haben und die glutamatergen Projektionen aus cortico-limbischen Regionen modulieren (Kelley et Domesick, 1982; Kelly et al., 1982; Sesack et Pickel, 1992). Dadurch kommt es zu einer Verhaltensanpassung. Limbische emotionale und motive Impulse werden in Form von Hemmung oder Verstärkung durch dopaminerge Afferenzen gefiltert und somit bewertet (Salamone et al., 1997; Schmidt, 1998; Koch et al., 2000; Horvitz, 2002; Sesack et al., 2003). Die dopaminerge-glutamaterge Interaktion im NcA wird auch als frontostriatales System bezeichnet. So kommt es beispielsweise bei einem mit Nahrungsaufnahme beschäftigten Beutetier bei der Sichtung eines Raubtieres zum Umschalten der Motorik von dem bestehenden Fressverhalten auf das angemessene Fluchtverhalten (Redgrave et al., 1999; Gurney et al., 2001). Der NcA projiziert hauptsächlich zum VP, das einerseits direkt und andererseits über den pedunculo-pontinen tegmentalen Kern (PPTg) die Aktivität des Thalamus beeinflusst (O'Donnell et Grace, 1998; Sesack et Pickel, 1990; Grace, 2000). Die Disinhibition des Thalamus (Abb.69; 1) wirkt exzitatorisch auf motorischen Arealen des Cortex. Vom PPTg ziehen zusätzlich Projektionen, die an der Induktion einer motorischen Antwort beteiligt sind, über die mediale medulläre Formatio reticularis des Hirnstamms (MED) ins Rückenmark.

Der CPu-Komplex stellt die Eingangsstruktur einer weiteren Basalganglienschleife, der motorischen Schleife, dar. Die Projektion zum Thalamus erfolgt GABAerg mittels zweier interagierender Bahnen über die Substantia nigra pars reticularis (SNr) und den Globus pallidus internus (GPI). Dabei üben die beiden Projektionsbahnen entgegengesetzte Wirkungen auf den Thalamus und den motorischen Cortex aus. Ein Gleichgewicht dieser beiden Bahnen spielt eine essentielle Rolle bei der Bewegungskoordination. Die direkte



zu einer Verstärkung der Aktivierung des striato-thalamo-kortikalen Kreislaufs kommt. Wahrscheinlich wird die indirekte striatopallidale Projektionsbahn mittels D2-Rezeptoren inhibiert. Daraus resultiert eine Disinhibition des GPe, eine vermehrte Inhibition des STN, eine verminderte Erregung des GPi/ SNr, eine verringerte GABAerge Aktivität auf den Thalamus und letztendlich ein verstärkter glutamaterger Input auf den Cortex. Andererseits kommt es vermutlich mittels D1-Rezeptoren zu einer exzitatorischen Wirkung auf die direkten Bahnen. Hieraus resultiert eine verstärkte GABAerge Inhibition auf den GPi/ SNr, wodurch ebenfalls ein verminderter GABAerger Input auf den Thalamus wirkt und es auch auf diesem Weg zu einer verstärkten Aktivierung des motorischen Cortex kommt (Hirata et al., 1984; Hirata et Mogenson, 1984; Hong et al., 1985; Pan et al., 1985; Young et al., 1986; Bouras et al., 1986, Aizman et al., 2000).

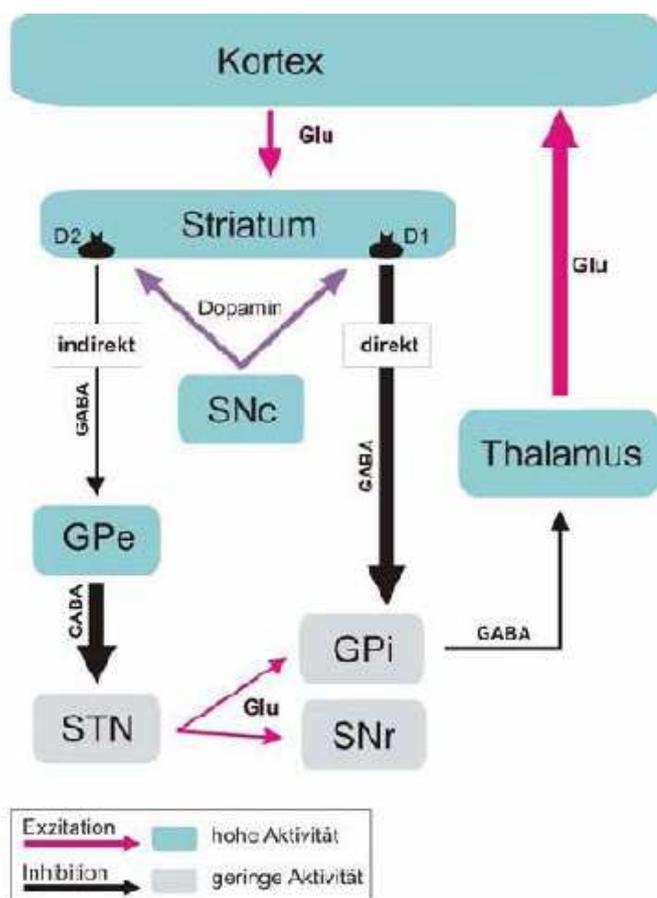


Abb.70 Dopaminerge und glutamaterge Afferenzen des Striatums. Dopaminerge Neuronen der Substantia nigra pars compacta (SNc) führen zu einer verstärkten glutamatergen Aktivierung des motorischen Cortex.

Auf Grund von Veränderungen in diesen komplexen Schaltkreisen, wie beispielsweise das Fehlen von bestimmten funktionsfähigen Rezeptoren in bestimmten neuronalen Bereichen des ZNS, kann es auch zu Veränderungen in der Motorik kommen.

In der vorliegenden Studie zeigten die Mäuse der „DATCreERT2-NR1“-Mutantengruppe eine insgesamt verminderte lokomotorische Aktivität. Beispielsweise waren die getesteten Parameter Aktivitätszeit und die während der Testphase zurückgelegte Strecke gegenüber ihren Wildtypkontrollen signifikant vermindert.

Das Ergebnis der verminderten lokomotorischen Aktivität deckt sich mit Befunden in Studien, die auf Grund von direkten Applikationen von NMDA-Rezeptoantagonisten, also beispielsweise Dizocilpin in den NcA oder Unterbrechung der dopaminergen Projektion durch 6-Hydroxydopamin, was zu Läsionen in diesem Bereich führt, zu einer Hypolokomotion führten (Mogenson et Nielsen, 1984a et 1984b; Schacter et al., 1989a et 1989b). Im Gegensatz dazu induziert eine akute (Lipska et Weinberger, 2000) oder chronische (Xu et Domino, 1994) systemische Dizocilpin-Applikation eine Hyperlokomotion. Allerdings wirken glutamaterge Afferenzen aus dem STN, welche den geringeren Anteil des afferenten Inputs auf Nervenzellen des SNc darstellen, in diesen Untersuchungen auch auf alle nicht dopaminergen Neuronen des SNc. Obwohl laut verschiedener Studien der Anteil dopaminergener Neuronen in der SNc bei circa 90 Prozent liegt, üben glutamaterge Afferenzen auch einen exzitatorischen Effekt auf nicht-dopaminerge Neuronen aus. Zu einer Hyperlokomotion kommt es auch bei Mäusen mit einer Hypofunktion des NMDAR. Dabei ist die Expression der NR1-Untereinheit des NMDAR um circa 90 Prozent reduziert, aber nicht völlig eliminiert, da eine klassische „NR1-Knockout“-Maus postnatal nämlich nicht überlebensfähig ist (Forrest et al., 1994). Allerdings kommt es bei den Mäusen mit der „Hypofunktion des NMDAR“ weder zu einer zellspezifischen noch zu einer vollständigen Deletion der NR1-Untereinheiten des NMDARs. Die Reduktion der NR1-Untereinheit ist hier auf allen NMDAR-haltigen Neuronen in unterschiedlichem Maße ausgeprägt (Duncan et al., 2006). Da in dieser Arbeit aber davon ausgegangen wurde, dass nur DAT exprimierende Zellen von der Deletion der NR1-Untereinheit des NMDARs betroffen waren, also nur dopaminerge Neuronen keinen funktionsfähigen NMDAR besaßen, kam es vermutlich zu einer geringeren Aktivierung dopaminergener Neuronen der SNc. Daraus resultierte wahrscheinlich eine geringere Dopaminausschüttung im Striatum. Dieses Dopamindefizit im Striatum führte dann hypothetisch zu einer geringeren Aktivität der direkten exzitatorischen striatopallidalen Projektionsbahn und einer gesteigerten Aktivität der indirekten inhibitorischen striatopallidalen Projektionsbahn. Diese Hypothese hätte bei beide Projektions-

bahnen eine erhöhte GABAerge Aktivität der GPi- und SNr-Neuronen zur Folge, die den Thalamus hemmen und somit zu einer geringeren glutamatergen Erregung des Cortex führen würden. Somit würden limbische-corticale Bewegungsmuster nicht verstärkt und die Umsetzung in willkürliche Bewegung wäre abgeschwächt, ähnlich wie bei dem ideopatischen Parkinson Syndrom, welches durch eine Degeneration dopaminerger Neuronen der SNc von bis zu 90 Prozent gekennzeichnet ist (Blandini et al., 2000; Crossman, 1989; Abb.71).

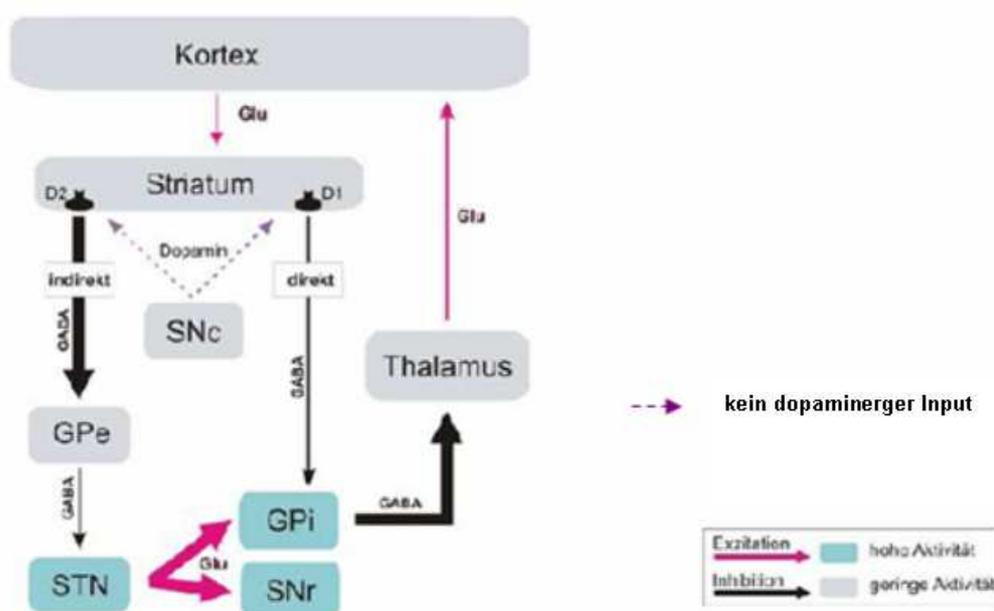


Abb.71 Vereinfachte schematische Darstellung der cortico-limbischen-corticalen Feedbackschleife mit fehlendem dopaminergen Input (detailliertere Beschreibung siehe Test).

Das dopaminerge System wirkt auch über die oben beschriebene dorsolaterale präfrontale Schleife filternd auf die limbischen Eingänge des NcA ein. Die Hauptafferenzen der VTA sind zu über 70 Prozent exzitatorisch und stammen aus dem PFC. Während die SNc mit 90 Prozent hauptsächlich dopaminerge Neuronen besitzt, liegt der Anteil dopaminerger Neuronen in der VTA nur bei 55 Prozent. So wurden als weitere Interneuronen, die zu einem gewissen Teil mit den dopaminergen Neuronen zu den Terminalgebieten, wie PFC, Amygdala und ventrales Striatum projizieren, aber auch auf die dopaminergen Neuronen der VTA ziehen, GABAerge Neuronen identifiziert. Dabei besitzen beide Neuronengruppen Rezeptoren sowohl vom Typ GABAR, als auch NMDAR und AMPAR. Hypothetisch erfahren die dopaminergen Neuronen nun, bedingt durch die normale exzitatorische glutamaterge Aktivierung der GABAergen Interneuronen, eine verstärkte Inhibition, da ihre direkte glutamaterge Aktivierung durch den funktionslosen NMDAR eingeschränkt wäre. Somit

würde es zu einer verminderten Dopaminausschüttung in der Terminalregion des ventralen Striatums, dem NcA, kommen. Folge wäre eine verminderte Verhaltensanpassung, da glutamaterge Eingänge in den NcA nicht mehr mittels Hemmung oder Verstärkung durch die VTA gefiltert werden könnten.

Anhand einer Studie (Szczpka et al., 2001) mit Mausmutanten, die zwar dopaminerge Neuronen ausbilden, allerdings auf Grund des Enzymmangels der Thyroxinhydroxylase in dopaminergen Neuronen kein Dopamin synthetisieren können, konnte belegt werden, dass bei fehlenden dopaminergen Afferenzen in den NcA und das CPu das explorative Verhalten in einer neuen Umgebung stark reduziert ist. Durch das gezielte Einbringen von zwei Virusstämmen mit der Thyroxinhydroxylase und einem Coenzym konnte die Dopaminausschüttung in dem injizierten Bereich induziert werden. Dabei kommt es anscheinend durch die Virusimplantation in der Region zur Ausschüttung von L-Dopa aus nicht-dopaminergen Zellen, welches in dopaminerge Zellen aufgenommen, in Dopamin umgewandelt und auf normalem Weg freigesetzt wird. Das Explorationsverhalten der Mausmutanten mit Virusimplikation in den NcA war als einziges mit dem der Wildtypen vergleichbar. Bei allen anderen Mutantengruppen war es reduziert. Die neue Umgebung stellt dabei einen Reiz auf das limbische System dar, die neue Umgebung auf Futter und mögliche Sexualpartner (wie oben beschrieben) zu untersuchen. Die fehlende dopaminerge Affferenz aus der VTA führt nicht mehr zu einer Verstärkung dieses Verhaltens, ihre filternde Eigenschaft entfällt und somit kommt es zu einer verminderten Verhaltensanpassung durch das frontostriatale System, durch welches ja das Umschalten auf das jeweils gerade adäquate Verhalten gewährleistet werden soll. Das Ergebnis dieser Studie bekräftigt die Hypothese, dass die reduzierte Lokomotion der „DATCreERT2-NR1“ Mausmutanten wahrscheinlich auf eine geringere Dopaminausschüttung im NcA zurückzuführen ist. Betrachtet man neben der Lokomotion das auch in diesem Test untersuchte angstassoziierte Verhalten, fällt auf, dass die „DATCreERT2-NR1“ Mausmutanten eine signifikante Reduktion der Eintrittshäufigkeit ins Testboxzentrum zeigten. Dies kann als Indiz für ein erhöhtes Angstverhalten gewertet werden, da das Testboxzentrum, welches eine ungeschützte Fläche darstellt und instinktiv von Beutetieren gemieden wird, von den Wildtypmäusen im Vergleich häufiger betreten wurde. Hypothetisch könnte die reduzierte Lokomotion der Mausmutanten also auch auf einem erhöhten angstassoziierten Verhalten beruhen. In der Literatur gibt es verschiedene Ansichten über die Auswirkung von Angst auf die Lokomotion. Einerseits wird die Ansicht vertreten, dass lokomotorische Aktivität nicht als eine Art Index für die Angst gewertet werden kann. Es gibt jedoch auch Publikationen, die darlegen, dass es auf Grund

von Angst und Schmerz oft zu einem Erstarren (das Tier bewegt sich nicht mehr), dem so genannten „Freezing“ der Tiere kommt.

Ob die reduzierte Lokomotion eine Auswirkung eines erhöhten angstassoziierten Verhaltens, einer verminderten Verhaltensanpassung oder eine allgemeine Reduktion der motorischen Aktivität darstellt, bleibt genauer zu untersuchen.

### 4.3 Nestbauverhalten

Das in dieser Studie untersuchte nicht „maternale“-Nestbauverhalten stellt hauptsächlich ein natürliches, speziesspezifisches thermoregulatorisches Anpassungsverhalten der Maus dar (Lynch, 1992). Auf Grund von genetischen Veränderungen oder Läsionen in bestimmten Bereichen des ZNS konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass sich das Nestbauverhalten verändert.

Das Nestbauverhalten war bei den „DATCreERT2-NR1“-Mutanten im Vergleich zu ihren Kontrollen signifikant reduziert. Dieses Phänomen könnte einerseits als eine allgemeine motorische Verlangsamung, andererseits auch als ein angstassoziiertes, gehemmttes Verhalten gedeutet werden. Anhand der Studie von Szcypka konnte gezeigt werden, dass eine intakte Dopamintransmission im CPu von essentieller Bedeutung ist. So zeigten Mäuse der Gruppe mit einem allgemeinen Defizit der Dopamintransmission CPu und NcA, aber auch Mäuse mit einem Defizit der Dopamintransmission nur in dem CPu ein stark reduziertes Nestbauverhalten (Szcypka et al., 2001). Eine Wiederherstellung der Dopamintransmission im CPu mittels virusvermittelter Thyroxinhydroxylase- und Cotransmitter-Implikation im Bereich des CPu führte bei den Mutanten zu einer Normalisierung des Nestbaus, wohingegen eine normale virusvermittelte Dopamintransmission im NcA zu keinem normalen Nestbau führte. Anhand dieser Studie und den Ergebnissen dieser Arbeit liegt die Vermutung nahe, dass die „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten auf Grund der NR1 Deletion der NMDAR der dopaminergen Neuronen der SNc funktionslos sind. Dadurch kommt es vermutlich, bedingt durch einen reduzierten exzitatorischen Input auf dopaminerge Neuronen des STN, zu einer verminderten Dopamintransmission der dopaminergen Afferenzen der SNc im CPu.

Leider gibt es bisher wenige Studien über das Nestbauverhalten. Bei den wenigen Studien handelt es sich meist um Versuche, die sich auf das hormonell regulierte Nestbauverhalten

weiblicher Tiere beziehen, dem ein völlig anderer hormoneller Regelkreis zu Grunde liegt. Allerdings lässt sich vermuten, dass das Nestbauverhalten, ebenso wie die lebenserhaltende, nicht-belohnungsinduzierte Nahrungsaufnahme etwas mit der kalorienbedingten Erhaltung der Energiebilanz des Körpers zu tun hat. Es konnte gezeigt werden, dass die lebenserhaltende Nahrungsaufnahme durch eine fehlende Dopamintransmission im CPU, welche ja hauptsächlich aus dopaminergen Afferenzen des SNc stammt, gehemmt werden kann. Darauf soll im Abschnitt 4.7 näher eingegangen werden.

Es bleibt also zu klären, ob das reduzierte Nestbauverhalten der „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten als eine allgemeine motorische Verlangsamung gedeutet werden kann oder ob es ein den Angststörungen verwandtes, gehemmtes Verhalten darstellt.

#### **4.4 Soziale Interaktion**

Die soziale Interaktion der „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten gegenüber einer „juvenilen“ Maus wurde anhand des „social interaction“ Test beurteilt.

Dabei zeigten die Mausmutanten eine starke Reduktion des sozialen Interaktionsverhaltens bei der Exploration und im Kontaktverhalten. Das angstassoziierte Verhalten war hingegen stark erhöht.

Das Explorationsverhalten des Sozialpartners war insgesamt, sowie in den einzelnen Bereichen wie der anogenitalen und non-anogenitalen Exploration und im Folgeverhalten im Vergleich zu den Kontrollen reduziert. Auch im Kontaktverhalten zu den Sozialpartnern zeigten die „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten Defizite. Studien belegen, dass der PFC als höchstes assoziatives und integratives Zentrum des Gehirns eine zentrale Rolle im Sozialverhalten spielt (Tucker et al., 1995). Beispielsweise gehört inadäquates Sozialverhalten zu der schizophrenen Negativsymptomatik, also einem Verhalten, welches physiologischerweise vorhanden ist, aber infolge der Erkrankung reduziert oder überhaupt nicht mehr vorhanden ist (Ellenbroek et Cools, 2000). Studien mit so genannten „NR1-hypomorphischen“-Mausmutanten, die nur eine etwa zehnpromzentige Expression der normalen NR1-Untereinheit des NMDAR zeigen, führen ebenfalls zu der auch in dieser Arbeit beobachteten verminderten sozialen Interaktion (Mohn et al., 1999). Die soziale Investigation der Mausmutanten ist signifikant reduziert, das Fluchtverhalten hingegen signifikant erhöht. Da es sich bei Nagetieren um sehr soziale Lebewesen handelt, kann man

hier von einem Verlust eines angeborenen Verhaltens sprechen. Beim Menschen geht man von dem Unvermögen der Patienten aus, den Gefühlszustand und die Intention anderer Menschen richtig zu interpretieren (Russell et al., 2000). Sie zeigten bei der Interpretation sozioemotionaler Aufgaben eine verminderte Aktivierung des linken PFC. Dies würde sich mit der Hypothese der verminderten Aktivierung dopaminergener Neuronen in der VTA decken, welche zu einer verminderten dopaminergen Freisetzung in den PFC führen würde.

Des Weiteren wäre es hypothetisch auch möglich, dass der verminderte soziale Kontakt nicht nur auf mangelnde Motivation und falsche Interpretation des Verhaltens des Sozialpartners zurückzuführen ist, sondern die Reduktion der sozialen Interaktion eventuell auch auf einer gesteigerten Ängstlichkeit der Mutanten gegenüber den Sozialpartnern basiert. Ein Sozialpartner bedeutet neben sozialem Interesse per se auch immer eine Angstkomponente. Durch die Wahl eines „juvenilen“ im Vergleich zu einem „adulten“ Sozialpartner wurde die Angstkomponente möglichst gering gehalten, konnte aber nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Für einen verminderten sozialen Kontakt auf Grund einer erhöhten Ängstlichkeit würde auch sprechen, dass das angstassoziierte Verhalten im Vergleich zu dem der Kontrollmäuse signifikant erhöht war. Dies äußerte sich vor allem in Form eines erhöhten Fluchtverhaltens gegenüber den Sozialpartnern. Auch diese Verhaltensweise könnte sich hypothetisch auf eine verminderte Dopaminfreisetzung dopaminergener Neuronen in der VTA zurückführen lassen. Die VTA nimmt über zwei verschiedene Wege Einfluss auf die Amygdala, welche wesentlich an der Entstehung von Angst beteiligt ist und allgemein eine essentielle Rolle bei der emotionalen Bewertung und Wiedererkennung von Situationen sowie der Analyse potentieller Gefahren spielt, indem sie externe Impulse verarbeitet und vegetative Reaktionen einleitet. Welche möglichen Mechanismen zu einer Erhöhung des angstassoziierten Verhaltens der „DATCreERT2-NR1“-Mutantenmäuse führen könnten, soll im Abschnitt 4.5 genauer erläutert werden.

#### **4.5 Wiedererkennungstest (*object recognition test*)**

Die möglichen Auswirkungen einer NR1-Deletion des NMDAR auf dopaminergen Neuronen bezüglich der Kurz- und Langzeitgedächtnisleistung der Mäuse wurden mittels zweier Wiedererkennungstests ermittelt. Die Zeitspanne zwischen der 1. und 2. Präsentation lag dabei bei 30 Minuten, beziehungsweise 24 Stunden. Um einen Gegenstand wieder zu erkennen, muss sich das Tier an den Gegenstand erinnern und charakteristische Merkmale des Gegenstandes wahrnehmen, unterscheiden, identifizieren und schließlich mit

charakteristischen Merkmalen anderer bereits bekannter Objekte vergleichen (Steckler et al., 1998). Der hierbei verwendete Wiedererkennungstest ähnelt im Design der verzögerten Wahlreaktionsaufgabe, einem visuellen Wiedererkennungstest für verschiedene Funktionen des Kurzzeitgedächtnisses beim Menschen und nicht-menschlichen Primaten (Moye, 1997). Der Vorteil des Wiedererkennungstests ist, dass er auf der natürlichen Verhaltensweise der Spezies Maus beruht, spontan ein unbekanntes Objekt mehr als ein bekanntes Objekt zu explorieren. Dabei ist kein anderes System, wie beispielsweise das Belohnungs- oder Schmerzsystem, wie bei Konditionierungstests involviert. Es handelt sich um eine Operationalisierung über die Zeit. Hierbei wird die Dauer, in der sich die Maus mit den Objekten beschäftigt, genutzt.

Bei der 1. Präsentation zweier identischer Objekte zeigten die Mausmutanten gegenüber ihren Tamoxifen-behandelten Wildtypkontrollen keinerlei Unterschiede. Beide identischen Objekte wurden von beiden Gruppen gleich lang, sowohl bei der Objektwiedererkennung nach 30 Minuten als auch nach 24 Stunden, exploriert. Dass die initiale Exploration der „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten nicht signifikant gegenüber Wildtypen verändert war, ist ein Indiz dafür, dass die unterschiedlichen Ergebnisse beim Vergleich der Explorationszeiten bei der 2. Präsentation zwischen MT und WT nicht auf ein allgemein verstärktes exploratives Verhalten oder motorische Effekte zurückzuführen sind. Die signifikant erhöhten prozentualen Objektdiskriminierungen der Mausmutanten im Vergleich zu ihren Wildtypkontrollen weisen auf eine selektive Beeinflussung sowohl der Leistung des Kurzzeitgedächtnis als auch des Langzeitgedächtnis hin.

Die Auswertungen der Objektexplorationen (Diskriminationsindex und Objektdiskriminierung) beider Tests ergab beim Vergleich der Explorationszeiten der 2. Objektpräsentation, dass die Mutanten eine höhere Steigerung des Investigationsverhaltens für das unbekannte Objekt im Bezug auf das bekannte Objekt aus der 1. Objektpräsentation zeigten. Dies deutet auf eine erhöhte Leistung in der Objektwiedererkennung hin. Die Erhöhung in der Wiedererkennungsfähigkeit von bekannten Objekten zeigte sich sowohl bei dem Wiedererkennungstest bezüglich der Leistung des Langzeit- als auch des Kurzzeit-gedächtnisses. Leider konnte noch nicht genau eruiert werden, welche spezifischen Gehirnareale und Schaltkreise am Wiedererkennungsprozess beteiligt sind. Es wird allerdings vermutet, dass die Erinnerung an ein bereits bekanntes Objekt als eine Form des assoziativen Lernens in höheren Cortexarealen gespeichert wird und die Interaktion verschiedener corticaler und limbisch-thalischer Schaltkreise bedingt (Mishkin, 1978). Dabei scheint der perirhinale Cortex eine essentielle Rolle zu spielen (Murray et Mishkin, 1998), ebenso wie eine

adäquate Aktivierung des PFC und des Thalamus. Ein Zielgebiet des Dopamins der VTA ist bei dem mesocorticalen System der PFC, welcher die entscheidende Aufgabe der Steuerung exekutiver Funktionen, wie Aufmerksamkeitskontrolle und Arbeitsgedächtnis, besitzt. Das Arbeitsgedächtnis steuert Verhalten und Aufmerksamkeit, inhibiert unangebrachte Antworten und hält die Aufmerksamkeit auch beim Einwirken von Störfaktoren aufrecht. Studien belegen, dass der PFC nicht nur ein wichtiges Verbindungsglied zwischen sensorischer und viszeromotorischer Aktivität darstellt, sondern auch eine entscheidende Rolle in der Informationsverarbeitung spielt. Zu hohe oder geringe Dopaminspiegel führen zu kognitiven Defiziten (Sawaguchi et Goldman-Rakic, 1994; Murphy et al., 1996; Zahrt et al., 1997).

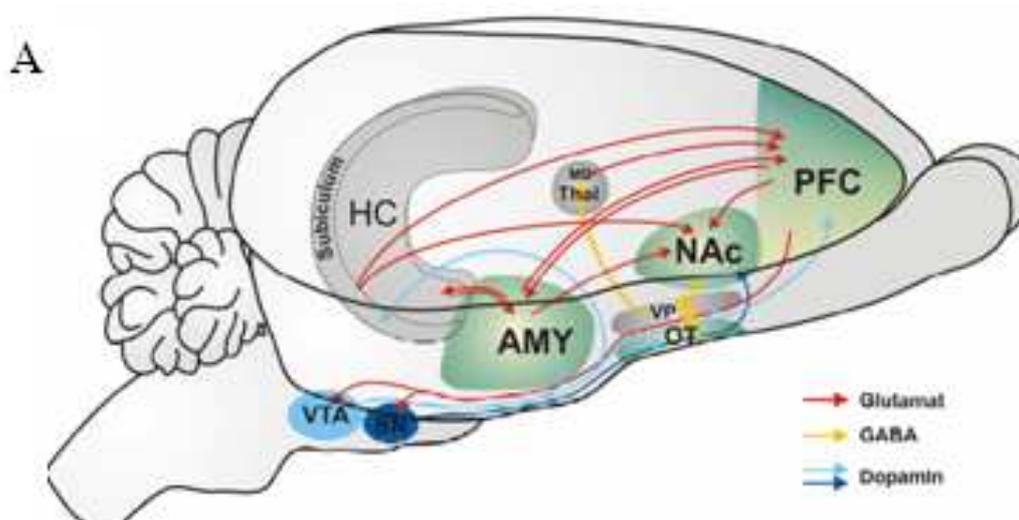


Abb.72 Schematische Darstellung des limbisch-präfrontalen Systems bei Nagern.

Studien belegen, dass dopaminerge Projektionen zum PFC, Hippocampus und Septum eine wichtige Rolle im Rahmen der Leistungen der Objektwiedererkennung spielen und eine erhöhte Freisetzung von Dopamin im PFC beispielsweise zu Defiziten in diesem Bereich führt (Murphy et al., 1996; Jentsch et al., 1997). So liegt der unter NMDAR-Antagonisten, beispielsweise MK-801, beobachtete reduzierte Leistung der Objektwiedererkennung (Terranova et al., 1996) wahrscheinlich eine erhöhte Dopaminausschüttung dopaminerge Neuronen zugrunde. Dies wird vermutlich durch den fehlenden exzitatorischen Input inhibitorischer Projektionen auf dopaminerge Neuronen verursacht.

Diese Studien werden durch die Hypothese bekräftigt, dass die „DATCreErt2-NR1“-Mausmutanten auf Grund der geringeren dopaminergen Transmission in den PFC eine bessere Leistung in der Objektwiedererkennung zeigen. Da der funktionslose NMDAR hypothetisch nur auf den dopaminergen Neuronen lokalisiert ist, kommt es wahrscheinlich zu einem vorwiegend inhibitorischen Input durch GABAerge Neuronen der VTA auf deren dopaminerge Neuronen. Dies führt vermutlich zu einer geringeren Dopaminfreisetzung im PFC.

#### **4.6 Emotionales Verhalten**

Wie bereits einleitend erwähnt, stellen das EPM und der Test in der Hell-Dunkel-Box weit verbreitete Modelle zur Messung des unkontingierten angstassoziierten Verhalten der Nagetiere dar (Carobrez et Bertoglio, 2005).

So zeigen die „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten im erhöhten Plus-Labyrinth gegenüber ihren Wildtypkontrollen einen Trend, sich vermehrt in den „geschlossenen“ Armen aufzuhalten, was für ein erhöhtes angstassoziiertes Verhalten spricht. Bei den anderen untersuchten Parametern in diesem Test, wie dem Herabbeugen des Kopfes und der Risikobewertung, zeigen die Mutanten hingegen eine Reduktion der Verhaltensweisen, was ebenfalls als Anzeichen einer erhöhten Ängstlichkeit gewertet werden kann. Auch die Ergebnisse des Tests in der Hell-Dunkel-Box lassen auf ein erhöhtes Angstverhalten schließen, da die Zeit bis zum ersten Betreten aus dem geschützten dunkleren Kompartiment in das offene, hellere Kompartiment, bei den Mausmutanten im Vergleich zu den Kontrollmäusen deutlich erhöht war

Studien belegen, dass Pharmaka, die beim Menschen Angst induzieren, bei Versuchen mit Nagetieren im EPM zu einer Reduktion der Aufenthaltsdauer und der Eintritte in die „offenen“ Arme, ebenso wie zu einer Reduktion des Herabbeugens des Kopfes und der Risikobewertung, führen. Im Gegensatz dazu führen Anxiolytika zu dem umgekehrten Verhalten (Pelloiw et al., 1985a et 1985b et 1986).

Angst ist zunächst einmal eine adäquate Reaktion auf eine bedrohliche Situation und sichert somit das Überleben. Folge ist eine Aktivierung sympatischer Nervenfasern, wodurch die Transmitter Adrenalin und Noradrenalin vermehrt ausgeschüttet werden, der Körper in einen Alarmzustand versetzt wird. Dabei kommt es zu einer erhöhten Aufmerksamkeit, Mydriasis,

Tachycardie und Tachypnoe. Man unterscheidet zwischen dem konditionierten und dem unkonditionierten angstbezogenen Verhalten. Das Verhalten, erhöhte, helle Areale zu meiden, stellt hierbei eine Form des unkonditionierten angstassoziierten Verhaltens dar, welches sich evolutiv entwickelt hat und somit artspezifisch ist. Es ist genetisch bestimmt und durch Umwelteinflüsse und Erfahrungen lediglich modifiziert (Gross et Hen, 2004a et 2004b). Das für die Angstenstehung hauptverantwortliche Hirnareal stellt die Amygdala dar (Abb.73), welche für die aversive-emotionale Reizverarbeitung und deren Übersetzung in eine adäquate endokrinologische, vegetative und verhaltensmotorische Antwort zuständig ist.

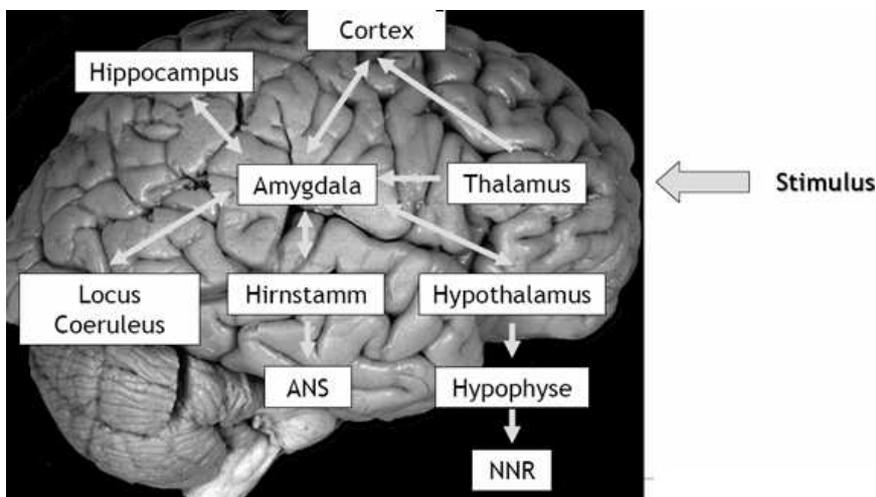


Abb.73 An der Angstenstehung beteiligte Hirnstrukturen.

Intrazerebrale Microinfusionsstudien belegen, dass NMDAR-Antagonisten auch anxiolytische Effekte im EPM, einem Test für unkonditioniertes angstbezogenes Verhalten, bewirken (Guimaraes et al., 1991; Vasar et al., 1993a). Eine verstärkte Ängstlichkeit konnte bei Tieren mit Läsionen im medialen PFC beobachtet werden, was den regulatorischen Einfluss des medialen PFC auf die Amygdala und deren wichtige Rolle bei der Verarbeitung von Angst und Furcht zuzuschreiben ist (Grace et Rosenkranz, 2002). Amygdala und PFC, welche über die VTA dopaminerg innerviert werden, sind über glutamaterge Projektionsbahnen reziprok verbunden (McDonald et al., 1996; Pitkanen et al., 2000), wobei ihre Interaktion eine essentielle Rolle für die Bildung emotionalen Verhaltens spielt (Bertolucci-D'Angio et al., 1990; Morgan et al., 1993; Rosenkranz et Grace, 2001). Über den genauen Wirkungsmechanismus von Dopamin auf die Amygdala ist bis heute nur sehr wenig bekannt (Pralong et al., 2002). Der PFC wiederum ist mit der VTA und der Amygdala reziprok verbunden (McDonald et al., 1996), was eine gegenseitige Beeinflussung der Strukturen

wahrscheinlich macht. Bei einer Dysfunktion des PFC fehlt die übergeordnete Kontrollfunktion, eine adäquate Reaktion auf ungefährliche Reize ist nicht mehr möglich (Morgan et al., 1993; Zahrt et al., 1997). Studien mit isoliert aufgezogenen Ratten und Mäusen zeigten eine um circa 50 Prozent verminderte Reifung der mesopräfrontalen Dopaminfasern im medialen PFC (Winterfeld et al., 1998) und als typische Verhaltensweise das „social isolation syndrom“ und die Tendenz, ungeschützte Flächen des EPM zu meiden. Diese Studie bekräftigt die Hypothese, dass gesteigertes angstassoziiertes Verhalten auf eine verminderte dopaminerge Transmission der VTA in den PFC zurückzuführen ist. Vermutlich kommt es durch die induzierte NR1-Deletion und den damit funktionslosen NMDARs der dopaminergen Neuronen der VTA dazu, dass auf Grund des dadurch erhöhten GABAergen Inputs weniger Dopamin im PFC freigesetzt wird.

#### **4.7 PPI der ASR**

Wie bereits einleitend erwähnt, führen plötzliche und starke akustische Reize bei Säugetieren zu einem schützenden Verhalten, der ASR. Eine Modulationsmöglichkeit, um die adäquate motorische Verhaltensanpassung zu untersuchen, ist die PPI. Darunter wird die natürliche Reduktion der ASR auf eine Präsentation eines Präpulses kurz vor dem eigentlichen Schreckreiz verstanden.

Die „DATCreERT2-NR1“- Mausmutanten zeigten weder bei der ASR noch bei der PPI einen signifikanten Verhaltensunterschied zu den Wildtypkontrollen. Die induzierte Gendelektion der NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 bei dopaminergen Neuronen bewirkte keine Störung der sensomotorischen Informationsverarbeitung, die mittels PPI untersucht wurde. Es gab somit keine Unterschiede der natürlichen Reduktion der ASR durch Präsentation eines Präpulses kurz vor der ASR bei dem Vergleich der Mausmutanten mit ihren Wildtypkontrollen. Dies steht im Widerspruch zu der Hypothese, dass eine induzierte Deletion der NR1-Untereinheit von NMDAR auf dopaminergen Neuronen der VTA zu einer geringeren Dopaminausschüttung im NcA führt. Eine große Anzahl von Studien belegt nämlich den immensen Einfluss der dopaminergen Neurotransmission im NcA auf die sensomotorische Integration. Dabei werden sensorische Afferenzen und motorische Efferenzen zur Erzeugung eines bestimmten Verhaltens verknüpft. Der akustische Schreckreiz wird über sensomotorische Filtermechanismen der Situation angepasst. Es kommt beispielsweise zur Abschwächung der akustisch ausgelösten Schreckreaktion durch einen davor dargebotenen Präpuls. Durch

die neuronale Hemmschleife werden Reize, die nach dem Präpuls eingehen, unterdrückt, so dass der Präpuls ohne Störung verarbeitet werden kann. Dies stellt somit einen Schutz vor Reizüberflutung dar. Mittels einer acetylcholinergen Bahn wird eine inhibitorische Wirkung der PPI von dem PPTg auf den caudalen Kern der pontinen Formatio retikularis übertragen (Koch et al., 1993a et 1993b).

Der cortico-limbisch-striato-pallido-pontine Schaltkreis (Abb.74; rotes Rechteck) ist vermutlich für die Regulation der PPI zuständig. Der NcA spielt, wie schon erwähnt, dabei eine wichtige Rolle als Zwischenstation für die Interaktion corticaler und limbischer Regionen mit dem PPTg, indem er glutamaterge Afferenzen vom Hippocampus, der Amygdala und dem PFC sowie dopaminerge Afferenzen der VTA erhält. Über direkte und indirekte Bahnen, mittels VP, GABAerge Projektionen zum PPTg beeinflusst der NcA die Hemmung der primären Schreckbahn (Koch et Schnitzler, 1997; Koch, 1999).

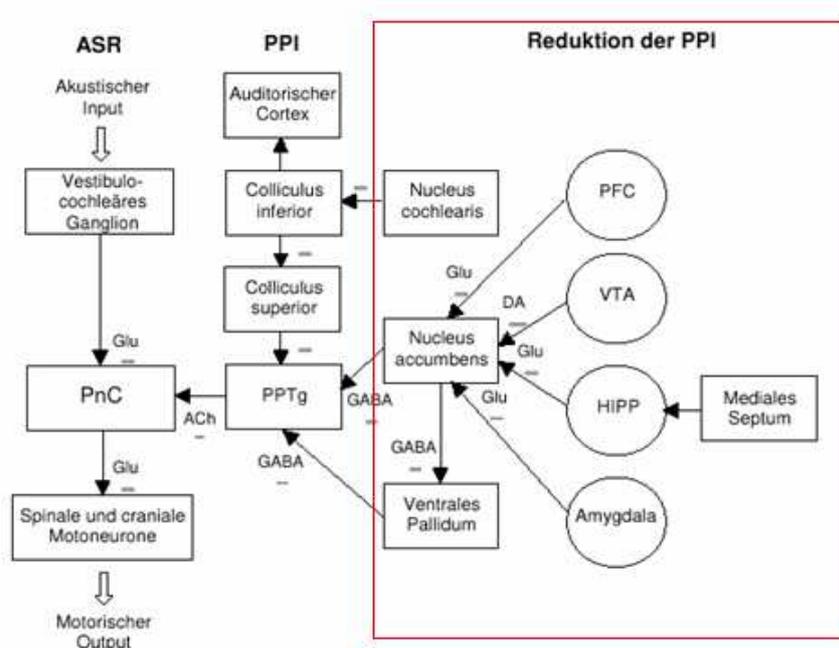


Abb.74 Neuronaler Schaltkreis der primären akustischen Schreckreaktion (ASR), der Präpulsinhibition (PPI), sowie Reduktionsmöglichkeiten der PPI (roter Kasten).

So kann ein PPI-Defizit im Tierversuch beispielsweise durch Blockade mit einem nicht-kompetitiven NMDAR-Antagonisten, mittels PCP oder Dizocilpin, induziert werden (Geyer et al., 2001; Koch, 1999; Swerdlow et al., 1990a et 1990b). Aber auch die „NR1-hypomorphen“-Mausmutanten, mit etwa 90 prozentiger Reduktion der Expression der NR1-Untereinheit des

NMDAR zeigten eine Reduktion der PPI der ASR (Duncan et al., 2006). Als Ursache wird eine erhöhte Dopaminausschüttung wahrscheinlich vor allem im NcA vermutet. Auch soziale Manipulationen wie beispielsweise präpubertäre soziale Isolation (Greene et al., 2001), Trennung von der Mutter für einen Tag (Ellenbroek et al., 2000; Van den BM et al., 2003) oder Störungen neuronaler Kreisläufe durch Läsionen des Hippocampus (Lipska et al., 1995), des NcA (Wan et Swerdlow, 1997) oder PPTg (Koch et al., 1993a et 1993b; Swerdlow et Geyer, 1993) können ein PPI Defizit hervorrufen. Diese lässt sich experimentell nachweisen (Braff et al., 2001 ). Die PPI ist ein einfaches operationales Modell zur Messung der Funktion eines zentralen Filtermechanismus zur Unterdrückung inadäquater sensorischer und motorischer Ereignisse. Studien belegen, dass diese Verhaltensanpassung durch Stimulation der dopaminergen Neurotransmission im NcA massiv inhibiert werden kann. Der NcA übt einen verminderten GABAergen Einfluß auf das nachgeschaltete Pallidum internum aus (Swerdlow et al., 1990b et 1990c; Wan et Swerdlow, 1997; Kopsi et Swerdlow, 1997). Dies führt zu einer verminderten Reduktion der ASR-Amplitude. Durch Dopaminrezeptoragonisten ist diese Reduktion reversibel (Geyer, 1998; Swerdlow et Geyer, 1998), ein Effekt, der vor allem über D2-Rezeptoren vermittelt wird. Eine direkte Reduktion dopaminergener Transmission mittels D1- oder D2-Antagonisteninfusion in den PFC oder eine dort induzierte Läsion mittels 6-Hydroxydopamin, führt ebenfalls zu einer PPI-Reduktion (Bubser et Koch, 1994; Zavitsanou et al., 1999). Eine Studie konnte zeigen, dass Läsionen im mPFC ebenfalls mit einer Erhöhung der PPI verbunden sind (Lacroix et al., 2000). Als Ursache wird vermutet, dass dies über eine Störung der cortikalen glutamatergen Efferenzen zur VTA vermittelt wird, was eine verringerte Dopaminfreisetzung im NcA bewirken würde. Dadurch käme es zu einer verbesserten PPI, was auch hypothetisch bei unseren Tieren auf Grund der verminderten Dopaminfreisetzung der VTA im NcA zu erwarten gewesen wäre.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Charakterisierung des Phänotyps einer Mausmutante mit konditionaler Deletion (Tamoxifen induziert) der NMDA Rezeptoruntereinheit NR1 in dopaminergen Neuronen anhand verschiedener Verhaltenstests vorgenommen.

Die adulten „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten zeigten bei den nach der tamoxifeninduzierten Deletion der NR1-Untereinheit des NMDAR durchgeführten Tests abweichende Verhaltensreaktionen im Vergleich zu ihren tamoxifenbehandelten Wildtypkontrollen. So war die Lokomotion der Mausmutanten gegenüber ihren tamoxifenbehandelten Kontrollen deutlich reduziert, im Erinnerungsvermögen sowohl des Kurz- als auch des Langzeitgedächtnisses zeigten sie hingegen bessere Fähigkeiten als die Wildtypen. In verschiedenen Tests konnte ein leicht gesteigertes angstassoziiertes Verhalten beobachtet werden. Bei der sozialen Interaktion mit einem „juvenilen“ Sozialpartner zeigten die „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten im „social interaction“ Test eine starke Reduktion des Explorations- und Kontaktverhaltens ebenso wie bei dem Verhalten Nester zu bauen.

Als hypothetische Ursache für die oben beschriebenen Verhaltensänderungen der „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten kann eine verminderte Dopaminausschüttung in die Terminalgebiete des mesostriatalen Systems, vor allem dem NcA, und dem mesolimbokortikalen System, vor allem dem PFC und limbischen System, vermutet werden. Auf Grund der induzierten Deletion der NR1-Untereinheiten der NMDARs auf DAT-spezifischen Neuronen wird angenommen, dass diese Rezeptoren auf dopaminergen Neuronen funktionslos sind. Dadurch kommt es vermutlich zu einem verminderten exzitatorischen Input dopaminergener Neuronen vor allem in der SNc und der VTA. Der gesteigerte inhibitorische Input dieser dopaminergen Neuronen würde somit hypothetisch eine verminderte Dopaminausschüttung in den oben genannten Terminalgebieten nach sich ziehen. Ob es allerdings tatsächlich zu der vermuteten verminderten glutamatergen Aktivierung dopaminergener Neuronen mit nachfolgender verminderten Dopaminausschüttung in den Terminalgebieten kommt, müssen Mikrodialyseanalysen zeigen.

Bei der PPI der ASR zeigte sich zwischen den „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten und deren Wildtypkontrollen kein signifikanter Unterschied, obwohl die hypothetisch angenommene verminderte Dopaminausschüttung im NcA theoretisch eine Verbesserung der PPI bewirken müsste.

Das Gewicht der Mausmutanten war im Vergleich zu den Wildtypen signifikant reduziert. Eine mögliche Erklärung könnte die Reduktion der dopaminregulierten, lebenserhaltenden, nicht belohnungsbedingten Futteraufnahme sein. Dies würde die Hypothese bekräftigen, dass die „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten einen funktionslosen NMDAR auf dopaminergen Neuronen besitzen und somit auch weniger Dopamin in den Terminalregionen freigesetzt würde. Auch dies muss beispielsweise durch Mikrodialysestudien untersucht werden, da auch ein erhöhter Metabolismus der Mäuse als Ursache in Betracht kommt.

Da das glutamaterge System an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen im ZNS beteiligt ist, ist seine genaue Funktion von großem Interesse in der Grundlagenforschung. Durch dieses Mausmodell ist es somit möglich, die Funktion der NR1-Untereinheit des NMDAR sowohl zellspezifisch, als auch zeitspezifisch zu untersuchen. Diese konditionale Gendeletion bietet sich an, wenn man die Genfunktion nur in einem bestimmten zellbeziehungsweise gewebsspezifischen Ort untersuchen möchte, um die primäre Funktion eines Zielgens in einem bestimmten Zell- beziehungsweise Gewebetypen explizit bestimmen zu können. Möchte man Gene in Bereichen ausschneiden, die essentiell für die Entwicklung sind, nutzt man induzierbare Knockouts. Bei der NR1-Untereinheit des NMDARs handelt es sich um einen essentiellen Faktor bei der Gehirnentwicklung. Eine klassische Nullmutation führt zum Tod der Tiere. Die Induzierbarkeit der NR1-Deletion auf dopaminergen Neuronen durch Tamoxifen macht einen solchen Modellorganismus für die Forschung erst möglich. Die genauen biochemischen Prozesse, die zu den beobachteten spezifischen Verhaltensmustern der „DATCreERT2-NR1“-Mausmutanten führten, müssen allerdings beispielsweise durch Mikrodialysestudien noch genau abgeklärt werden.

## 6. SUMMARY

The glutaminergic system is involved in numerous physiological processes of the CNS. “DATCreERT2-NR1”-mice have a tamoxifen-inducible deletion of the NR1-subunit of NMDA receptors in dopaminergic neurons and offer insight into its primary functions. This gene is, however, essential for the development of the brain. Hence inducible knockout models have to be used to study the gene function in adult mice.

In this study, the phenotype of tamoxifen-induced adult “DATCreERT2-NR1” mice was characterized. Various behavioural tests revealed differences of tamoxifen-induced “DATCreERT2-NR1”-mice compared to the tamoxifen-induced wild type. The locomotion of the mutant mice was significantly reduced, short- and long-term memory, however, was significantly higher. The anxiety related behaviour was slightly increased. Social interactions (exploration, social contact) with juvenile partners and nest building were strongly reduced. It was hypothesized that that these behaviour changes in “DATCreERT2-NR1”-mice are caused by a reduced dopamine release in the terminal areas of the mesostriatal system (i.e. the nucleus accumbens) and the mesolimbic-cortical system (i.e. prefrontal cortex) and the limbic system. The dopaminergic receptors in DAT-specific neurons are supposed to be non-functional due to the deletion of the NR1-subunit. This will reduce the excitation of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta and the ventral tegmental area and hence the dopamine release will be reduced in these terminal areas.

The PPI of the ASR show no significant differences between the “DATCreERT2-NR1”-mice and the wild type, although hypothetical assumed an improvement in the PPI.

The body weight of the “DATCreERT2-NR1”-mice were significant reduced compared to the wild type. This may be the result of a reduction of the live-sustaining, non-reward-conditioned feed uptake, which is dopamine-regulated. This is consistent with the hypothesis of a non-functional NMDA receptor in dopaminergic neurons of “DATCreERT2-NR1”-mice. An alternative hypothesis would be an increased metabolism of the mutant mice. Either hypothesis needs verification (e.g. microdialysis studies).

It remains, however, to be demonstrated (e.g. by microdialysis studies) that lower glutamatergic activation of dopaminergic neurons leads to a reduced dopamine release.

---

## 7. ABKÜRZUNGEN

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AC</b>	Adenylatzyklase
<b>ADHD</b>	Aufmerksamkeits-Defizit/ Hyperaktivitäts-Syndrom
<b>Amyg</b>	Amygdala
<b>AMPA R</b>	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure-Rezeptor
<b>ASR</b>	akustisch ausgelöste Schreckreaktion
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>CaMK II</b>	Calcium Kalmodulinkinase II
<b>cAMP</b>	cyclische Adenosinmonophosphat
<b>COMT</b>	Catechol-O-Methyltransferase
<b>Cre-Rekombinase</b>	Causes recombination Rekombinase
<b>CPu</b>	Nucleus caudatus und Putamen
<b>C-Terminus</b>	Carboxyl-Terminus
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure
<b>DA</b>	Dopamin
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>DAT</b>	Dopamintransporter
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DOPA</b>	L-Dihydroxyphenylalanin
<b>DOPAC</b>	Dihydroxyphenylelessigsäure
<b>Dopamin</b>	Dihydroxyphenylethylamin
<b>EC</b>	entorhinaler Cortex
<b>ER</b>	endoplasmatisches Retikulum
<b>ERT</b>	Östrogenrezeptor
<b>EAAT</b>	exzitatorischer Aminosäure-Transporter
<b>EPSP</b>	exzitatorische postsynaptische Membranpotential
<b>Gi</b>	inhibitorisches G-Protein
<b>GABA</b>	$\gamma$ -Aminobuttersäure
<b>GPe/ GPi</b>	Globus pallidus externus/ internus
<b>Glu</b>	Glutamat
<b>GluR</b>	Glutamat-Rezeptor
<b>G-Protein</b>	Guanylnukleotid bindendes Protein
<b>GS</b>	Stimmulierendes G-Protein

<b>HIPP</b>	Hippocampus
<b>HSVtk</b>	Thymidinkinase des Herpes simplex Virus
<b>HVA</b>	Homovanillinsäure
<b>HSVtk</b>	Thymidinkinase des Herpes simplex Virus
<b>iGluR</b>	Ionotroper Glutamatrezeptor
<b>IP3</b>	Inositoltriphosphat
<b>IPSP</b>	Inhibitorisches postsynaptisches Membranpotential
<b>kDA</b>	Kilodalton
<b>LBD</b>	Ligandenbindungsdomäne
<b>LoxP</b>	Locus of crossover x aus dem Bakteriohagen P1
<b>LDT</b>	Nucleus laterodorsalis tegmentalis
<b>LTP</b>	Long Term Ptentation
<b>MED</b>	Mediale meduläre Formatio reticularis des Hirnstamms
<b>mGluR</b>	Metabotroper Glutamatrezeptor
<b>MOA-A;MOA-B</b>	Monoaminoxidase A und B
<b>MT</b>	Mausmutante
<b>3MT</b>	3-Methoxytyramin
<b>NcA</b>	Nucleus accumbens
<b>Ncl</b>	Nucleus
<b>NMDAR</b>	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
<b>NR1+</b>	Funktionsfähige NR1-Untereinheit des NMDA-R
<b>NR1-</b>	Funktionsunfähige NR1-untereinheit des NMDA-R
<b>N-Terminus</b>	Aminoterninale Ende
<b>ÖR</b>	Östrogenrezeptor
<b>OHT</b>	4-Hydroxytamoxifen
<b>P [*]</b>	Irrtumswahrscheinlichkeit
<b>PFC</b>	präfrontal Cortex
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PnC</b>	Nucleus reticularis pontis caudalis
<b>PPI</b>	Prepulsinhibition
<b>PPN</b>	Pedunculo pontiner Nucleus
<b>PPTg</b>	pedunculo potiner tegmentaler Kern
<b>S.E.M.</b>	Standardfehler des Mittelwerts
<b>SNc</b>	Substantia nigra pars compacta

<b>SNr</b>	Substantia nigra pars reticularis
<b>SPL</b>	Sound pressure level
<b>STN</b>	Nucleus subthalamicus
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>VMTA</b>	Vesikuläre Monoamintransporter
<b>VP</b>	ventrales Pallidum
<b>VTA</b>	Area tegmentalis ventralis
<b>WT</b>	Wildtypen
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

## 8. Literatur

- Abremski K, Hoess R, Sternberg N** (1983) Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32:1301-1311.
- Adriani W, Sargolini F, Coccorello R, Oliverio A, Mele A** (2000) Role of dopaminergic system in reactivity to spatial and non-spatial changes in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 150:67-76.
- Aizman O, Brismar H, Uhlen P, Zettergren E, Levey AI, Forssberg H, Greengard P, Aperia A** (2000) Anatomical and physiological evidence for D1 and D2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons. *Nat Neurosci* 3:226-230.
- Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N** (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol* 347:150-160.
- Alagarsamy S, Marino MJ, Rouse ST, Gereau RW, Heinemann SF, Conn PJ** (1999a) Activation of NMDA receptors reverses desensitization of mGluR5 in native and recombinant systems. *Nat Neurosci* 2:234-240.
- Alagarsamy S, Rouse ST, Gereau RW, Heinemann SF, Smith Y, Conn PJ** (1999b) Activation of N-methyl-D-aspartate receptors reverses desensitization of metabotropic glutamate receptor, mGluR5, in native and recombinant systems. *Ann N Y Acad Sci* 868:526-530.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL** (1986) Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9:357-381.
- Almers W, Tse FW** (1990) Transmitter release from synapses: does a preassembled fusion pore initiate exocytosis? *Neuron* 4:813-818.
- Anantharam V, Panchal RG, Wilson A, Kolchine VV, Treistman SN, Bayley H** (1992) Combinatorial RNA splicing alters the surface charge on the NMDA receptor. *FEBS Lett* 305:27-30.
- Asztely F, Gustafsson B** (1996) Ionotropic glutamate receptors. Their possible role in the expression of hippocampal synaptic plasticity. *Mol Neurobiol* 12:1-11.
- Ayalon G, Stern-Bach Y** (2001b) Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* 31:103-113.
- Ayalon G, Stern-Bach Y** (2001a) Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* 31:103-113.
- Beck JA, Lloyd S, Hafezparast M, Lennon-Pierce M, Eppig JT, Festing MF, Fisher EM** (2000) Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet* 24:23-25.

**Belzung C, Le Guisquet AM, Barreau S, Calatayud F** (2001) An investigation of the mechanisms responsible for acute fluoxetine-induced anxiogenic-like effects in mice. *Behav Pharmacol* 12:151-162.

**Bence AK, Rogers DT, Worthen DR, Fu M, Littleton JM, Crooks PA** (2000) Aminoanthraquinones as novel ligands at the polyamine binding site on the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Bioorg Med Chem Lett* 10:2621-2623.

**Bertolucci-D'Angio M, Serrano A, Driscoll P, Scatton B** (1990) Involvement of mesocorticolimbic dopaminergic systems in emotional states. *Prog Brain Res* 85:405-416.

**Bjorklund A, Dunnett SB** (2007a) Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 30:194-202.

**Bjorklund A, Dunnett SB** (2007b) Fifty years of dopamine research. *Trends Neurosci* 30:185-187.

**Bjorklund A, Lindvall O, Nobin A** (1975) Evidence of an incerto-hypothalamic dopamine neurone system in the rat. *Brain Res* 89:29-42.

**Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E** (2000) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 62:63-88.

**Bleich S, Spilker K, Kurth C, Degner D, Quintela-Schneider M, Javaheripour K, Ruther E, Kornhuber J, Wiltfang J** (2000) Oxidative stress and an altered methionine metabolism in alcoholism. *Neurosci Lett* 293:171-174.

**Bliss TV, Gardner-Medwin AR** (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:357-374.

**Bliss TV, Lomo T** (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232:331-356.

**Bouras C, Schulz P, Constantinidis J, Tissot R** (1986) Differential effects of acute and chronic administration of haloperidol on substance P and enkephalins in diverse rat brain areas. *Neuropsychobiology* 16:169-174.

**Braff DL, Geyer MA, Light GA, Sprock J, Perry W, Cadenhead KS, Swerdlow NR** (2001) Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Schizophr Res* 49:171-178.

**Brocard J, Feil R, Chambon P, Metzger D** (1998) A chimeric Cre recombinase inducible by synthetic, but not by natural ligands of the glucocorticoid receptor. *Nucleic Acids Res* 26:4086-4090.

- Brocard J, Warot X, Wendling O, Messaddeq N, Vonesch JL, Chambon P, Metzger D** (1997) Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14559-14563.
- Bubser M, Koch M** (1994) Prepulse inhibition of the acoustic startle response of rats is reduced by 6-hydroxydopamine lesions of the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 113:487-492.
- Buller AL, Monaghan DT** (1997) Pharmacological heterogeneity of NMDA receptors: characterization of NR1a/NR2D heteromers expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 320:87-94.
- Carlsson A, Waters N, Carlsson ML** (1999) Neurotransmitter interactions in schizophrenia-therapeutic implications. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249 Suppl 4:37-43.
- Carlsson M, Carlsson A** (1990) Schizophrenia: a subcortical neurotransmitter imbalance syndrome? *Schizophr Bull* 16:425-432.
- Carobrez AP, Bertoglio LJ** (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1193-1205.
- Carr DB, Sesack SR** (2000) Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J Neurosci* 20:3864-3873.
- Chen BT, Rice ME** (2002) Synaptic regulation of somatodendritic dopamine release by glutamate and GABA differs between substantia nigra and ventral tegmental area. *J Neurochem* 81:158-169.
- Chen L, Huang LY** (1992) Protein kinase C reduces Mg<sup>2+</sup> block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature* 356:521-523.
- Chergui K, Nomikos GG, Mathe JM, Gonon F, Svensson TH** (1996) Burst stimulation of the medial forebrain bundle selectively increase Fos-like immunoreactivity in the limbic forebrain of the rat. *Neuroscience* 72:141-156.
- Chergui K, Suaud-Chagny MF, Gonon F** (1994) Nonlinear relationship between impulse flow, dopamine release and dopamine elimination in the rat brain in vivo. *Neuroscience* 62:641-645.
- Ciliax BJ, Heilman C, Demchyshyn LL, Pristupa ZB, Ince E, Hersch SM, Niznik HB, Levey AI** (1995) The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *J Neurosci* 15:1714-1723.
- Claudi F, Di SA, Napolitani F, Cingolani GM, Giorgioni G, Fontenla JA, Montenegro GY, Rivas ME, Rosa E, Michelotto B, Orlando G, Brunetti L** (2000) Binding and preliminary evaluation of 5-hydroxy- and 10-hydroxy-2,3, 12,12a-tetrahydro-1H-[1]benzoxepino[2,3,4-ij]isoquinolines as dopamine receptor ligands. *J Med Chem* 43:599-608.

- Collingridge GL, Lester RA** (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41:143-210.
- Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM** (1989) Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 32:777-785.
- Cousin MA, Robinson PJ** (1999) Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent dyes. *J Neurochem* 73:2227-2239.
- Coyle JT, Puttfarcken P** (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262:689-695.
- Crossman AR** (1989) Neural mechanisms in disorders of movement. *Comp Biochem Physiol A* 93:141-149.
- Danbolt NC** (1994) The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog Neurobiol* 44:377-396.
- Danbolt NC** (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Danysz W, Parsons AC** (1998) Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev* 50:597-664.
- Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT, Jr., Bates MD, Caron MG** (1990) Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347:72-76.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF** (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51:7-61.
- Doetschman T, Gregg RG, Maeda N, Hooper ML, Melton DW, Thompson S, Smithies O** (1987) Targetted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330:576-578.
- Dunah AW, Yasuda RP, Luo J, Wang Y, Prybylowski KL, Wolfe BB** (1999) Biochemical studies of the structure and function of the N-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptors. *Mol Neurobiol* 19:151-179.
- Duncan GE, Moy SS** (2006) Effects of haloperidol, clozapine, and quetiapine on sensorimotor gating in a genetic model of reduced NMDA receptor function. *Psychopharmacology* 184:190-200.
- Ellenbroek BA, Cools AR** (2000) Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. *Behav Pharmacol* 11:223-233.
- Elmquist JK, Elias CF, Saper CB** (1999) From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22:221-232.
- Ennaceur A, Delacour J** (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res* 31:47-59.

- Falkenburger BH, Barstow KL, Mintz IM** (2001) Dendrodendritic inhibition through reversal of dopamine transport. *Science* 293:2465-2470.
- Fallon JH** (1981) Collateralization of monoamine neurons: mesotelencephalic dopamine projections to caudate, septum, and frontal cortex. *J Neurosci* 1:1361-1368.
- Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P** (1996a) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10887-10890.
- Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P** (1996b) Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10887-10890.
- Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, Nicola SM** (2007) Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annu Rev Neurosci* 30:289-316.
- File SE, Zangrossi H, Jr., Viana M, Graeff FG** (1993) Trial 2 in the elevated plus-maze: a different form of fear? *Psychopharmacology (Berl)* 111:491-494.
- Forrest D, Yuzaki M, Soares HD, Ng L, Luk DC, Sheng M, Stewart CL, Morgan JI, Connor JA, Curran T** (1994) Targeted disruption of NMDA receptor 1 gene abolishes NMDA response and results in neonatal death. *Neuron* 13:325-338.
- Freed C, Revay R, Vaughan RA, Kriek E, Grant S, Uhl GR, Kuhar MJ** (1995) Dopamine transporter immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 359:340-349.
- Gainetdinov RR, Jones SR, Fumagalli F, Wightman RM, Caron MG** (1998) Re-evaluation of the role of the dopamine transporter in dopamine system homeostasis. *Brain Res Brain Res Rev* 26:148-153.
- Gainetdinov RR, Wetsel WC, Jones SR, Levin ED, Jaber M, Caron MG** (1999) Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. *Science* 283:397-401.
- Galli-Taliadoros LA, Sedgwick JD, Wood SA, Korner H** (1995) Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice. *J Immunol Methods* 181:1-15.
- Garcia-Otin AL, Guillou F** (2006) Mammalian genome targeting using site-specific recombinases. *Front Biosci* 11:1108-1136.
- Geyer MA** (1998) Behavioral studies of hallucinogenic drugs in animals: implications for schizophrenia research. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 2:73-79.
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR** (2001) Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 156:117-154.
- Gnegy ME** (2000) Ca<sup>2+</sup>/calmodulin signaling in NMDA-induced synaptic plasticity. *Crit Rev Neurobiol* 14:91-129.

- Gomez J, Joly C, Kuhn R, Knopfel T, Bockaert J, Pin JP** (1996a) The second intracellular loop of metabotropic glutamate receptor 1 cooperates with the other intracellular domains to control coupling to G-proteins. *J Biol Chem* 271:2199-2205.
- Gomez J, Mary S, Brabet I, Parmentier ML, Restituto S, Bockaert J, Pin JP** (1996b) Coupling of metabotropic glutamate receptors 2 and 4 to G alpha 15, G alpha 16, and chimeric G alpha q/i proteins: characterization of new antagonists. *Mol Pharmacol* 50:923-930.
- Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH** (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:7380-7384.
- Grace AA** (2000) Gating of information flow within the limbic system and the pathophysiology of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 31:330-341.
- Grace AA, Bunney BS** (1984a) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* 4:2877-2890.
- Grace AA, Bunney BS** (1984b) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. *J Neurosci* 4:2866-2876.
- Grace AA, Rosenkranz JA** (2002) Regulation of conditioned responses of basolateral amygdala neurons. *Physiol Behav* 77:489-493.
- Greene JR, Kerkhoff JE, Guiver L, Totterdell S** (2001) Structural and functional abnormalities of the hippocampal formation in rats with environmentally induced reductions in prepulse inhibition of acoustic startle. *Neuroscience* 103:315-323.
- Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV** (1996) The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? *Prog Brain Res* 107:485-511.
- Groenewegen HJ, Wright CI, Uylings HB** (1997) The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia. *J Psychopharmacol* 11:99-106.
- Gross C, Hen R** (2004a) Genetic and environmental factors interact to influence anxiety. *Neurotox Res* 6:493-501.
- Gross C, Hen R** (2004b) The developmental origins of anxiety. *Nat Rev Neurosci* 5:545-552.
- Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K** (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265:103-106.
- Guimaraes FS, Carobrez AP, De Aguiar JC, Graeff FG** (1991) Anxiolytic effect in the elevated plus-maze of the NMDA receptor antagonist AP7 microinjected into the dorsal periaqueductal grey. *Psychopharmacology (Berl)* 103:91-94.
- Gurney K, Prescott TJ, Redgrave P** (2001) A computational model of action selection in the basal ganglia. II. Analysis and simulation of behaviour. *Biol Cybern* 84:411-423.

- Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A** (2001) A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 27:322-326.
- Hamilton DL, Abremski K** (1984) Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol* 178:481-486.
- Handley SL, Mithani S** (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 327:1-5.
- Hausser MA, Yung WH** (1994) Inhibitory synaptic potentials in guinea-pig substantia nigra dopamine neurones in vitro. *J Physiol* 479 ( Pt 3):401-422.
- Headley PM, Grillner S** (1990) Excitatory amino acids and synaptic transmission: the evidence for a physiological function. *Trends Pharmacol Sci* 11:205-211.
- Heimer L, Zahm DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohltmann C** (1991) Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41:89-125.
- Hirata K, Mogenson GJ** (1984) Inhibitory response of pallidal neurons to cortical stimulation and the influence of conditioning stimulation of substantia nigra. *Brain Res* 321:9-19.
- Hirata K, Yim CY, Mogenson GJ** (1984) Excitatory input from sensory motor cortex to neostriatum and its modification by conditioning stimulation of the substantia nigra. *Brain Res* 321:1-8.
- Hode Y, Ratomponirina C, Gobaille S, Maitre M, Kopp C, Misslin R** (2000) Hypoexpression of benzodiazepine receptors in the amygdala of neophobic BALB/c mice compared to C57BL/6 mice. *Pharmacol Biochem Behav* 65:35-38.
- Hollmann M, Heinemann S** (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Hong JS, Yoshikawa K, Kanamatsu T, Sabol SL** (1985) Modulation of striatal enkephalinergic neurons by antipsychotic drugs. *Fed Proc* 44:2535-2539.
- Horvitz JC** (2002) Dopamine gating of glutamatergic sensorimotor and incentive motivational input signals to the striatum. *Behav Brain Res* 137:65-74.
- Hoshi E, Tremblay L, Feger J, Carras PL, Strick PL** (2005) The cerebellum communicates with the basal ganglia. *Nat Neurosci* 8:1491-1493.
- Hurd YL, Ungerstedt U** (1989) Influence of a carrier transport process on in vivo release and metabolism of dopamine: dependence on extracellular Na<sup>+</sup>. *Life Sci* 45:283-293.
- Ikeda SR** (1996) Voltage-dependent modulation of N-type calcium channels by G-protein beta gamma subunits. *Nature* 380:255-258.
- Ingram SL, Prasad BM, Amara SG** (2002) Dopamine transporter-mediated conductances increase excitability of midbrain dopamine neurons. *Nat Neurosci* 5:971-978.

**Iravani MM, Kruk ZL** (1996) Real-time effects of N-methyl-D-aspartic acid on dopamine release in slices of rat caudate putamen: a study using fast cyclic voltammetry. *J Neurochem* 66:1076-1085.

**Ito I, Futai K, Katagiri H, Watanabe M, Sakimura K, Mishina M, Sugiyama H** (1997) Synapse-selective impairment of NMDA receptor functions in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 or epsilon 2 subunit. *J Physiol* 500 ( Pt 2):401-408.

**Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG** (1996) Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 35:1503-1519.

**Jentsch JD, Andrusiak E, Tran A, Bowers MB, Jr., Roth RH** (1997) Delta 9-tetrahydrocannabinol increases prefrontal cortical catecholaminergic utilization and impairs spatial working memory in the rat: blockade of dopaminergic effects with HA966. *Neuropsychopharmacology* 16:426-432.

**Joel D, Weiner I** (2000) The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum. *Neuroscience* 96:451-474.

**Johnson SW, Seutin V, North RA** (1992) Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: role of electrogenic sodium pump. *Science* 258:665-667.

**Jones HM, Pilowsky LS** (2002) Dopamine and antipsychotic drug action revisited. *Br J Psychiatry* 181:271-275.

**Jones S, Stewart M, Michie A, Swindells MB, Orengo C, Thornton JM** (1998a) Domain assignment for protein structures using a consensus approach: characterization and analysis. *Protein Sci* 7:233-242.

**Jones SR, Gainetdinov RR, Jaber M, Giros B, Wightman RM, Caron MG** (1998b) Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4029-4034.

**Joyce JN, Millan MJ** (2005) Dopamine D3 receptor antagonists as therapeutic agents. *Drug Discov Today* 10:917-925.

**Justice JB, Jr., Nicolaysen LC, Michael AC** (1988) Modeling the dopaminergic nerve terminal. *J Neurosci Methods* 22:239-252.

**Kalani MY, Vaidehi N, Hall SE, Trabanino RJ, Freddolino PL, Kalani MA, Floriano WB, Kam VW, Goddard WA, III** (2004) The predicted 3D structure of the human D2 dopamine receptor and the binding site and binding affinities for agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3815-3820.

**Kebabian JW, Calne DB** (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93-96.

- Kelley AE, Domesick VB** (1982) The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: an anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience* 7:2321-2335.
- Kelley AE, Domesick VB, Nauta WJ** (1982) The amygdalostriatal projection in the rat--an anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods. *Neuroscience* 7:615-630.
- Kim JH, Huganir RL** (1999) Organization and regulation of proteins at synapses. *Curr Opin Cell Biol* 11:248-254.
- Kleckner NW, Dingledine R** (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241:835-837.
- Koch M** (1999) The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 59:107-128.
- Koch M, Kungel M, Herbert H** (1993b) Cholinergic neurons in the pedunclopontine tegmental nucleus are involved in the mediation of prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat. *Exp Brain Res* 97:71-82.
- Koch M, Kungel M, Herbert H** (1993a) Cholinergic neurons in the pedunclopontine tegmental nucleus are involved in the mediation of prepulse inhibition of the acoustic startle response in the rat. *Exp Brain Res* 97:71-82.
- Koch M, Schmid A, Schnitzler HU** (2000) Role of nucleus accumbens dopamine D1 and D2 receptors in instrumental and Pavlovian paradigms of conditioned reward. *Psychopharmacology (Berl)* 152:67-73.
- Koch M, Schnitzler HU** (1997) The acoustic startle response in rats--circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav Brain Res* 89:35-49.
- Kodsi MH, Swerdlow NR** (1997) Reduced prepulse inhibition after electrolytic lesions of nucleus accumbens subregions in the rat. *Brain Res* 773:45-52.
- Komuro H, Rakic P** (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260:95-97.
- Kornhuber J, Bleich S, Wiltfang J, Maler M, Parsons CG** (1999) Flupirtine shows functional NMDA receptor antagonism by enhancing Mg<sup>2+</sup> block via activation of voltage independent potassium channels. Rapid communication. *J Neural Transm* 106:857-867.
- Kristensen HK, Lau YY, Ewing AG** (1994) Capillary electrophoresis of single cells: observation of two compartments of neurotransmitter vesicles. *J Neurosci Methods* 51:183-188.
- Lacroix L, Spinelli S, White W, Feldon J** (2000) The effects of ibotenic acid lesions of the medial and lateral prefrontal cortex on latent inhibition, prepuls inhibition and amphetamine-induced hyperlocomotion. *Neuroscience* 97:459-468.
- Laurie DJ, Seeburg PH** (1994) Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci* 14:3180-3194.

**Leonard AS, Hell JW** (1997) Cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C phosphorylate N-methyl-D-aspartate receptors at different sites. *J Biol Chem* 272:12107-12115.

**Li M, Indra AK, Warot X, Brocard J, Messaddeq N, Kato S, Metzger D, Chambon P** (2000) Skin abnormalities generated by temporally controlled RXRalpha mutations in mouse epidermis. *Nature* 407:633-636.

**Li Y, Erzurumlu RS, Chen C, Jhaveri S, Tonegawa S** (1994) Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. *Cell* 76:427-437.

**Lipska BK, Swerdlow NR, Geyer MA, Jaskiw GE, Braff DL, Weinberger DR** (1995) Neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats causes post-pubertal changes in prepulse inhibition of startle and its disruption by apomorphine. *Psychopharmacology (Berl)* 122:35-43.

**Lipska BK, Weinberger DR** (2000) To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 23:223-239.

**Lobe CG, Nagy A** (1998) Conditional genome alteration in mice. *Bioessays* 20:200-208.

**Logie C, Stewart AF** (1995) Ligand-regulated site-specific recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5940-5944.

**Lowenstein PR, Joyce JN, Coyle JT, Marshall JF** (1990a) Striosomal organization of cholinergic and dopaminergic uptake sites and cholinergic M1 receptors in the adult human striatum: a quantitative receptor autoradiographic study. *Brain Res* 510:122-126.

**Lowenstein PR, Joyce JN, Coyle JT, Marshall JF** (1990b) Striosomal organization of cholinergic and dopaminergic uptake sites and cholinergic M1 receptors in the adult human striatum: a quantitative receptor autoradiographic study. *Brain Res* 510:122-126.

**Lummis SC, Fletcher EJ, Green T** (2002) Identification of a new site in the S1 ligand binding region of the NMDA receptor NR2A subunit involved in receptor activation by glutamate. *Neuropharmacology* 42:437-443.

**Lynch C.B.** (1992) Clinal variation in cold adaption in *Mus domesticus*: verification of predictions from laboratory populations. *Am Nat* 139: 1219-1236.

**Lynch DR, Guttman RP** (2001) NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Curr Drug Targets* 2:215-231.

**Lynch DR, Guttman RP** (2002) Excitotoxicity: perspectives based on N-methyl-D-aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 300:717-723.

**MacDermott AB, Mayer ML, Westbrook GL, Smith SJ, Barker JL** (1986) NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* 321:519-522.

- Mack A, Sauer B, Abremski K, Hoess R** (1992) Stoichiometry of the Cre recombinase bound to the lox recombining site. *Nucleic Acids Res* 20:4451-4455.
- Magazanik LG, Bol'shakov KV, Buldakova SL, Gmiro VE, Dorofeeva NA, Lukomskaya NY, Potap'eva NN, Samoilova MV, Tikhonov DB, Fedorova IM, Frolova EV** (2002) Structural characteristics of ionotropic glutamate receptors as identified by channel blockade. *Neurosci Behav Physiol* 32:173-182.
- Maren S, Baudry M** (1995) Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol Learn Mem* 63:1-18.
- Margolis EB, Lock H, Hjelmstad GO, Fields HL** (2006) The ventral tegmental area revisited: is there an electrophysiological marker for dopaminergic neurons? *J Physiol* 577:907-924.
- Masuko T, Kuno T, Kashiwagi K, Kusama T, Williams K, Igarashi K** (1999) Stimulatory and inhibitory properties of aminoglycoside antibiotics at N-methyl-D-aspartate receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 290:1026-1033.
- Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M** (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res* 100:43-52.
- Mayer ML, Westbrook GL** (1987) Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol* 394:501-527.
- McDonald AJ** (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* 55:257-332.
- McDonald AJ, Mascagni F, Guo L** (1996) Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience* 71:55-75.
- McDonald JW, Johnston MV** (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev* 15:41-70.
- Meddows E, Le BB, Grimwood S, Wafford K, Sandhu S, Whiting P, McIlhinney RA** (2001) Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 276:18795-18803.
- Meldrum BS** (2000) Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130:1007S-1015S.
- Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P** (1995) Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6991-6995.

- Metzger D, Feil R** (1999) Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol* 10:470-476.
- Mills A** (1992) Dopamine: from Cinderella to Holy Grail. *Trends Pharmacol Sci* 13:399-400.
- Mishkin M** (1978) Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature* 273:297-298.
- Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG** (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY** (1980) From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol* 14:69-97.
- Mogenson GJ, Nielsen M** (1984a) Neuropharmacological evidence to suggest that the nucleus accumbens and subpallidal region contribute to exploratory locomotion. *Behav Neural Biol* 42:52-60.
- Mogenson GJ, Nielsen M** (1984b) Neuropharmacological evidence to suggest that the nucleus accumbens and subpallidal region contribute to exploratory locomotion. *Behav Neural Biol* 42:52-60.
- Mohn AR, Gainetdinov RR** (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98:427-436.
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH** (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529-540.
- Moreadith RW, Radford NB** (1997) Gene targeting in embryonic stem cells: the new physiology and metabolism. *J Mol Med* 75:208-216.
- Morgan MA, Romanski LM, LeDoux JE** (1993) Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett* 163:109-113.
- Moye J** (1997) Nonverbal memory assessment with designs: construct validity and clinical utility. *Neuropsychol Rev* 7:157-170.
- Murphy BL, Arnsten AF, Goldman-Rakic PS, Roth RH** (1996) Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1325-1329.
- Murray EA, Mishkin M** (1998) Object recognition and location memory in monkeys with excitotoxic lesions of the amygdala and hippocampus. *J Neurosci* 18:6568-6582.
- Nagy A** (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109.
- Nagy A, Mar L** (2001) Creation and use of a Cre recombinase transgenic database. *Methods Mol Biol* 158:95-106.

- Nakanishi S** (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597-603.
- Nakazawa K, Sun LD, Quirk MC, Rondi-Reig L, Wilson MA, Tonegawa S** (2003) Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. *Neuron* 38:305-315.
- Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC** (2000) Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185-215.
- Nomura A, Shigemoto R, Nakamura Y, Okamoto N, Mizuno N, Nakanishi S** (1994) Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell* 77:361-369.
- O'Donnell P, Grace AA** (1998) Dysfunctions in multiple interrelated systems as the neurobiological bases of schizophrenic symptom clusters. *Schizophr Bull* 24:267-283.
- oit-Marand M, Jaber M, Gonon F** (2000) Release and elimination of dopamine in vivo in mice lacking the dopamine transporter: functional consequences. *Eur J Neurosci* 12:2985-2992.
- Omkumar RV, Kiely MJ, Rosenstein AJ, Min KT, Kennedy MB** (1996) Identification of a phosphorylation site for calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 271:31670-31678.
- Ottersen OP, Landsend AS** (1997) Organization of glutamate receptors at the synapse. *Eur J Neurosci* 9:2219-2224.
- Palmer GC** (2001) Neuroprotection by NMDA receptor antagonists in a variety of neuropathologies. *Curr Drug Targets* 2:241-271.
- Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM** (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300:611-615.
- Pan HS, Penney JB, Young AB** (1985) Gamma-aminobutyric acid and benzodiazepine receptor changes induced by unilateral 6-hydroxydopamine lesions of the medial forebrain bundle. *J Neurochem* 45:1396-1404.
- Panchenko VA, Glasser CR, Mayer ML** (2001) Structural similarities between glutamate receptor channels and K(+) channels examined by scanning mutagenesis. *J Gen Physiol* 117:345-360.
- Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Le GA, Callebaut I, Neyton J** (2000) Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* 28:911-925.
- Pearce IA, Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD** (1987) Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Lett* 223:143-147.

- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M** (1985b) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149-167.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M** (1985a) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14:149-167.
- Pellow S, File SE** (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24:525-529.
- Perez-Velazquez JL, Zhang L** (1994) In vitro hypoxia induces expression of the NR2C subunit of the NMDA receptor in rat cortex and hippocampus. *J Neurochem* 63:1171-1173.
- Perin-Dureau F, Rachline J, Neyton J, Paoletti P** (2002) Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *J Neurosci* 22:5955-5965.
- Picciotto MR, Wickman K** (1998) Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. *Physiol Rev* 78:1131-1163.
- Pin JP, Bockaert J** (1995) Get receptive to metabotropic glutamate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 5:342-349.
- Pin JP, Duvoisin R** (1995a) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
- Pin JP, Duvoisin R** (1995b) The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1-26.
- Pitkanen A, Pikkarainen M, Nurminen N, Ylinen A** (2000) Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* 911:369-391.
- Platenik J, Kuramoto N, Yoneda Y** (2000) Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals. *Life Sci* 67:335-364.
- Pralong E, Magistretti P, Stoop R** (2002) Cellular perspectives on the glutamate-monoamine interactions in limbic lobe structures and their relevance for some psychiatric disorders. *Prog Neurobiol* 67:173-202.
- Pujic Z, Matsumoto I, Wilce PA** (1993) Expression of the gene coding for the NR1 subunit of the NMDA receptor during rat brain development. *Neurosci Lett* 162:67-70.
- Rajan I, Cline HT** (1998) Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo. *J Neurosci* 18:7836-7846.
- Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K** (1999) The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience* 89:1009-1023.
- Rosenkranz JA, Grace AA** (2001) Dopamine attenuates prefrontal cortical suppression of sensory inputs to the basolateral amygdala of rats. *J Neurosci* 21:4090-4103.

**Rossi DJ, Slater NT** (1993) The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology* 32:1239-1248.

**Rudolph U, Mohler H** (1999) Genetically modified animals in pharmacological research: future trends. *Eur J Pharmacol* 375:327-337.

**Russell TA, Rubia K, Bullmore ET, Soni W, Suckling J, Brammer MJ, Simmons A, Williams SC, Sharma T** (2000) Exploring the social brain in schizophrenia: left prefrontal underactivation during mental state attribution. *Am J Psychiatry* 157:2040-2042.

**Sakai T, Johnson KJ, Murozono M, Sakai K, Magnuson MA, Wieloch T, Cronberg T, Isshiki A, Erickson HP, Fassler R** (2001) Plasma fibronectin supports neuronal survival and reduces brain injury following transient focal cerebral ischemia but is not essential for skin-wound healing and hemostasis. *Nat Med* 7:324-330.

**Salamone JD, Cousins MS, Snyder BJ** (1997) Behavioral functions of nucleus accumbens dopamine: empirical and conceptual problems with the anhedonia hypothesis. *Neurosci Biobehav Rev* 21:341-359.

**Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS** (1994) The role of D1-dopamine receptor in working memory: local injections of dopamine antagonists into the prefrontal cortex of rhesus monkeys performing an oculomotor delayed-response task. *J Neurophysiol* 71:515-528.

**Sawchenko PE** (1998) Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. *J Comp Neurol* 402:435-441.

**Schacter GB, Yang CR, Innis NK, Mogenson GJ** (1989a) The role of the hippocampal-nucleus accumbens pathway in radial-arm maze performance. *Brain Res* 494:339-349.

**Schacter GB, Yang CR, Innis NK, Mogenson GJ** (1989b) The role of the hippocampal-nucleus accumbens pathway in radial-arm maze performance. *Brain Res* 494:339-349.

**Schmidt WJ** (1998) Dopamine-glutamate interactions in the basal ganglia. *Amino Acids* 14:5-10.

**Schwenk F, Kuhn R, Angrand PO, Rajewsky K, Stewart AF** (1998) Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice. *Nucleic Acids Res* 26:1427-1432.

**Sesack SR, Carr DB, Omelchenko N, Pinto A** (2003) Anatomical substrates for glutamate-dopamine interactions: evidence for specificity of connections and extrasynaptic actions. *Ann N Y Acad Sci* 1003:36-52.

**Sesack SR, Pickel VM** (1990) In the rat medial nucleus accumbens, hippocampal and catecholaminergic terminals converge on spiny neurons and are in apposition to each other. *Brain Res* 527:266-279.

**Sesack SR, Pickel VM** (1992) Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 320:145-160.

- Shi L, Simpson MM, Ballesteros JA, Javitch JA** (2001) The first transmembrane segment of the dopamine D2 receptor: accessibility in the binding-site crevice and position in the transmembrane bundle. *Biochemistry* 40:12339-12348.
- Shimizu E, Tang YP, Rampon C, Tsien JZ** (2000) NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science* 290:1170-1174.
- Skerry TM, Genever PG** (2001) Glutamate signalling in non-neuronal tissues. *Trends Pharmacol Sci* 22:174-181.
- Smith Y, Bevan MD, Shink E, Bolam JP** (1998) Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia. *Neuroscience* 86:353-387.
- Smith Y, Charara A, Parent A** (1996) Synaptic innervation of midbrain dopaminergic neurons by glutamate-enriched terminals in the squirrel monkey. *J Comp Neurol* 364:231-253.
- Sobolevskii AI, Khodorov BI** (2002) Blocker studies of the functional architecture of the NMDA receptor channel. *Neurosci Behav Physiol* 32:157-171.
- Soriano P** (1995) Gene targeting in ES cells. *Annu Rev Neurosci* 18:1-18.
- Spreng M, Cotecchia S, Schenk F** (2001) A behavioral study of alpha-1b adrenergic receptor knockout mice: increased reaction to novelty and selectively reduced learning capacities. *Neurobiol Learn Mem* 75:214-229.
- Stark H, Grassmann S, Reichert U** (2000) [Structure, function and potential therapeutic possibilities of NMDA receptors. 1. Architecture and modulation of receptors]. *Pharm Unserer Zeit* 29:159-166.
- Steckler T, Drinkenburg WH, Sahgal A, Aggleton JP** (1998) Recognition memory in rats-- I. Concepts and classification. *Prog Neurobiol* 54:289-311.
- Steffensen SC, Svingos AL, Pickel VM, Henriksen SJ** (1998) Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 18:8003-8015.
- Stephenson FA** (2001) Subunit characterization of NMDA receptors. *Curr Drug Targets* 2:233-239.
- Sternberg N, Hamilton D** (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150:467-486.
- Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi S** (1992) Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 185:826-832.
- Swerdlow NR, Braff DL, Masten VL, Geyer MA** (1990a) Schizophrenic-like sensorimotor gating abnormalities in rats following dopamine infusion into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 101:414-420.

- Swerdlow NR, Braff DL, Masten VL, Geyer MA** (1990b) Schizophrenic-like sensorimotor gating abnormalities in rats following dopamine infusion into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 101:414-420.
- Swerdlow NR, Geyer MA** (1993) Prepulse inhibition of acoustic startle in rats after lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus. *Behav Neurosci* 107:104-117.
- Swerdlow NR, Geyer MA** (1998) Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull* 24:285-301.
- Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL** (2001) Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology (Berl)* 156:194-215.
- Swerdlow NR, Mansbach RS, Geyer MA, Pulvirenti L, Koob GF, Braff DL** (1990c) Amphetamine disruption of prepulse inhibition of acoustic startle is reversed by depletion of mesolimbic dopamine. *Psychopharmacology (Berl)* 100:413-416.
- Szczypka MS, Kwok K, Brot MD, Marck BT, Matsumoto AM, Donahue BA, Palmiter RD** (2001) Dopamine production in the caudate putamen restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron* 30:819-828.
- Takahashi T, Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Onodera K** (1996) Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science* 274:594-597.
- Terranova JP, Storme JJ, Lafon N, Perio A, Rinaldi-Carmona M, Le FG, Soubrie P** (1996) Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. *Psychopharmacology (Berl)* 126:165-172.
- Thomas KR, Capecchi MR** (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.
- Thomson AM, Walker VE, Flynn DM** (1989) Glycine enhances NMDA-receptor mediated synaptic potentials in neocortical slices. *Nature* 338:422-424.
- Treit D, Fundytus M** (1988) Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 31:959-962.
- Tsai SJ, Liu HC, Liu TY, Cheng CY, Hong CJ** (2002) Association analysis for genetic variants of the NMDA receptor 2b subunit (GRIN2B) and Parkinson's disease. *J Neural Transm* 109:483-488.
- Tsien JZ** (1998) Behavioral genetics: subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Pathol Biol (Paris)* 46:699-700.
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S** (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87:1327-1338.

- Tsujita M, Mori H, Watanabe M, Suzuki M, Miyazaki J, Mishina M** (1999) Cerebellar granule cell-specific and inducible expression of Cre recombinase in the mouse. *J Neurosci* 19:10318-10323.
- Tucker DM, Luu P, Pribram KH** (1995) Social and emotional self-regulation. *Ann N Y Acad Sci* 769:213-239.
- Vallano ML** (1998) Developmental aspects of NMDA receptor function. *Crit Rev Neurobiol* 12:177-204.
- Vallone D, Picetti R, Borrelli E** (2000) Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 24:125-132.
- van den Pol AN, Gao XB, Patrylo PR, Ghosh PK, Obrietan K** (1998) Glutamate inhibits GABA excitatory activity in developing neurons. *J Neurosci* 18:10749-10761.
- Van den BM, Garner B, Koch M** (2003) Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: effects on prepulse inhibition. *Curr Mol Med* 3:459-471.
- van der NR** (1997) Targeted gene disruption: applications in neurobiology. *J Neurosci Methods* 71:19-27.
- Vasar E, Harro J, Lang A, Soosaar A, Oopik T, Koks S, Sihver S, Volke V** (1993b) Anti-exploratory effect of N-methyl-D-aspartate in elevated plus-maze. Involvement of NMDA and CCK receptors. *Eur Neuropsychopharmacol* 3:63-73.
- Vasar E, Harro J, Lang A, Soosaar A, Oopik T, Koks S, Sihver S, Volke V** (1993a) Anti-exploratory effect of N-methyl-D-aspartate in elevated plus-maze. Involvement of NMDA and CCK receptors. *Eur Neuropsychopharmacol* 3:63-73.
- Wan FJ, Swerdlow NR** (1997) The basolateral amygdala regulates sensorimotor gating of acoustic startle in the rat. *Neuroscience* 76:715-724.
- Wang Y, Krushel LA, Edelman GM** (1996a) Targeted DNA recombination in vivo using an adenovirus carrying the cre recombinase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3932-3936.
- Wang Y, Schnegelsberg PN, Dausman J, Jaenisch R** (1996b) Functional redundancy of the muscle-specific transcription factors Myf5 and myogenin. *Nature* 379:823-825.
- Waterston RH, et al.** (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420:520-562.
- Williams K** (2001) Ifenprodil, a novel NMDA receptor antagonist: site and mechanism of action. *Curr Drug Targets* 2:285-298.
- Winterfeld KT, Teuchert-Noodt G, Dawirs RR** (1998) Social environment alters both ontogeny of dopamine innervation of the medial prefrontal cortex and maturation of working memory in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J Neurosci Res* 52:201-209.

- Wood MW, VanDongen HM, VanDongen AM** (1995) Structural conservation of ion conduction pathways in K channels and glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4882-4886.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte D, Jr., Schwartz MW** (1998) Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 280:1378-1383.
- Xu X, Domino EF** (1994) Phencyclidine-induced behavioral sensitization. *Pharmacol Biochem Behav* 47:603-608.
- Yan GM, Ni B, Weller M, Wood KA, Paul SM** (1994) Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res* 656:43-51.
- Yeomans JS, Frankland PW** (1995) The acoustic startle reflex: neurons and connections. *Brain Res Brain Res Rev* 21:301-314.
- Young WS, III, Bonner TI, Brann MR** (1986) Mesencephalic dopamine neurons regulate the expression of neuropeptide mRNAs in the rat forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9827-9831.
- Zahrt J, Taylor JR, Mathew RG, Arnsten AF** (1997) Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *J Neurosci* 17:8528-8535.
- Zavitsanou K, Cranney J, Richardson R** (1999) Dopamine antagonists in the orbital prefrontal cortex reduce prepulse inhibition of the acoustic startle reflex in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 63:55-61.
- Zeiss CJ** (2005) Neuroanatomical phenotyping in the mouse: the dopaminergic system. *Vet Pathol* 42:753-773.
- Zheng F, Erreger K, Low CM, Banke T, Lee CJ, Conn PJ, Traynelis SF** (2001) Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR2A. *Nat Neurosci* 4:894-901.
- Zhong J, Carrozza DP, Williams K, Pritchett DB, Molinoff PB** (1995) Expression of mRNAs encoding subunits of the NMDA receptor in developing rat brain. *J Neurochem* 64:531-539.
- Zukin RS, Bennett MV** (1995) Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* 18:306-313.

## 9. DANKSAGUNG

Die vorhergehenden Seiten zeigen, dass das zielgerichtete Verhalten essentiell von der Motivation abhängt, welche durch externe Stimuli hervorgerufen werden. Deswegen gilt mein erster Dank all denjenigen, die mich in den letzten Jahren mittels positiver Verstärkung bei dem Gelingen dieser Arbeit unterstützt haben.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. habil. Ammer danke ich für die bereitwillige Übernahme der externen Arbeit an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Ohne Sie wäre diese Promotionsarbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Rainer Spanagel danke ich für die Möglichkeit, auf diesem hochinteressanten Themengebiet forschen zu dürfen und die hervorragende Begleitung während meiner Arbeit.

Frau Dr. Miriam Schneider danke ich besonders für die exzellente Betreuung, ihre Geduld und fachliche Kompetenz, mit der sie mich bei meiner Arbeit begleitete.

Meinen Kolleginnen und meinem Kollegen des Laborgebäudes des Zentralinstitutes für seelische Gesundheit in Mannheim gilt mein besonderer Dank für das tolle Arbeitsklima und die vielen Gespräche, die immer eine schöne Abwechslung zu den Versuchszeiten mit den doch sehr schweigsamen Mäuschen darstellten.

Meiner Freundin Eva und ihrem Mann Robert möchte ich nicht nur für Ihr stets offenes Ohr bei allen meinen Problemen danken, sondern auch für die kompetente linguistische und grammatikalische Korrektur des Manuskripts.

Herrn Dr. Arand danke ich für die abschließende fachlich linguistische und grammatikalische Durchsicht dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund Christoph, der mir in dieser stressigen Zeit nicht nur sehr viel Verständnis für meine Launen entgegenbrachte, sondern mir auch die Kraft und Energie gab auch in schwierigen Situationen nicht aufzugeben.

Ich danke dir für die uneingeschränkte Unterstützung auf unserem gemeinsamen Weg.

Ein herzliches Dankeschön auch an meine Eltern für das Hundehüten, die Ermutigungen und das niemals müde werdende Zuhören auch bei kleinern Problemen.

## 11. ERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt, mich außer den angegebenen keiner anderen Hilfsmittel bedient und alle Stellen, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Karlstadt, 08.09.2009

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Nina Ritsch". The signature is written in a cursive style with some stylized flourishes.