

Charakterisierung und Validierung von ENU-Mausvarianten mit beeinträchtigter Fähigkeit zur Objekterkennung

Dissertation
an der Fakultät für Biologie
der
Ludwig Maximilians Universität München

vorgelegt von
Elke Binder
München, Januar 2004

1.Gutachter:
Prof. Dr. Gerd Schuller

2.Gutachter:
Prof. Dr. George Boyan

Tag der mündlichen Prüfung:
30.04.2004

Der Vorteil des schlechten Gedächtnisses ist,
dass man dieselben guten Dinge mehrere Male
zum ersten Mal genießen kann.

Friedrich Nietzsche

Abkürzungsverzeichnis

BL6	C57BL/6J
C3H	C3HeB/FeJ
CO	Cytochrom c-Oxidase
DAB	Diaminbenzidin
DDVP	2, 2-Dichlorovinyl Dimethyl Phosphat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ENU	Ethyl-Nitroso-Urea
IEG	Immediate Early Gene
mHB	modified hole board
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PVN	Nukleus Paraventricularis
RNS	Ribonukleinsäure
RO	mutante Mauslinie mit reduzierter Objekterkennung
wt	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DIE ENU-METHODE ALS ANSATZ ZUR GENERIERUNG VON TIERMODELLEN.....	1
1.2	VERHALTENSPHÄNOTYPISIERUNG VON ENU-MAUSVARIANTEN	3
1.3	GENOTYPISIERUNG VON ENU-MAUSVARIANTEN.....	5
1.4	KOGNITIVE FUNKTIONEN DES DEKLARATIVEN GEDÄCHTNISSES	5
1.5	ACETYLCHOLINESTERASEHEMMER ZUR VERBESSERUNG DER GEDÄCHTNISLEISTUNG	8
1.6	ZIELSETZUNG.....	9
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	11
2.1	TIERHALTUNG	11
2.2	DAS MHB.....	11
2.2.1	VERHALTENSPARAMETER.....	12
2.3	DER SELEKTIVE OBJEKTERKENNUNGSTEST	16
2.4	DIE PHARMAKOLOGISCHE VALIDIERUNG	18
2.5	RÄUMLICHE LERNKURVE IM MHB.....	19
2.5.1	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG BEI DER RÄUMLICHEN LERNKURVE.....	21
2.6	IMMUNHISTOCHEMIE	22
2.6.1	ENTNAHME UND LAGERUNG DER HIRNE	22
2.6.2	GEHIRNSCHNITTE AM KRYOSTAT	22
2.6.3	IMMUNHISTOCHEMIE ZUR C-FOS ANALYSE	22
2.6.4	AUSWERTUNG DER C-FOS FÄRBUNG.....	23
2.7	STATISTIK	24
3	<u>ERGEBNISSE</u>	25
3.1	CHARAKTERISIERUNG UND PENETRANZ DES VERHALTENSPHÄNOTYPS DER RO-LINIE	25
3.2	DIE SELEKTIVE OBJEKTERKENNUNG	31
3.3	DIE RÄUMLICHE LERNKURVE IM MHB.....	32
3.4	DIE PHARMAKOLOGISCHE VALIDIERUNG	38

Inhaltsverzeichnis	III
3.5 c-Fos ANALYSE NACH DER SELEKTIVEN OBJEKTERKENNUNG.....	40
3.6 DIE KOPPLUNGSANALYSE.....	43
<u>4 DISKUSSION</u>	47
4.1 CHARAKTERISIERUNG UND PENETRANZ DES VERHALTENSPHÄNOTYPS DER RO-LINIE	47
4.1.1 DER VERHALTENSPHÄNOTYP	47
4.1.2 PENETRANZ	48
4.2 DIE SELEKTIVE OBJEKTERKENNUNG	49
4.3 DIE RÄUMLICHE LERNKURVE	50
4.4 DIE PHARMAKOLOGISCHE VALIDIERUNG	52
4.5 DIE ROLLE DES PERIRHINALEN KORTEX IM GEDÄCHTNISSESYSTEM DES TEMPORALLAPPENS	53
4.6 DIE SENSORISCHE WAHRNEHMUNG IM BARREL KORTEX	55
4.7 DIE KOPPLUNGSANALYSE	56
4.8 SCHLUSSBETRACHTUNG	57
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u>	58
<u>6 ANHANG</u>	60
<u>7 LITERATUR</u>	67

1 Einleitung

1.1 Die ENU-Methode als Ansatz zur Generierung von Tiermodellen

Zur Untersuchung der Pathogenese menschlicher Erkrankungen sind Tiermodelle von großer Bedeutung. Mäuse sind hierfür besonders gut geeignet, da sie in ihrer Ontogenese, Physiologie und ihrem Genom dem Menschen sehr ähnlich sind. Des Weiteren hat man bei Mäusen den Vorteil, gezielte Eingriffe in das Genom der Tiere vornehmen zu können (Brown, 1998; Gardier, 2000; Hunter et al., 2000). Nach der Vollendung der Sequenzierung des menschlichen Genoms ist primär die Frage nach der Funktion der einzelnen Gene offen. Im allgemeinen geht man dieser Fragestellung mit genorientierten (*gene-driven*) Methoden nach, wobei man Tiermodelle entwickelte, deren Genmaterial gezielt manipuliert wurde. Diese hypothesenorientierten Ansätze ermöglichten die Entwicklung einer Vielzahl von Tiermodellen, welche einen guten Einblick in die Funktion schon bekannter Gene boten (Champtiaux & Changeux, 2002; Timpl et al., 1998; Contarino et al., 1999). Ein anderer Ansatz zur Analyse von Genfunktionen basiert auf willkürlichen genetischen Manipulationen, z.B. durch radioaktive Strahlung oder mutagene Substanzen. Eine sehr potente mutagene Chemikalie stellt Ethyl-Nitroso-Urea (ENU; Maekawa et al., 1984; Nolan et al., 2000; Hrabé de Angelis et al., 2000) dar. Die mittels ENU induzierten Genmutationen haben den Vorteil, dass es sich hierbei vorwiegend um Punktmutationen handelt, welche nach den Mendelschen Regeln weiter vererbt werden. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, bisher noch unbekannte Gene zu untersuchen. Eine Genmutation wird hierbei ausschließlich auf der Basis eines auffälligen Phänotyps vermutet. Folglich handelt es sich um eine phänotyporientierte (*phenotype-driven*) und hypothesenfreie Methode.

Die Wirkungsweise von ENU beruht auf einer Alkylierung der Basen der Desoxyribonukleinsäure (DNS). Hierbei werden häufig Ethylgruppen an die Sauerstoffatome von Thymin und Guanin angehängt, wobei Ethylguanin bzw. Ethylthymin entstehen. Diese Ethylgruppen sind DNS-Anhänge, welche an sich keine Mutationen darstellen, sondern dazu führen, dass die entsprechenden Basen bei der Zellteilung falsch identifiziert werden. Auf diese Weise wird Ethylguanin als Adenin und Ethylthymin als Cytosin erkannt. Dadurch werden Thymin und Guanin fälschlicherweise komplementär dazu synthetisiert. Nach

einigen Zellteilungen entstehen somit Punktmutationen, die von den DNS-Reparaturmechanismen nicht erkannt werden (Popp et al., 1983; Harbach et al., 1992; Noveroske et al., 1999).

ENU wird intraperitoneal injiziert und verursacht eine drastische Erhöhung der Mutationsrate in den prämeiotischen spermatogenen Stammzellen von männlichen Mäusen (Popp et al., 1983; Russell 1989). Auf diese Weise kommt es pro 700 Gameten zu durchschnittlich einer Genmutation (Balling, 2001). Durch Verpaarung der behandelten männlichen Mäuse mit unbehandelten Weibchen der gleichen Stammlinie (C3HeB/FeJ (C3H)) entsteht eine große Anzahl potentiell mutierter Nachkommen (Nolan et al., 2000; Soewarto et al., 1999). Zur Identifikation phänotypisch interessanter Varianten (ein Tier wird solange als Variante definiert, bis eine Mutation im Genom nachgewiesen werden kann) muss eine zuverlässige und genaue Phänotypisierung bei jedem dieser Nachkommen (F1-Generation) individuell durchgeführt werden. Diese F1-Tiere werden, falls ein auffälliger Phänotyp gefunden wird, als dominante Variante angenommen und direkt weiterverpaart oder andernfalls mit den eigenen Nachkommen (G2) zur Untersuchung von rezessiven Gendefekten gekreuzt (Abbildung 1).

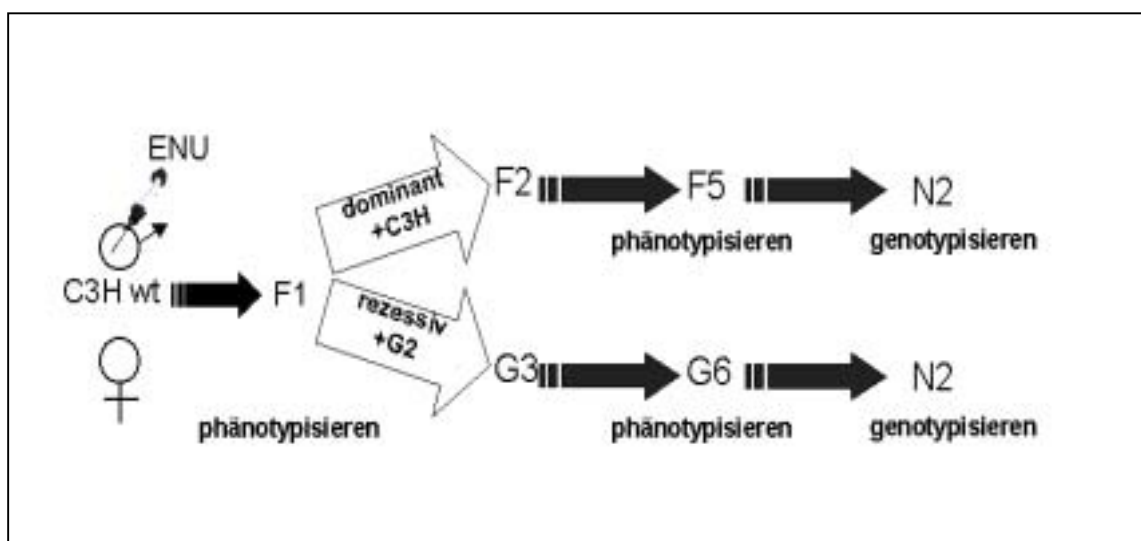


Abbildung 1: Übersicht des Zuchtplans innerhalb des ENU-Projektes.

Primäres Ziel der ENU-Methode ist die Identifikation noch nicht erforschter Kandidatengene. Man erhofft sich dadurch, neben der Entdeckung neuer Zusammenhänge auch Erfolge bei der Behandlung von genetisch bedingten Krankheiten zu erreichen. Des weiteren können relevante Phänotypen zur

Entwicklung neuer Tiermodelle im Rahmen von Erhaltungszuchten etabliert werden. Der Vorteil der ENU-Methode besteht darin, dass die entstehenden Mutationen willkürlich sind, wodurch die Chance, noch nicht bekannte Gene zu identifizieren, steigt. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der großen Anzahl von Tieren, welche generiert werden müssen, da durchschnittlich nur 2 % der Mäuse einen relevanten und stabilen Phänotyp zeigen.

1.2 Verhaltensphänotypisierung von ENU-Mausvarianten

In der Verhaltensphänotypisierung von Nagern ist eine Vielzahl von Verhaltenstests etabliert. Ein Großteil dieser Verhaltensuntersuchungen stützt sich auf nicht erlerntes (unkonditioniertes) Verhalten. In der Regel beschränken sich solche Tests selektiv auf die Untersuchung einer Verhaltensdimension (z.B. Angst, Neugier oder Aggressivität; zur Übersicht siehe Crawley, 2000). Dieser Ansatz ist sinnvoll, wenn man ein spezifisches Verhalten von Tieren basierend auf einer Hypothese analysieren möchte. Dagegen ist es bei einem hypothesenfreien Ansatz nötig, ein Gesamtbild des Verhaltenstyps einer Maus zu untersuchen. Hierbei wird in der Regel eine Reihe von selektiven Tests in einer sogenannten multiplen Testbatterie hintereinander geschaltet. Bei dieser Vorgehensweise sollte jeder Test mit einem naiven Tier durchgeführt werden, da jegliche Vorerfahrung das Verhalten des Individuums modifizieren könnte (Andreatini & Bacellar, 2000; Espejo, 1997). Bei der Verhaltensphänotypisierung im ENU-Projekt kommt dabei erschwerend hinzu, dass die zu untersuchenden Tiere individuell unterschiedliche F1-Mäuse sind. Zur Untersuchung des gesamten Verhaltensmusters eines Tieres müsste jedes einzelne Tier in mehreren selektiven Verhaltenstests analysiert werden. Demzufolge könnten testinduzierte Vorerfahrungen die Zuverlässigkeit der Resultate beeinträchtigen. Zusätzlich ist aufgrund der hohen Tieranzahl ein zeitsparendes Testverfahren nötig. Zur Erfüllung dieser Ansprüche schien es sinnvoll, einen komplexen Verhaltenstest, das *modified Hole Board* (mHB; Ohl et al., 2001a, b), zur Untersuchung von ENU-Mausvarianten einzusetzen. Dieser Test ermöglicht es, einen zuverlässigen Verhaltensphänotyp für jedes einzelne Tier zu erstellen. Eine Vielzahl von Verhaltensdimensionen, wie z.B. Angst, soziale Affinität und Explorationsverhalten können reproduzierbar im mHB gemessen werden (Ohl et al., 2001a, b). Durch Integration eines

Objekterkennungstests ist es zusätzlich möglich, die Gedächtnisleistung eines Tieres einzuschätzen. Aufgrund der Zuverlässigkeit und der multidimensionalen Untersuchungsmöglichkeiten ist das mHB besonders gut als Hochdurchsatzverfahren im Rahmen des ENU-Projektes geeignet.

Um ein Tier als Variante selektieren zu können, muss dessen Verhaltensphänotyp als von der Norm abweichend identifiziert werden können. Statistische Berechnungen ergaben, dass 99% aller Tiere einer normal verteilten Population innerhalb einer Grenze der 2,5-fachen Standardabweichung liegen sollten. Demzufolge können Individuen, deren Verhaltensdaten außerhalb der 2,75-fachen Standardabweichung liegen, nicht mehr einer Normalverteilung zugeordnet werden (Field, 2000). Somit werden für jeden Verhaltensparameter basierend auf dem Verhalten der Wildtyp Linie (wt) Grenzwerte berechnet. An dieser sogenannten *baseline* wird das Verhalten der Varianten gemessen. In der vorliegenden Arbeit konnte nur eine begrenzte Anzahl von wt-Mäusen (n=20) für diese Berechnung getestet werden. Da es hierbei hauptsächlich um eine generelle Überprüfung der Methode gehen sollte, wurde die Berechnung der Grenzwerte innerhalb dieses Projektes auf $2,75/2 \times$ Standardabweichung reduziert. Idealerweise sollten möglichst mehrere Verhaltensparameter einer Verhaltensdimension außerhalb der Grenzwerte liegen, um ein Tier als Variante zu identifizieren. Wird eine Maus aufgrund des ersten, basalen Versuchsdurchlaufs im mHB als abweichend von der Norm eingestuft, muss dieser Phänotyp in einem weiteren Test im mHB, dem Confirmationstest, bestätigt werden. Erst dann wird ein als *founder* bezeichnetes Tier zum Aufbau einer Zuchtlinie herangezogen.

Innerhalb des in München durchgeführten ENU-*screens* wurde mit dieser Methode eine dominante Variante identifiziert, welche sich ausschließlich durch eine reduzierte Objekterkennung (RO) im mHB von den wt-Tieren unterschied. Basierend auf diesem F1-Tier wurde die RO-Linie gegründet. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit sollte diese Linie verhaltenscharakterisiert und validiert werden. Durch pharmakologische Experimente wurde die klinische Relevanz von RO-Tieren als Tiermodell überprüft. Parallel dazu wurde die grobe Genotypisierung bei RO-Mäusen vorgenommen, um die chromosomale Region zu finden, auf der sich die durch ENU verursachte Mutation befinden könnte.

1.3 Genotypisierung von ENU-Mausvarianten

Für die Genotypisierung wurden ENU-Varianten mit Inzuchtmäusen der Linie C57BL/6J (BL6) verpaart und die resultierenden Nachkommen (N1), welche im mHB den Verhaltensphänotyp zeigten, erneut mit BL6 verpaart. Die DNS der daraus hervorgehenden N2-Generation wurde aus Gewebeproben der Tiere extrahiert und für die Genotypisierung verwendet. Da keine Informationen über die Lage der Mutation bei ENU-Mäusen vorhanden sind, wird durch gleichmäßig über das Genom verteilte genetische Marker eine Lokalisierung des mutierten Gens vorgenommen (Griffiths et al. 1999). Diese Marker sind sogenannte Mikrosatelliten, welche aus sehr kurzen repetitiven DNS-Sequenzen bestehen. Mit Hilfe einer Kopplungsanalyse lässt sich statistisch ermitteln, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein Gen und ein nahe gelegener Marker gemeinsam vererbt werden (Griffiths et al. 1999). Je geringer der Abstand zwischen Marker und Gen ist, umso kleiner ist die Chance, dass es bei einer genetischen Rekombination während der Meiose zur Segregation der beiden kommt (Knippers, 2001). Auf diese Weise wird das gesamte Genom der phänotypisierten N2 Nachkommen nach einem heterozygoten Locus durchsucht, der an einen bekannten Marker gekoppelt ist und so mit höchster Wahrscheinlichkeit mit diesem zusammen vererbt wird. Ist dieser Locus bei allen Varianten vorhanden, geht man davon aus, die chromosomale Region der Mutation gefunden zu haben. Durch zusätzliche Marker und DNS Proben weiterer Tiere kann die Region enger eingegrenzt werden, wodurch letztlich eine Identifizierung und Analyse des Kandidatengens möglich ist.

1.4 Kognitive Funktionen des deklarativen Gedächtnisses

In der Literatur ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Benennungen für verschiedene ineinander übergehende Gedächtnissysteme aufgeführt. Bei Experimenten mit Tieren kommt hinzu, dass die Übertragung der unterschiedlichen menschlichen Gedächtnisleistungen auf Tiermodelle eine weitere Schwierigkeit darstellt, die häufig kontrovers diskutiert wird. In der vorliegenden Arbeit wird der Definition von Squire et al. (1994) gefolgt, welche das Gedächtnis in zwei Untergruppen unterteilt haben: das deklarative (explizite) und das nicht-deklarative (implizite) Gedächtnis (Abbildung 2).

Beim Menschen wird das deklarative Gedächtnis als bewusste Erinnerung definiert, welche sich im Tiermodell nicht untersuchen lässt (Squire & Kandel, 1999). Aus dem Grund wurde zunächst, vorwiegend auf der Basis von klassischer Konditionierung, das nicht-deklarative Gedächtnis bei Tieren analysiert.

Im Jahre 1957 wurden in klinischen Beobachtungen des amnestischen Patienten H.M. massive Schädigungen des medialen Temporallappens mit Verlusten des deklarativen Gedächtnisses in Verbindung gebracht (Übersicht Scoville & Milner, 1957). Ende der siebziger Jahre gelangen Mortimer & Mishkin eine Reihe von Experimenten mit Primaten, denen große beidseitige Läsionen im medialen Temporallappen zugefügt wurden. Diese Läsionen riefen bei den Affen eine vergleichbare Symptomatik hervor, wie sie bei amnestischen Patienten typisch ist (Squire & Kandel, 1999).

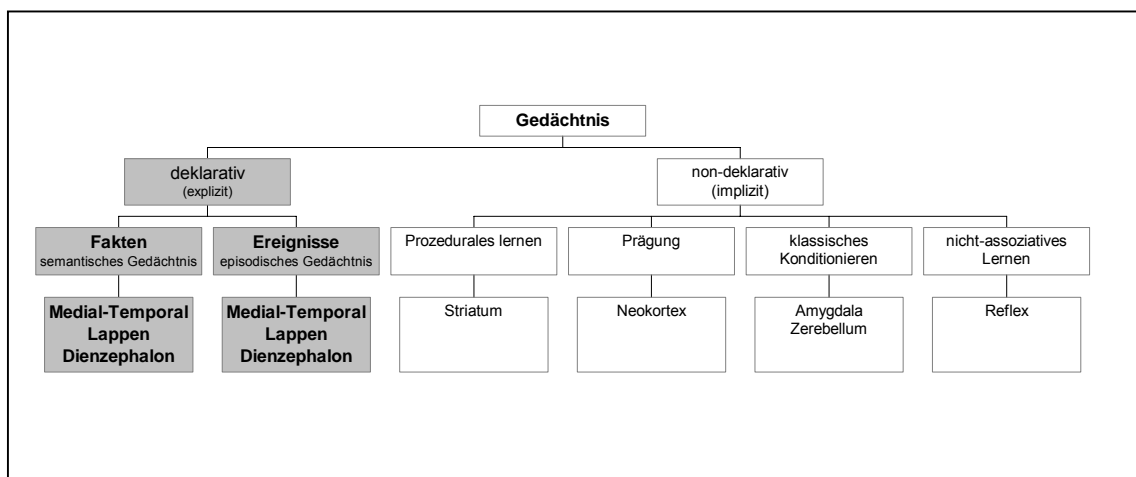


Abbildung 2: Unterteilung unterschiedlicher Gedächtnissysteme und die zugehörigen Gehirnstrukturen, abgeändert nach Squire und Knowlton (1984).

Seitdem wurden viele Experimente entwickelt, um das deklarative Gedächtnis im Tiermodell zu untersuchen. Eine dieser Aufgabenstellungen, bei denen sowohl menschliche Amnestiker als auch im Temporallappen läsionierte Primaten beeinträchtigt sind, stellt der Objekterkennungstest dar (Alvarez et al., 1994; Duva et al., 1999; Squire & Zola, 1998). Bei diesen Experimenten wurden den Tieren in einer Vielzahl von Versuchsdurchgängen ein bekanntes und ein unbekanntes Objekt präsentiert. Nach jeder „richtigen“ Wahl erhielten die Affen eine Futterbelohnung.

1988 wurde der Objekterkennungstest von Ennaceur & Delacour modifiziert und als Test für das deklarative Gedächtnis bei Nagetieren etabliert. Hierbei wurde

nicht das Erlernen einer Regel benötigt, sondern das spontane Explorationsverhalten (Neugier) der Tiere genutzt. Experimente zeigten, dass Ratten wie auch Mäuse während eines einzigen Versuchsdurchganges, in dem sie zwischen einem bekannten und einem unbekanntem Objekt wählen konnten, bevorzugt das unbekanntem Objekt explorierten (Dodart et al., 1997; Bartolini et al., 1996; Vaucher et al., 2002; Sargolini et al., 2002; Ryabinin et al., 2002). Diese Vorgehensweise führte zur Eliminierung von zwei Variablen: der Futterbelohnung und der Anzahl der Versuchsdurchgänge. Daher kann man mit dem Objekterkennungstest selektiv die Fähigkeit der Tiere untersuchen, sich an einen bekannten Stimulus zu erinnern (Ennaceur & Delacour, 1988). Zur weiteren Differenzierung der Funktion der einzelnen Gehirnareale des medialen Temporallappens wurden elektrophysiologische Ableitungen bei Affen wie auch bei Nagetieren während eines Objekterkennungstests durchgeführt. Es zeigte sich eine höhere Feuerungsrate der Neuronen im perirhinalen Kortex als im Hippokampus (Xiang & Brown, 1998; Miller et al., 1993). Diese Ergebnisse wurden durch Studien bestätigt, die immunhistologische Färbemethoden bei Ratten benutzten, um *Immediate Early Genes* (IEGs) in Hirnschnitten zu identifizieren. Dabei wird in der Literatur vorwiegend über das IEG *c-fos* berichtet (Robertson, 1991; Zhang et al., 2002). *C-fos* ist ein Transkriptionsfaktor, welcher nach wenigen Minuten in aktiven Neuronen exprimiert wird. Das daraus hervorgehende Protein c-Fos ist als Indikator für unspezifische neuronale Aktivität im Gehirn nachweisbar. Zhu et al. (1995) führten ein Experiment durch, bei welchem den Ratten entweder ein bekanntes oder ein unbekanntes Bild präsentiert wurde. Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass das unbekanntes Bild eine vermehrte c-Fos Proteinexpression im perirhinalen Kortex und den benachbarten temporalen Hirnarealen, aber nicht im Hippokampus zur Folge hatte (Abbildung 3).

Im Gegensatz dazu konnte bei Tierversuchen, die eine räumliche Komponente enthielten, eine erhöhte neuronale Aktivität im Hippokampus und postrhinalen Kortex, jedoch nicht im perirhinalen Kortex gezeigt werden (Brown & Aggleton, 2001; Vann, et al., 2000; Montero et al., 2001). Diese Untersuchungen zeigten, dass die Objekterkennung einen Test für ein sehr spezifisches Gedächtnissystem darstellt, welches vorwiegend in den kortikalen Hirnarealen des Temporallappens verarbeitet wird.

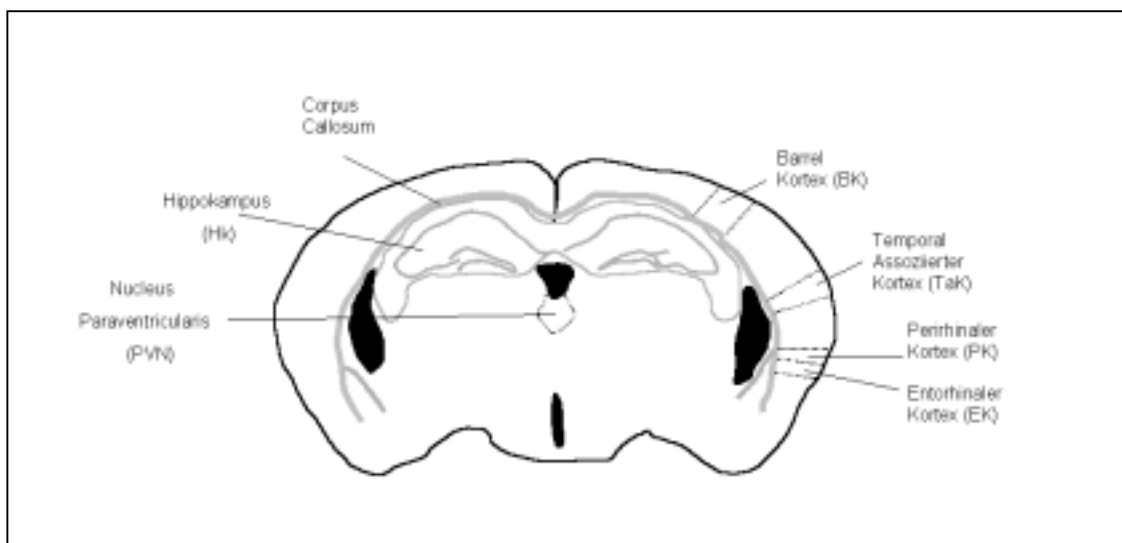


Abbildung 3: Schema eines vertikalen Hirnschnittes der Maus (Paxinos & Franklin 2000).

Da die visuelle Sinneswahrnehmung bei Mäusen der taktilen und olfaktorischen Wahrnehmung weit unterlegen ist, kann man davon ausgehen, dass die Objekterkennung primär von der Sensibilität des Tast- und Geruchssinns bestimmt wird (Artal et al., 1998; Feldman, 2003; 2001; Carvell & Simons, 1990). Die Schnurrhaare, welche feinste Texturunterschiede ertasten können, werden im sogenannten *Barrel* Kortex (Abbildung 3) topographisch repräsentiert. Untersuchungen dieser Hirnregion haben gezeigt, dass eine Stimulation der Schnurrhaare oder die Exploration einer neuen Umgebung zu einer vermehrten c-Fos-Expression führte (Staiger et al., 2002; Melzer & Steiner 1997; Filipkowski et al. 2000). Folglich kann man mit Hilfe immunhistochemischer Methoden die Aktivität während der Wahrnehmung von Objekten und während der Verarbeitung dieser Informationen auf neuronaler Ebene untersuchen. Auf diese Weise ist die differenzierte Einschätzung dieser beiden Teilschritte möglich.

1.5 Acetylcholinesterasehemmer zur Verbesserung der Gedächtnisleistung

Das cholinerge System scheint im Bezug auf Gedächtnissteuerung und gezielte Aufmerksamkeit eine wichtige Einheit im Gehirn von Säugetieren darzustellen (Squire & Davis, 1981; Blokland, 1996). Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass ein Mangel an Acetylcholin und cholinergen Neuronen zu einer reduzierten Lernfähigkeit und verringertem Erinnerungsvermögen führt, wie es z. B. auch bei Alzheimerpatienten zu beobachten ist (Whitehouse et al., 1982; Bowen & Davison,

1983; Bartus et al., 1985; Reinikainen et al., 1990). Zur Behandlung von Morbus Alzheimer und Demenz wurde eine große Anzahl von Medikamenten entwickelt, welche die Konzentration von Acetylcholin im Gehirn erhöht. Die erfolgreichste Methode dabei scheint die Hemmung der Hydrolyse von Acetylcholin durch das Enzym Acetylcholinesterase zu sein (Ikonen et al., 1999; Scali et al., 1997; Liu et al., 2002; Jann, 1998). Die erste Generation dieser Substanzen wurde zur Behandlung von Patienten verwendet, wobei die toxischen Nebenwirkungen relativ hoch waren (Gifford, et al., 1999). Später wurde eine zweite Generation von Acetylcholinesterasehemmern entwickelt, welche gezielt auf das zentrale Nervensystem angewendet werden konnte und weniger Begleiterscheinungen hatte (Giacobini, 1998). Eine dieser Substanzen ist Metrifonate, eine Vorstufe eines Acetylcholinesterasehemmers, welcher bei einem pH-Wert >6 in Dichlorovinyl Dimethyl Phosphat (DDVP) hydrolysiert wird (Nordgren et al. 1978; Holmstedt et al. 1978). Im Gegensatz zu Substanzen, welche den Wirkstoff direkt enthalten, ist die Abbauphase von Metrifonate erheblich länger. Diese Eigenschaft trägt dazu bei, das Metrifonate bevorzugt für Langzeittherapien verwendet wurde, wie sie oft bei dementen Patienten notwendig sind (Jann, 1998; Cummings et al. 2000).

1.6 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung und Validierung der im Objekterkennungstest beeinträchtigten RO-Linie (Abbildung 4). Dazu wurde diese dominante ENU-Mauslinie über sieben Generationen gezüchtet, wobei deren Nachkommen im mHB verhaltensphänotypisiert wurden, um vor allem die Penetranz und Stabilität des Phänotyps über mehrere Generationen zu untersuchen. Zur Validierung des Verhaltensphänotyps von RO-Mäusen wurden diese in selektiven Verhaltenstests analysiert.

Durch weitere Untersuchungen sollte auf neuronaler Ebene das Aktivitätsmuster von RO-Tieren im Vergleich zu wt-Mäusen mittels der Expression des Proteins c-Fos analysiert werden. Zur Überprüfung der klinischen Relevanz von RO-Tieren als Tiermodell wurde eine pharmakologische Validierung mit einem Acetylcholinesterasehemmer durchgeführt.

In Verbindung mit der Genotypisierung der RO-Linie sollte mittels einer Kopplungsanalyse die chromosomale Region der Mutation im Genom ausfindig gemacht werden.

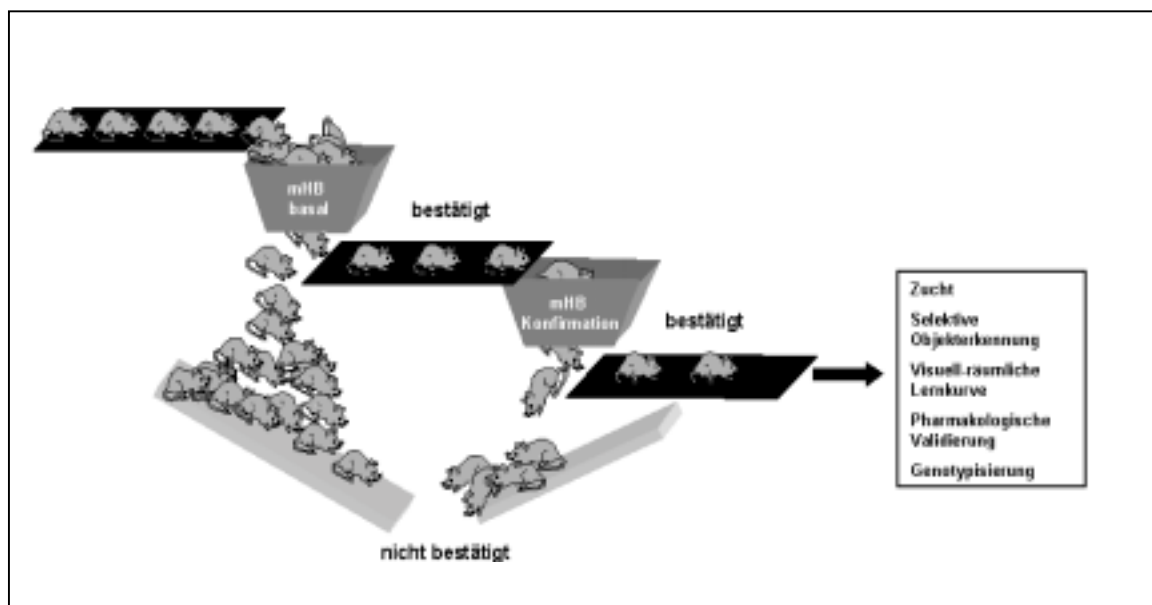


Abbildung 4: Schematische Zusammenfassung der Zielsetzung. Tiere aus der RO-Zucht wurden alle im mHB verhaltensphänotypisiert. Falls sich ein Tier bei dem basalen Test im Phänotyp bestätigte, wurde es eine Woche später zur Konfirmation erneut im mHB getestet. RO-Mäuse, welche sich bei der Konfirmation erneut bestätigten wurden anschließend zur Erhaltung der Zucht oder für selektive Tests verwendet. Nach zweimaliger Auszucht mit BL6 wurden die bestätigten RO-Mäuse genotypisiert.

2 Material und Methoden

2.1 Tierhaltung

Die Mäuse wurden im Max-Planck-Institut für Psychiatrie (München) gezüchtet und getestet. Ursprünglich wurden C57BL/6J (BL6J) und C3HeB/FeJ (C3H) 1996 als Stammlinien von Jackson Laboratorien (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Nach der Geburt blieben alle Nachkommen bis zum Alter von drei Wochen bei der Mutter und wurden anschließend in Plexiglaskäfigen (30 x 20 x 14 cm) zu maximal fünf gleichgeschlechtlichen und gleichaltrigen Tieren gehalten. Wenn es nicht möglich war, reine Geschwistergruppen zu erhalten, wurden auch Tiere aus verschiedenen Würfen zusammengesetzt. Es herrschten standardisierte Haltungsbedingungen (12 Stunden hell-dunkel Zyklus, Licht an um 7.00 Uhr, 22±2 °C Raumtemperatur, 60±5 % Luftfeuchtigkeit). Futterpellets (Altromin 1314, Lage, Deutschland) und Wasser standen nach Bedarf zur Verfügung. Einmal pro Woche, jeweils am gleichen Wochentag pro Raum, wurden alle Tiere in saubere Käfige umgesetzt.

2.2 Das mHB

Das mHB stellt eine Kombination aus *open field* und *hole board* dar. Das *open field* ist ein validierter Verhaltenstest, der die Lokomotion von Nagetieren untersucht (Kelley, 1993). Das *hole board* diente ursprünglich dazu, exploratives Verhalten bei Nagern zu erforschen (File & Wardill, 1975). Mit Hilfe einer modifizierten Variante des *hole boards* konnten kognitive Fähigkeiten von Tupaia analysiert werden (Ohl et al., 1997; Ohl & Fuchs, 1998; Ohl, 1999). Diese modifizierte Version wurde später als komplexer ethologischer Test für Nagetiere etabliert (Ohl et al., 2001a, b). Das *hole board* besteht aus grauem PVC (60 x 20 x 2 cm) mit 23 eingestanzten Löchern (1,5 x 0,5 cm) in drei Reihen, jeweils versetzt angeordnet. Jedes Loch ist mit einem Deckel verschlossen, der aus dem gleichen Material wie das *board* besteht und sich leicht zur Seite wegrehen lässt. Das *board* befindet sich in der Mitte einer PVC *box* (150 x 50 x 50 cm), deren Boden durch graues Klebeband in 12 Rechtecke unterteilt ist (je 15 x 15 cm). Ein Drittel der gesamten *box* wird durch eine Trennwand aus durchsichtigem PVC abgetrennt, welche 120 in Reihen angeordnete Löcher enthält. Dieser Teil der *box*

dient als Gruppenkompartiment, in dem sich während des Versuchs die soziale Gruppe aus dem Heimkäfig befindet (Abbildung 5). Dadurch hat das Versuchstier die Möglichkeit zum olfaktorischen und visuellen Kontakt mit seiner sozialen Gruppe, was erheblich dazu beiträgt, eine stressreduzierte Testsituation herzustellen.

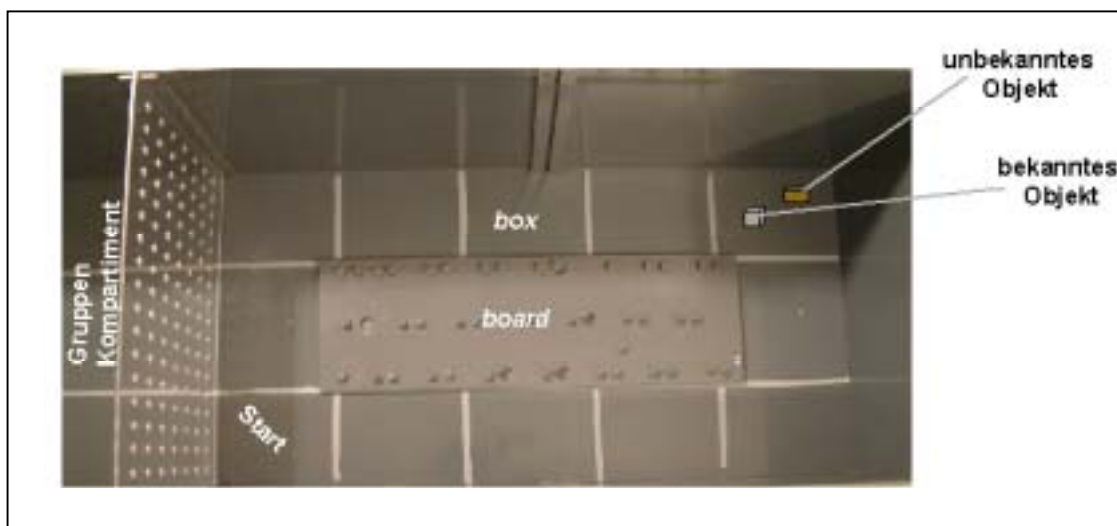


Abbildung 5: Das modified hole board.

2.2.1 Verhaltensparameter

Während eines Versuchsdurchlaufs wurden, der Kategorisierung von Ohl et al. (2001a) entsprechend, folgende Parameter gemessen und bestimmten Verhaltensdimensionen zugeordnet:

Angstverhalten:

Nager tendieren dazu, in einem neuen Areal zuerst an der Wand entlang, d.h. im geschützten Areal (*box*) zu explorieren und erst später die freien Flächen, also das ungeschützte Areal (*board*) zu erforschen (Lister, 1990; Crawley, 2000). Bei Unsicherheit in einer neuen Umgebung tasten sich Nager zaghafte voran und zeigen durch eine komplett durchgestreckte Körperhaltung (*stretched attends*) eine vorsichtige Exploration der näheren Umgebung, was ebenfalls auf eine erhöhte Angst der Tiere schließen lässt (Rodgers et al., 2000). Dieses Verhalten wird auch als Risikoabschätzung bezeichnet.

Das Angstverhalten im *mHB* wurde daher durch folgende Parameter gemessen bzw. berechnet:

Tabelle 1: Verhaltensparameter zur Einschätzung des angstbezogenen Verhaltens.

Verhaltensparameter	Kriterien
<i>%board</i>	% der Zeit, welche das Tier mit mindestens zwei Beinen auf dem <i>board</i> verbringt
<i>Latenz board</i>	Latenz bis zum ersten Betreten des <i>boards</i>
<i>Eintritt board</i>	Anzahl der Eintritte auf das <i>board</i>
<i>Rearings board</i>	Anzahl der <i>rearings</i> auf dem <i>board</i>
<i>Stretched attends</i>	Anzahl der durchgestreckten Körperhaltungen

Exploration:

Da das olfaktorische System bei Mäusen stark ausgeprägt ist (Artal et al., 1998; Feldman, 2003; 2001; Carvell & Simons, 1990), geschieht die gerichtete Exploration unbekannter Strukturen in einer neuen Umgebung vor allem durch beschnuppern. Als Indikator einer generellen, ungerichteten Exploration können *rearings* verstanden werden. Hierbei versucht die Maus nur auf den Hinterbeinen stehend olfaktorische Informationen der Umgebung einzuholen. Folgende Parameter wurden im *mHB* im Hinblick auf die Exploration gemessen bzw. berechnet:

Tabelle 2: Verhaltensparameter zur Einschätzung der Exploration.

Verhaltensparameter	Kriterien
Explorierte Löcher	Anzahl der beschnupperten Löcher (gerichtete Exploration)
Latenz Löcher	Latenz bis zum ersten Beschnuppern eines Loches (gerichtete Exploration)
<i>Rearings box</i>	Anzahl der <i>rearings</i> in der <i>box</i> (ungerichteten Exploration)
Latenz <i>rearings box</i>	Latenz bis zum ersten <i>rearing</i> (ungerichtete Exploration)
%Objekte	% der Zeit die das Tier mit der Exploration von beiden Objekten verbracht hat

Lokomotion:

Jedes sichtbare Verhalten eines Tieres beruht letztlich auf dem Vorhandensein oder Fehlen von Bewegung. Daher ist die lokomotorische Aktivität ein potentiell beeinflussender Faktor für alle erhobenen Verhaltensparameter. Aus diesem Grund wurde die allgemeine Aktivität durch die Anzahl der Linienübertritte kontrolliert.

Tabelle 3: Verhaltensparameter zur Messung der Lokomotion

Verhaltensparameter	Kriterien
Linienübertritte	Übertreten der Linie mit allen vier Pfoten

Physiologische Erregung:

Physiologische Erregung äußert sich in vermehrtem Absetzen von Kotbällchen (Flint et al., 1995) sowie im Reinigen des eigenen Fells (*grooming*; Ammassari-Teule, et al., 1994; Choleris et al., 2001). Entsprechend wurden folgende Parameter erhoben:

Tabelle 4: Verhaltensparameter zur Einschätzung der physiologischen Erregung.

Verhaltensparameter	Kriterien
Defäkation	Anzahl der Kotbällchen
Latenz <i>grooming</i>	Latenz bis zur ersten Fellreinigung

Objekterkennung:

Versuche haben gezeigt, dass ein Nagetier sich mehr für ein unbekanntes Objekt interessiert als für ein bekanntes. Entsprechend wird eine längere Exploration des bekannten Objektes in Relation zum unbekanntem Objekt als Indiz für eine verminderte Gedächtnisleistung interpretiert (Spreng et al., 2001; Ennaceur & Delacour, 1988; Zhu et al., 1996; Brown & Aggleton, 2001; Misslin, 1981). Da ein unbekanntes Objekt jedoch auch einen aversiven Reiz darstellt, findet die Exploration des unbekanntem Objektes meist mit einer größeren Latenz statt als die eines bekannten Stimulus (Belzung et al., 2001; Adriani et al., 2000; Kopp et al., 1999; Hode et al., 2000).

Als Indikatoren zur Einschätzung der deklarativen Gedächtnisleistung wurden daher folgende Quotienten berechnet:

Tabelle 5: Quotienten zur Einschätzung der Objekterkennung:

Quotient	Interpretation
%Zeit unbekanntes/bekanntes Objekt	%der Zeit, welche das Tier mit dem Objekt verbrachte. Wenn der Quotient >1 ist, dann wurde das unbekannte Objekt länger exploriert.
Frequenz unbekanntes/bekanntes Objekt	Häufigkeit der Exploration der Objekte. Wenn der Quotient >1 ist, dann wurde das unbekannte Objekt häufiger exploriert.
Latenz unbekanntes/bekanntes Objekt	Latenz bis zur ersten Exploration der Objekte. Wenn der Quotient >1 ist, dann wurde das bekannte Objekt vor dem unbekanntem Objekt exploriert.

Soziale Affinität

Im Zusammenhang mit einem Verhaltenstest, der das basale Verhalten einer Maus untersuchen soll, ist Stress ein Störfaktor, der so klein wie möglich gehalten werden muss. Um dies zu gewährleisten, ist es den Tieren im *mHB* möglich, den Kontakt zu der jeweiligen sozialen Gruppe aufrecht zu erhalten. Die Zeit, die eine Maus in Kontakt mit der sozialen Gruppe verbringt, wurde als Indikator für soziale Affinität gewertet (Ohl et al., 2001c) und mit Hilfe folgender Parameter gemessen bzw. berechnet:

Tabelle 6: Verhaltensparameter zur Einschätzung der sozialen Affinität.

Verhaltensparameter	Kriterien
%Gruppe	%der Zeit, welche das Tier an der Trennwand mit sozialem Kontakt verbrachte
Latenz Gruppe	Latenz bis zum ersten sozialen Kontakt

2.2.1.1 Versuchsdurchführung im *mHB*

Drei Tage vor dem Verhaltenstest wurde in die jeweiligen Käfige ein zwölfseitiges, zylinderförmiges Objekt aus Messing (2 x 2 x 1 cm) gelegt. Das Objekt blieb zwei Tage im Käfig und wurde einen Tag vor der Verhaltenstestung entfernt. Zur Habituation wurden alle Tiere einer Gruppe für 20 min in das Gruppenkompartiment gesetzt. Für einen Versuchsdurchlauf wurde jedes Tier einzeln aus dem Gruppenkompartiment genommen und in die linke Ecke der *box* des *mHB* platziert. In der Ecke diagonal zum Startpunkt befanden sich nebeneinander, mit einem Abstand von ca. 2 cm, ein Messingzylinder (bekanntes Objekt) und ein für das Tier unbekanntes Objekt. Dieses Objekt bestand aus einem weißen Spielwürfel (1,5 x 1,5 x 1,5 cm) bei dem ersten basalen Test und aus einem roten Dreieck aus Gummi (2,5 x 2,5 x 2,5 cm) bei dem zweiten Durchgang, der Konfirmation. Es wurden zwei unterschiedliche unbekannte Objekte gewählt, um die Möglichkeit einer Wiedererkennung des unbekanntes Objektes in der Konfirmation auszuschließen. Die Versuchsdauer betrug fünf Minuten. Nach jedem Versuchsdurchlauf wurde der Boden der *box* mit Wasser gereinigt.

2.3 Der selektive Objekterkennungstest

Alle Versuche wurden in einem Macrolon® Typ II Käfig (43 x 24 x 15 cm) ohne Deckel durchgeführt. Am ersten Tag wurden die Tiere in der Gruppe 50 min zur Habituation in einen neuen Typ II Käfig gesetzt. Am zweiten Tag kamen die Tiere einzeln in die jeweiligen Käfige, wobei bei diesem Durchgang zwei identische Objekte (Ø 2 cm; Höhe 1,5 cm Kunststoffdeckel von 14 ml Falcontubes von Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) in der hinteren Hälfte des Käfigs lagen. Am dritten und letzten Tag wurde eins der beiden Objekte vom Vortag durch ein neues, unbekanntes Objekt ausgetauscht (Bleistiftspitzer aus Eisen 1 x 1 x 2,5 cm). Die Tiere wurden zur freien Exploration der beiden Objekte erneut einzeln in die Käfige gesetzt (Abbildung 6). Die Versuchsdauer an Tag zwei und Tag drei betrug jeweils 10 min.

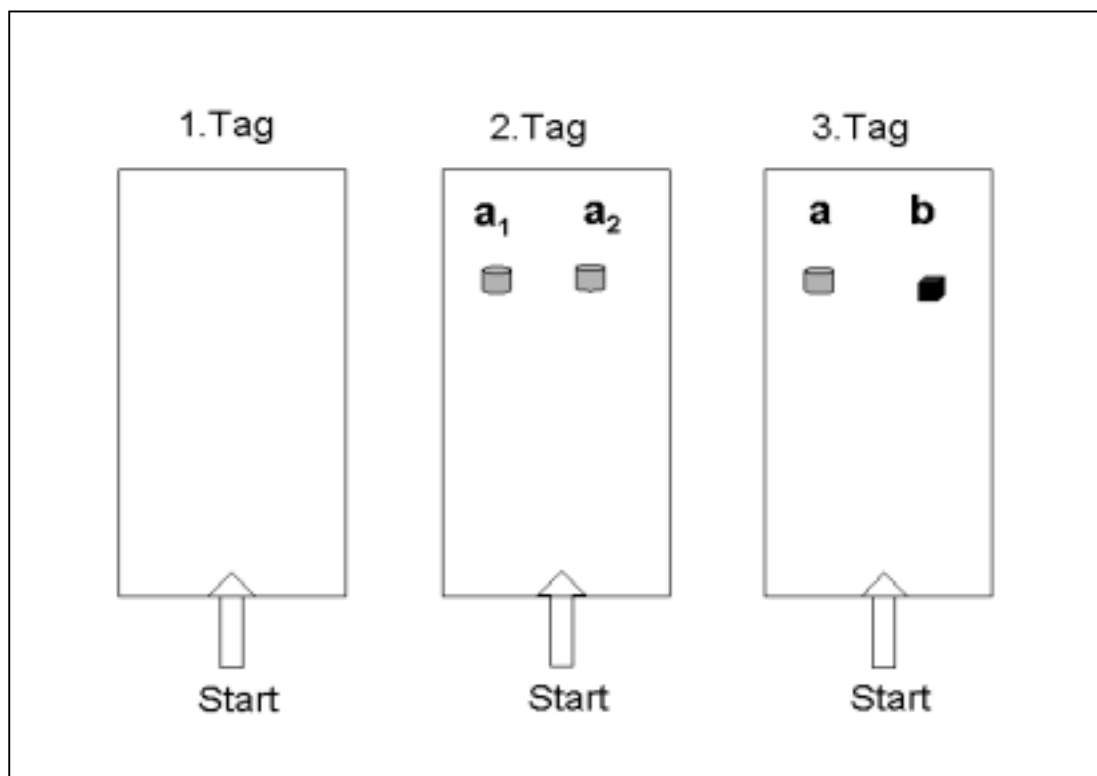


Abbildung 6: Versuchsplan bei dem selektiven Objekterkennungstest. Am ersten Tag gewöhnen die Tiere sich fünfzig Minuten an einen leeren Käfig. Am zweiten Tag können sie zehn Minuten zwei identische Objekte explorieren. Am dritten Tag wird ein Objekt vom Vortag durch ein neues, unbekanntes Objekt ausgetauscht und die Tiere können erneut 10 Minuten explorieren.

Zusätzlich zu den von Ennaceur und Delacour (1988) gemessenen Parametern wurden in dieser Arbeit auch die generelle Exploration (Anzahl der *rearings*) sowie die Lokomotion (gelaufene Distanz) der Tiere gemessen.

Zur Berechnung der Objektexploration wurde die Summe aus der Zeit, welche die Tiere mit der Exploration beider Objekte verbracht hatten, gebildet (Ennaceur & Delacour 1988):

Objektexploration

$$\text{2.Tag: } a_1 + a_2 = e_1$$

$$\text{3.Tag: } a + b = e_2$$

Am zweiten Tag wurden den Tieren zwei identische Objekte präsentiert. Der Quotient q_1 ermöglicht somit die Einschätzung ob die Tiere eine Objekt-unabhängige Seitenpräferenz zeigten:

Präferenz2.Tag: $a_1/a_2 = q_1$ wenn $q \neq 1$ dann wurde ein Objekt länger exploriertwenn $q = 1$ dann wurden beide Objekte gleich lang exploriert

Zur Berechnung der Objekterkennung wurde der Quotient aus der Explorationszeit des unbekanntes Objektes im Verhältnis zum bekannten Objekt am dritten Tag gebildet:

Objekterkennung3.Tag: $a/b = q_2$ wenn $q > 1$ dann wurde das bekannte Objekt länger exploriertwenn $q = 1$ dann wurden beide Objekte gleich lang exploriertwenn $q < 1$ dann wurde das unbekanntes Objekt länger exploriert

Drei Stunden nach dem Versuch wurden die Tiere getötet und die Hirne wurden für die c-Fos Färbung entnommen. Für diese Methode wurden zusätzlich zwei Kontrollgruppen ($n=6$) verwendet. Eine Gruppe bestand aus unbehandelten, nicht getesteten Mäusen. Tiere der zweiten Gruppe wurden durch 10 minütiges Schwimmen in einem Wasserglas gestresst und nach drei Stunden getötet. Diese Kontrollgruppen dienen zur Überprüfung der Methode. Dazu wurde die Anzahl der aktiven Zellen im PVN kontrolliert. Hierbei sollten die basalen Tiere eine geringere Aktivität zeigen als Tiere, welche durch das Schwimmen gestresst wurden.

2.4 Die pharmakologische Validierung

Um den Verhaltensphänotyp der RO Tiere pharmakologisch zu validieren, wurden RO Mäuse ($n=13$) unter dem Einfluss von Metrifonate in dem selektiven Objekterkennungstest untersucht. Der behandelten Gruppe ($n=7$) wurde 30 min vor jedem Versuchsdurchlauf 80mg/kg Körpergewicht Metrifonate gelöst in 5%-igem Natriumcitrat Puffer ($pH=5$) oral appliziert. Die RO Vehikelgruppe erhielt nur den Puffer ohne Wirkstoff. Die Versuchsdurchführung entsprach dem oben beschriebenen Objekterkennungstest.

2.5 Räumliche Lernkurve im mHB

Für die Lernkurve war die *box* des mHB 50 X 50 cm groß. Auf dem in der Mitte platzierten *board* (35 x 17,5 cm) befanden sich zehn offene Zylinder (Ø 3,2 cm, Höhe 3 cm), welche in zwei parallelen Reihen zu je fünf Stück angeordnet waren. Drei der Zylinder waren mit Textilband markiert. Alle zehn Zylinder enthielten ein Stück Mandel (0,02-0,05 g). Bei den nicht markierten Zylindern lag das Mandelstückchen unter einem feinmaschigen Plastiknetz und somit für das Tier nicht erreichbar. Im Gegensatz dazu lag die Futterbelohnung bei den markierten Zylindern auf dem Plastiknetz (Abbildung 7). Des weiteren wurden alle Zylinder mit geschmacksneutralem Vanillearoma (Vanillearoma in Wasser 0,02 %; Micro-Plus, Stadtoldendorf, Deutschland) ausgestrichen. Dieser Geruchsstoff bewirkte in Pilotstudien eine Erhöhung der Motivation der Tiere.

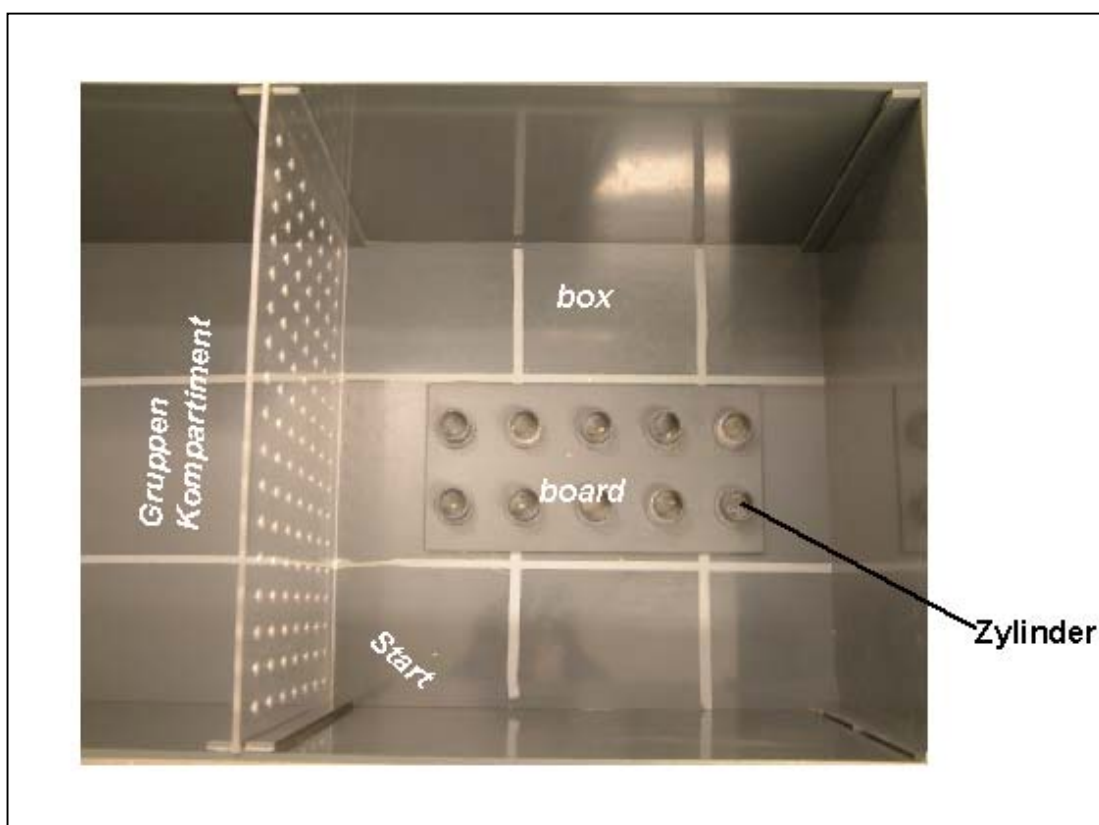


Abbildung 7: Der Versuchsaufbau bei dem räumlichen Lerntest im mHB.

Zusätzlich zu den Verhaltensparametern, die bei der Verhaltensphänotypisierung im *mHB* aufgeführt sind (Kapitel 2.2.1), wurden während des Lerntests noch folgende Leistungen gemessen:

Arbeitsgedächtnis

Als Arbeitsgedächtnis wird eine zeitlich begrenzte Speicherung von Informationen betrachtet (Jones, 2002; Goldman-Rakic, 1996). In der räumlichen Lernkurve im *mHB* wurden wiederholte Besuche von markierten Zylindern als Fehler des Arbeitsgedächtnisses gewertet, da die Tiere sich nur für die Zeit eines Versuchsdurchgangs merken mussten, welche Zylinder sie schon besucht hatten.

Tabelle 7: Verhaltensparameter zur Einschätzung des Arbeitsgedächtnisses.

Verhaltensparameter	Kriterien
Wiederholungsfehler	wiederholter Besuch eines markierten Zylinders

Deklaratives Gedächtnis

Laut Squire und Zola (1996) besteht das deklarative Gedächtnis aus der bewussten Erinnerung von Ereignissen oder Fakten. In der räumlichen Lernkurve sollen die Tiere trainiert werden, einen markierten Zylinder mit einer Futterbelohnung zu assoziieren. Im Gegensatz zu der Objekterkennung wird bei der räumlichen Lernkurve nicht nur das Erinnerungsvermögen untersucht, sondern auch die Fähigkeit, eine Assoziation zu erlernen. Durch die räumliche Komponente des Versuchsaufbaus wird diese Aufgabenstellung neben dem perirhinalen Kortex auch vor allem in dem Hippokampus verarbeitet.

Tabelle 8: Verhaltensparameter zur Untersuchung des deklarativen Gedächtnisses.

Verhaltensparameter	Kriterien
Falscher Zylinder	Besuch eines nicht markierten Zylinders + Auslassung eines markierten Zylinders

Motivation

Das Lösen einer Gedächtnisaufgabe erfordert immer ein gewisses Maß an Motivation. Es gibt zwei Arten, diese bei Tieren zu steigern: entweder positiv durch Belohnungen, wie z.B. mittels Futterbelohnung, oder negativ durch

Bestrafung, z.B. mittels Elektroschock. Zur Einschätzung der Motivation eines Tieres während des Versuchs wurde einerseits die Anzahl der ausgelassenen Zylinder gezählt und andererseits die Zeit bis zum ersten Zylinderbesuch gemessen. Mit Hilfe der Latenz bis zum ersten Zylinderbesuch kann man eine Aussage über die generelle Motivation des Tieres treffen, auf die Suche nach der Futterbelohnung zu gehen. Die Anzahl der ausgelassenen Zylinder deutet auf eine verringerte Motivation hin, die Aufgabenstellung zu lösen.

Tabelle 9: Verhaltensparameter zur Untersuchung der Motivation.

Verhaltensparameter	Kriterien
Auslassung	Anzahl der nicht besuchten markierten Zylinder
Latenz Zylinder	Latenz bis zum ersten Besuch eines Zylinders

Versuchsdauer

Nach dem Auffinden der letzten Futterbelohnung wurde der Verhaltensversuch beendet. Entsprechend dient die Versuchsdauer als Indikator dafür, wie schnell das Tier die Aufgabe lösen konnte.

2.5.1 Versuchsdurchführung bei der räumlichen Lernkurve

Zwei Tage vor dem ersten Versuchstag erhielt jedes Tier zusätzlich zu den standardisierten Futterpellets ein kleines Stück Mandel (0,02-0,05 g) zur Habituation. Vor Beginn des Versuchs wurden alle Tiere aus einem Käfig in das Gruppenkompartiment gesetzt und dann einzeln in die Versuchsbox platziert. Die Mäuse wurden täglich in vier Versuchsdurchgängen trainiert, wobei jeder Versuchsdurchgang höchstens fünf Minuten dauerte oder so lange, bis alle drei Futterbelohnungen gefunden wurden. Die Tiere sollten lernen, ein markiertes Loch mit einer Futterbelohnung zu assoziieren. Ein Zylinder galt als besucht, wenn sich die Nase der Maus im Zylinder unterhalb des Zylinderrandes befand.

Alle Versuche fanden zwischen 8.00 Uhr und 13.00 Uhr statt. Die Experimente im *mHB* wurden von einem trainierten Beobachter observiert, der die Verhaltensparameter mit Hilfe eines PCs und entsprechender Software (Observer 3.0, Noldus, Wageningen, Holland) während der Versuchszeit aufzeichnete. Zusätzlich wurden die Versuche auf Video festgehalten. Bei der selektiven

Objekterkennung wurde neben den Verhaltensparametern auch die Laufstrecke der Tiere mit Hilfe eines *Tracking*programms (Ethovision Color Pro 2.1.6, Wageningen, Holland) aufgenommen.

2.6 Immunhistochemie

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma (Taufkirchen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.6.1 Entnahme und Lagerung der Hirne

Die Tiere wurden drei Stunden nach dem Verhaltensversuch in einem Glasbehälter mit Isofluran (Curamed Pharma, Karlsruhe, Deutschland) leicht anästhesiert und dekapitiert. Die Hirne wurden innerhalb von höchstens 3min aus der Kalotte entfernt und in vorgekühltes 2-Methylbutan (-30 bis -40°C; Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) schockgefroren. Anschließend wurden die Hirne auf Trockeneis und bei -80°C gelagert.

2.6.2 Gehirnschnitte am Kryostat

Für die Analyse der Gehirne mittels Immunhistochemie wurden Hirnschnitte mit einer Schnittdicke von 16 µm in verschiedenen Regionen (Atlas Paxinos & Franklin, 2000) am Kryostaten (Reichert-Jung, 2800 Frigocut E) angefertigt und auf poly-L-Lysin (0,01 %, Sigma, Deisenhof, Deutschland) beschichtete Objektträger (Super Frost, Menzel Gläser, Merck, Ismaning, Deutschland) aufgenommen. Diese wurden bei -20°C bis zur Färbung gelagert.

2.6.3 Immunhistochemie zur c-Fos Analyse

Die Hirnentnahme wurde durchgeführt wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben.

Die am Kryostat gewonnenen 16 µm dicken Hirnschnitte wurden 30 min lang auf Raumtemperatur gebracht und anschließend 30 min mit einer 4%-igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Nach 3x10 minütigem Waschen in phosphatgepufferter Saline (PBS) wurden die Schnitte zur Reduktion der endogenen Peroxidasen 30 min mit 0,6 % H₂O₂ behandelt. Zur Erhöhung der

Zellpermeabilität wurden die Schnitte nach einem weiteren Waschschrift mit PBS für 1 h in 0,2 %-igem Triton X-100 (Sigma, Steinheim, Deutschland) inkubiert. Anschließend folgten erneut 2 x 5 minütige Waschgänge mit PBS. Daraufhin wurden die Hirnschnitte für mindestens 1h bei Raumtemperatur mit 5 %-igem Ziegen-Serum (500 µl pro Objektträger; Vector Laboratorien, Burlingame, USA) in einer feuchten Kammer inkubiert, um nichtspezifische Bindungen zu minimieren. Eine Lösung aus PBS mit 1,5%-igem Ziegen Serum wurde angesetzt, in welcher der 1. Antikörper (Kaninchen polyklonaler Antikörper, Vector Laboratorien, Burlingame, USA) 1:15 000 verdünnt wurde. Anschließend wurden auf jeden Objektträger 500 µl dieses Gemisches aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3x10 min in PBS gewaschen und mit dem 2. Antikörper aus einem ABC-Kit (Kaninchen; Vector Laboratorien, Burlingame, USA) für 1 h bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Nach 3x10 min waschen in PBS wurde ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Kit (Vector Laboratorien, Burlingame, CA) der Bedienungsanleitung folgend verwendet und die Schnitte erneut für eine Inkubationszeit von 1 h in die feuchte Kammer gelegt. Die Lokalisation des Antigens wurde durch Auftragen des Diaminobenzidine (DAB)-Färbekits (Vector Laboratorien, Burlingame, USA) sichtbar gemacht. Die DAB-Lösung wurde nach 2min mit Leitungswasser entfernt, wodurch die Färbung gestoppt wurde. Anschließend wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen. Letztlich wurden die Hirnschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 % und 100 % Ethanol) dehydriert, in Rotihistol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt und in Roti-Histokitt (Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckt.

2.6.4 Auswertung der c-Fos Färbung

Zur quantitativen Auswertung der c-Fos Proteinexpression wurden pro Tier 20 Schnitte für jede Hirnregion (PVN, *Barrel* Kortex und perirhinalen Kortex nach Atlas Paxinos & Franklin, 2000) verwendet. Dabei wurden Hirnschnitte mittels eines Mikroskops (Zeiss/Axioplan) bei 10-facher Vergrößerung digitalisiert (CCD Videokamera, XC-77CE, Sony). Die so konservierten Bilder der Hirngebiete wurden daraufhin mit Hilfe eines Bildanalyse-Programmes (Optimas 5.2, Optimas

Corporation, Media cybernetics, Washington, USA) am Computer ausgewertet. Mittels eines Makros (Dr. Barthelmes, MPI für Psychiatrie, München, Deutschland) wurde die Anzahl der dunkelgefärbten Zellen pro Ausschnitt gezählt (Auflösung: 256 Graustufen). Anschließend wurde pro Hirnregion und Tier der Mittelwert der Anzahl der dunkelgefärbten Zellen pro mm² ermittelt.

2.7 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden am PC mittels der Software „Statistica 6.1“ (Statsoft, Tulsa, USA) durchgeführt. Die Daten wurden mittels einer Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Bei wiederholten Testungen wurden alle Daten einer Zwei-Faktoren Varianzanalyse mit Messwiederholungen unterzogen. Hierbei wurde die Mauslinie bzw. die Experimentalgruppe (Metrifonate vs. Vehikel) als unabhängige Variable, der Versuchsdurchlauf als abhängige Variable angesehen. Wenn signifikante Effekte in der Interaktion der Faktoren auftraten, wurden die Gruppenvergleiche mittels eines post-hoc LSD-Tests ermittelt. Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn $p < 0.05$ war.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung und Penetranz des Verhaltensphänotyps der RO-Linie

Für die *baseline* wurden C3H (wt) sowie die Hybriden der beiden Auszuchten mit BL6; BL6C3H (N1 wt) und BL6BL6C3H (N2 wt) wt Männchen (n=20) und wt Weibchen (n=20) im mHB getestet. Basierend auf dieser Verhaltensphänotypisierung der wt-Mäuse wurden die oberen und unteren Grenzwerte für jeden Verhaltensparameter pro Geschlecht und Linie berechnet:

Mittelwert $\pm 2,75/2 \times$ Standardabweichung

Alle Tiere wurden zweimal im mHb getestet, einmal basal und ein zweites Mal zur Konfirmation der Verhaltensdaten.

Ein Tier der RO-Linie wurde als im Verhaltensphänotyp bestätigt betrachtet, wenn primär der Quotient %Zeit unbekanntes/bekanntes Objekt unterhalb des Grenzwertes der wt-Mäuse lag. Als zusätzlicher Parameter wurde der Quotient Frequenz unbekanntes/bekanntes Objekt beachtet. Zu den Ausschlusskriterien zählten eine vom wt abweichende Lokomotion und Veränderungen bezüglich des Angstverhaltens. Des weiteren wurde darauf geachtet, dass die Tiere keine physiologischen Probleme zeigten.

Tabelle 10: Ergebnisse der Verhaltensphänotypisierung der RO-Linie im mHB.

Generation	Männchen	Weibchen	Penetranz insgesamt
	geboren-getestet-bestätigt	geboren-getestet-bestätigt	
F1	07 – 07 - 03	02 – 02 - 02	56%
F2	63 – 61 - 23	58 – 35 - 13	38%
F3	26 – 26 - 03	23 – 00 - 00	12%
F4	11 – 11 - 05	10 – 04 - 01	40%
F5	19 – 19 - 05	20 – 15 - 08	38%
F6	21 – 21 - 14	25 – 00 - 00	67%
F7	20 – 20 - 14	19 – 00 - 00	70%
N1	33 – 26 - 05	33 – 10 - 03	22%
N2	121 – 121 - 30	105 – 105 - 30	27%

Die RO-Linie wurde über sieben Generationen basierend, auf der C3H-Inzuchtlinie, gezüchtet. Von jeder Generation wurden Tiere zur Untersuchung der Penetranz des Phänotyps stichprobenartig verhaltensphänotypisiert (Tabelle 10). Aus der F4-Generation wurden zwei im Phänotyp bestätigte Männchen mit BL6-wt-Weibchen ausgezüchtet. Die auf C3H basierenden RO-Mäuse zeigten über alle Generationen eine durchschnittliche Penetranz des Phänotyps von 46%.

Die RO-Männchen, basierend auf der C3H-Inzuchtlinie, wurden repräsentativ graphisch dargestellt (Abbildung 8- Abbildung 16; Mittelwert \pm SEM aller Verhaltensparameter siehe Anhang).

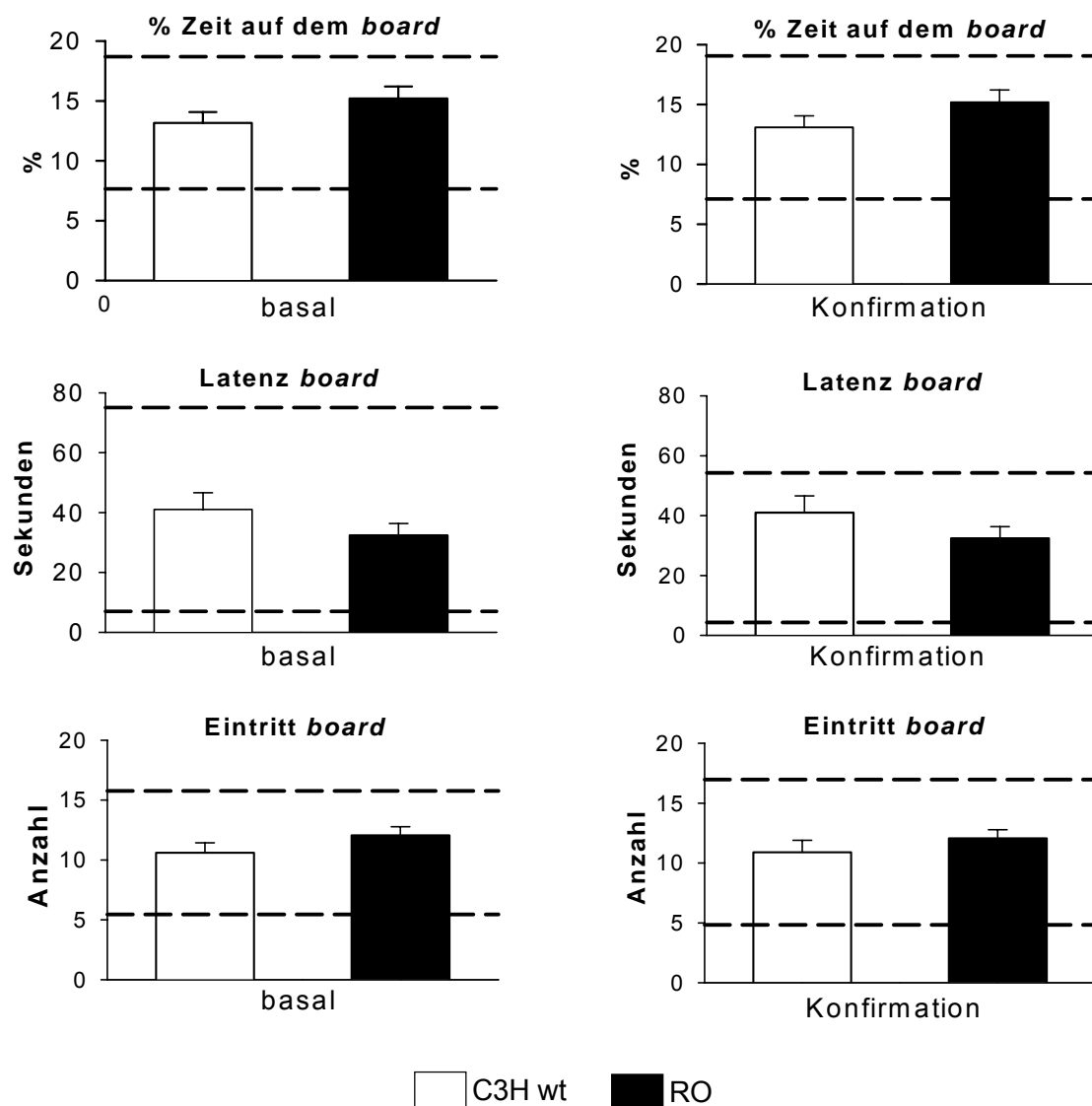


Abbildung 8: Vergleich des Angstverhaltens im mHB von RO- ($n=67$) und wt-Männchen ($n=20$). Die gestrichelten Linien geben die unteren und oberen Grenzwerte an. Die Parameter, welche das Angstverhalten messen (s. Abschnitt 2.2.1), befanden sich bei allen RO-Männchen sowohl bei dem basalen Test als auch bei der Konfirmation innerhalb der wt Grenzen (Mittelwerte + SEM).

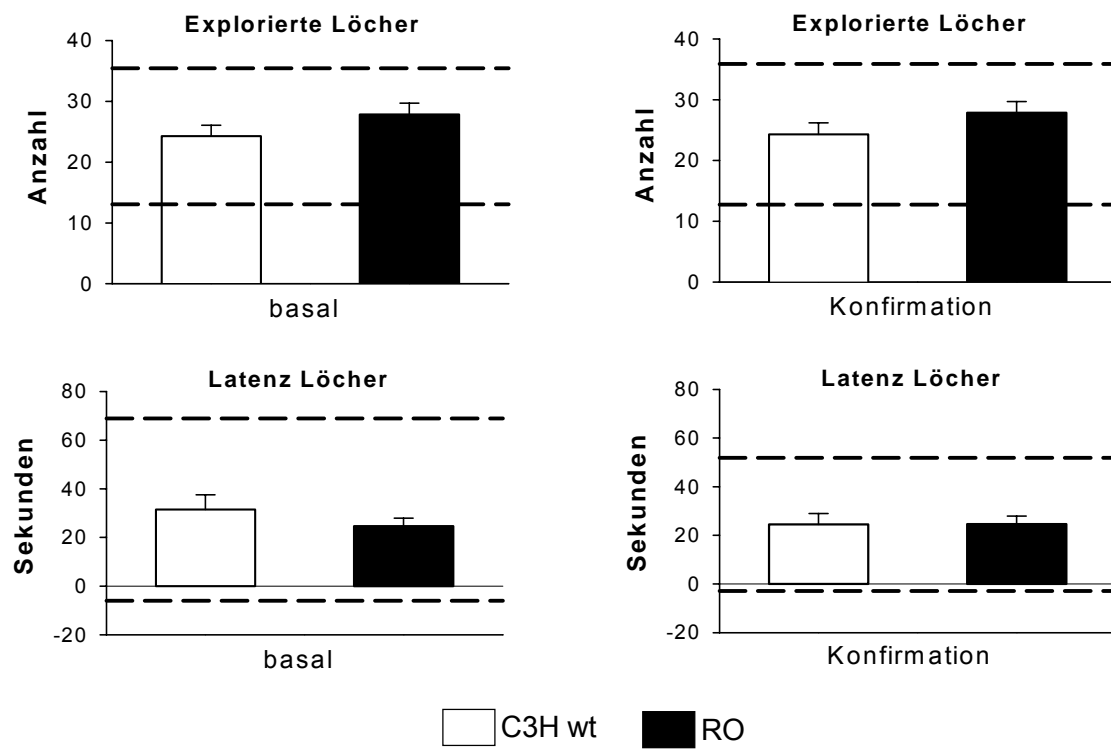


Abbildung 9: RO- und C3H-wt-Männchen zeigten weder bei der basalen Testung noch bei der Konfirmation einen Unterschied in der direkten Exploration im mHB (Mittelwerte + SEM).

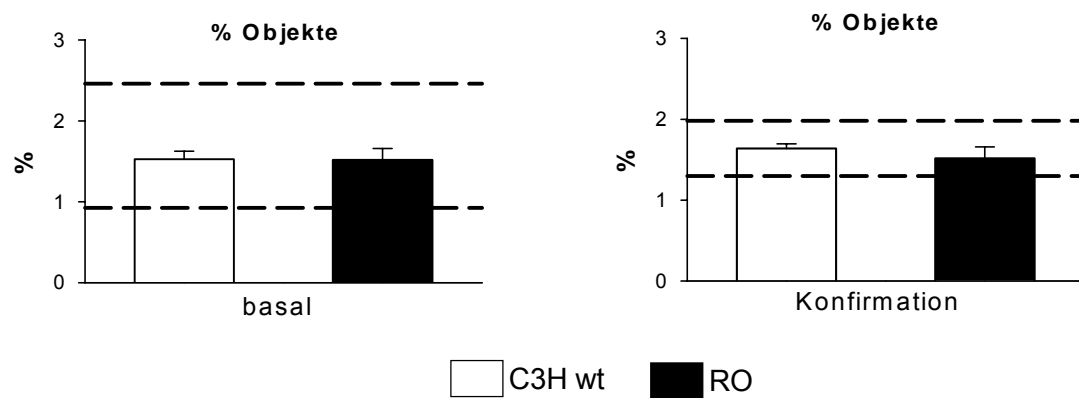


Abbildung 10: Vergleich der Objektexploration im mHB von RO-Männchen (n=67), die auf der C3H-Inzuchtlinie basieren, und von C3H-wt-Männchen (n=20). Die gestrichelten Linien geben die unteren und oberen Grenzwerte an. Bei dem basalen Test wie auch in der Konfirmation befanden sich RO-Mäuse innerhalb der Grenzwerte (Mittelwerte + SEM).

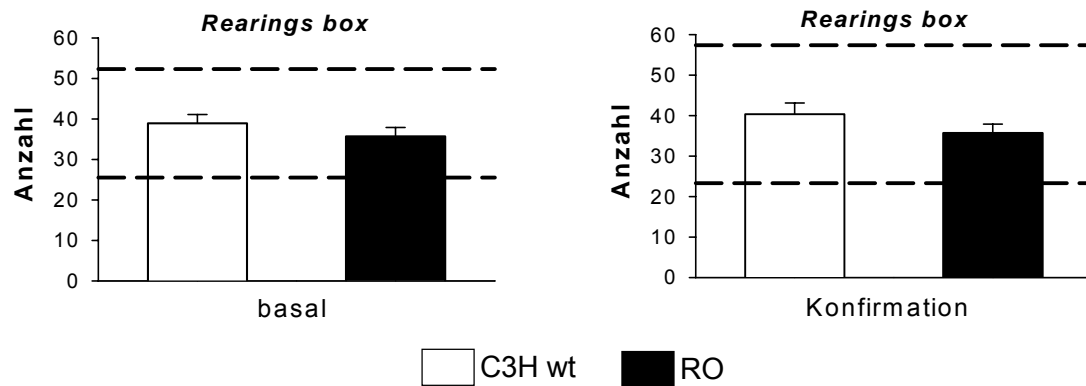


Abbildung 11: In der generellen Exploration im mHB unterschieden sich RO-Männchen ($n=67$) sowohl in dem basalen Test als auch in der Konfirmation nicht von C3H-wt-Männchen ($n=20$). Die gestrichelten Linien geben die unteren und oberen Grenzwerte an (Mittelwerte + SEM).

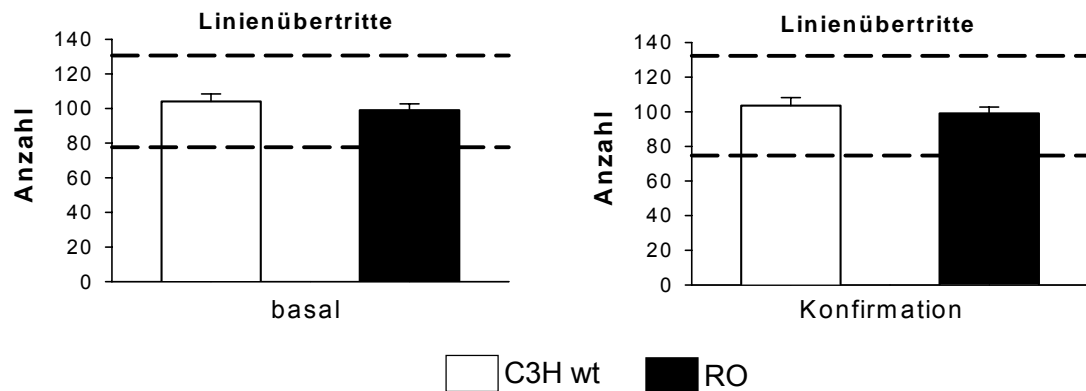


Abbildung 12: Die lokomotorische Aktivität im mHB war bei RO-Mäusen ($n=67$) vergleichbar mit C3H-wt-Tieren ($n=20$). Sowohl bei dem basalen Test als auch bei der Konfirmation befanden sich alle RO-Tiere innerhalb der berechneten wt-Grenzen (Mittelwert + SEM).

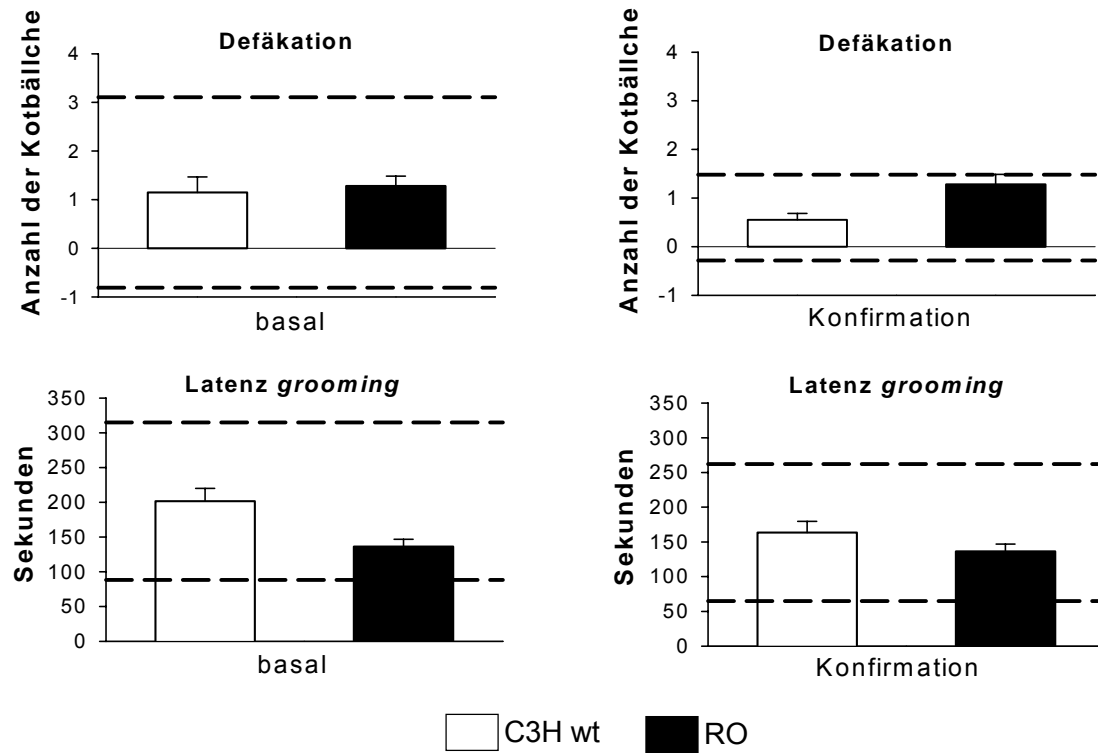


Abbildung 13: Vergleich der physiologischen Erregung im mHB von RO-Männchen (n=67), die auf der C3-Inzuchtlinie basieren, und von C3H-wt-Männchen (n=20). Die gestrichelten Linien geben die unteren und oberen Grenzwerte an, nach denen ein Tier entweder einer Normalpopulation zugeordnet oder als Mutante identifiziert wurde. Bei den Parametern, welche die physiologische Erregung messen, befanden sich alle RO-Männchen innerhalb der wt-Grenzen (Mittelwerte + SEM).

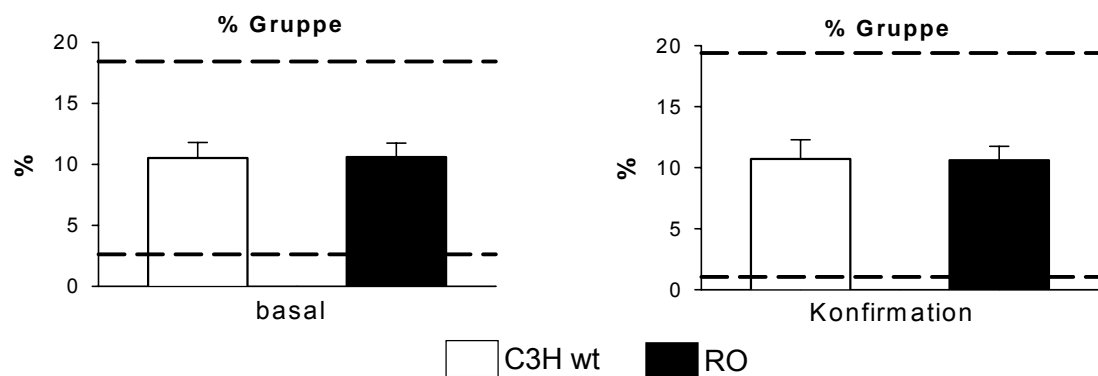


Abbildung 14: Die soziale Affinität im mHB stellte sich bei RO-Mäusen (n=67) ähnlich wie bei C3H-wt-Tieren (n=20) dar. Sowohl in dem basalen Test als auch in der Konfirmation befanden sich alle RO-Tiere innerhalb der berechneten wt-Grenzen (Mittelwert + SEM).

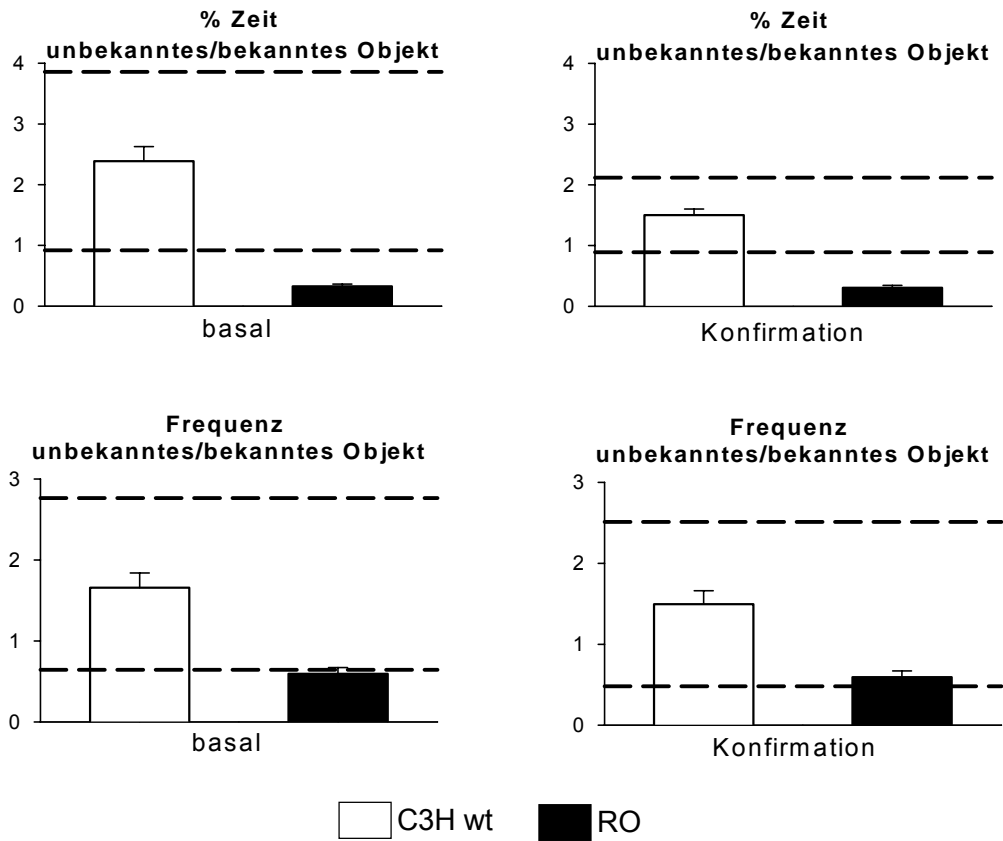


Abbildung 15: In der Objekterkennung im mHB explorierten RO-Mäuse (n=67) im Vergleich mit wt-Tieren (n=20) sowohl basal wie auch in der Konfirmation das unbekannte Objekt weniger lange und weniger oft in Relation zum bekannten Objekt (Mittelwerte + SEM).

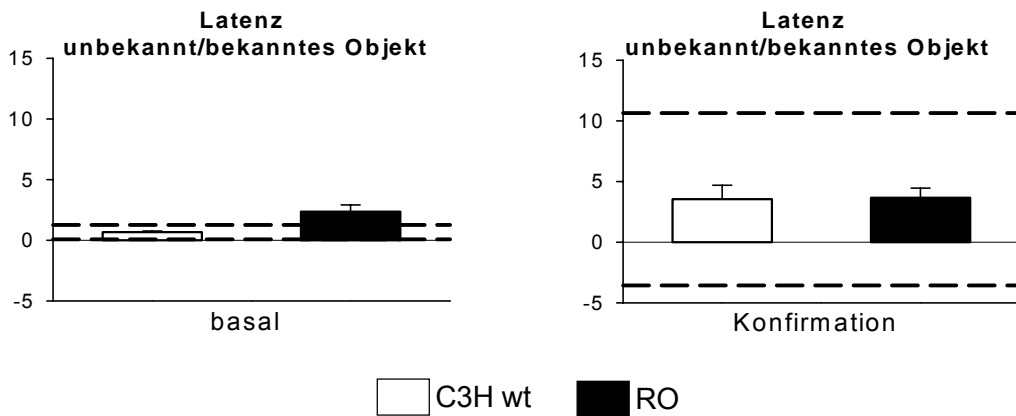


Abbildung 16: In der basalen Testung explorierten wt-Mäuse beide Objekte mit einem geringen Zeitabstand voneinander. RO-Tiere dagegen lagen über dem oberen Grenzwert, d.h. sie explorierten das bekannte Objekt lange vor dem unbekanntem. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Konfirmationstestung kein Unterschied zwischen den beiden Linien (Mittelwerte + SEM).

3.2 Die selektive Objekterkennung

Um die Resultate der RO-Tiere aus der Verhaltensphänotypisierung im mHB in einem selektiven Verhaltenstest zu überprüfen, wurde eine Woche nach der Phänotypisierung im mHB mit RO- (n=6) und wt- (n=10) Männchen ein selektiver Objekterkennungstest durchgeführt.

Die Ergebnisse wurden mittels einer Zwei-Faktoren Varianzanalyse mit Messwiederholung untersucht, wobei Mauslinie und Versuchstag als unabhängige Variablen definiert wurden. Bei einer signifikanten Interaktion der Faktoren wurde eine post-hoc Analyse durchgeführt. Demzufolge beziehen sich die aufgeführten Freiheitsgrade und p-Werte ausschließlich auf die Interaktion Mauslinie x Versuchsdurchlauf sowie die Ergebnisse der post-hoc Analyse.

RO-Tiere zeigten im Vergleich zu wt-Mäusen keine Unterschiede in der Lokomotion (gelaufene Distanz $F_{1, 14}=0,025$; $p=0,877$; Abbildung 17) und der generellen Exploration (*rearings* $F_{1, 14}=0,976$; $p=0,34$; Abbildung 17).

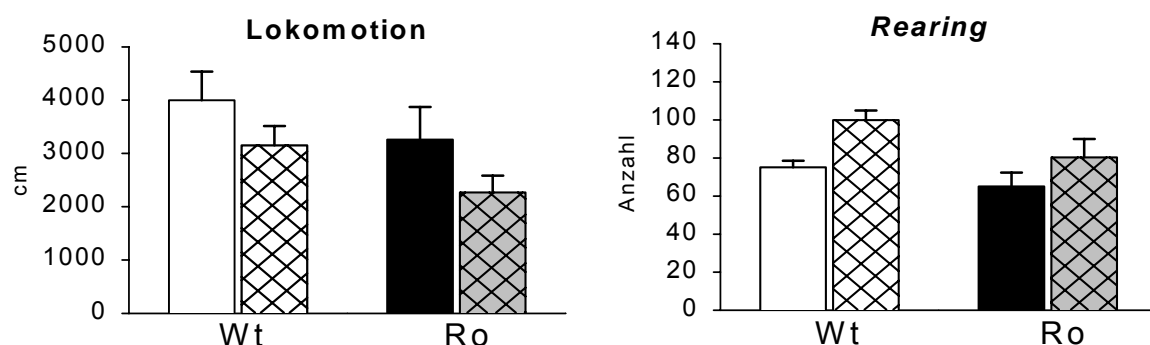


Abbildung 17: Bei dem selektiven Objekterkennungstest zeigte sich in der Lokomotion (gelaufene cm) und der generellen Exploration (*rearings*) kein signifikanter Unterschied zwischen wt-Mäusen und RO-Tieren (Mittelwert + SEM).

Dagegen ergab die Analyse einen signifikanten Unterschied zwischen RO-Mäusen und wt-Tieren bei der Exploration beider Objekte (e1, e2; $F_{1, 22}=6,11$; $p=0,03$; Abbildung 18). Die post-hoc Analyse zeigte, dass RO-Mäuse am zweiten Tag mehr Zeit mit beiden identischen Objekten verbrachten (e1) als die wt-Tiere ($p=0,01$). Der Vergleich beider Linien in den Quotienten q1 und q2 ergab eine signifikante Interaktion ($F_{1, 22}=8,296$; $p=0,01$; Abbildung 19). Die post-hoc Analyse zeigte, dass zum einen innerhalb der Mauslinie wt-Tiere einen höheren q2 als q1 hatten ($p=0,001$), zum anderen war q2 der wt-Mäuse höher als q1 ($p=0,001$) und höher als q2 ($p=0,003$) der RO-Tiere.

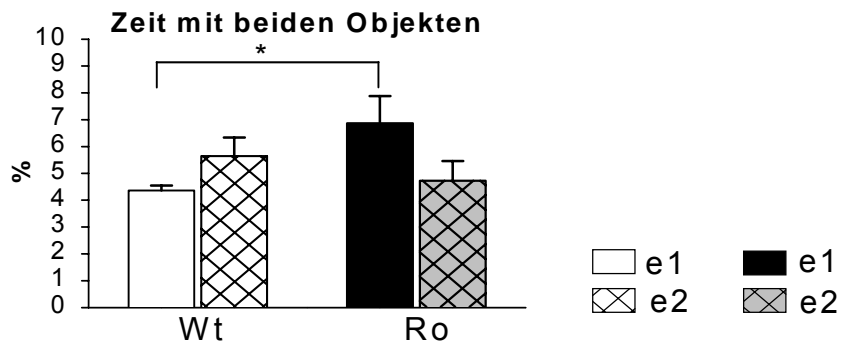


Abbildung 18: RO-Tiere explorierten die beiden identischen Objekte (Berechnung von e1 und e2 s. Abschnitt 2.3) am zweiten Versuchstag (e1) signifikant länger als wt-Mäuse. Dagegen zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Linien bei der Objektexploration am dritten Versuchstag (e2) (Mittelwerte + SEM; * $p < 0.05$).

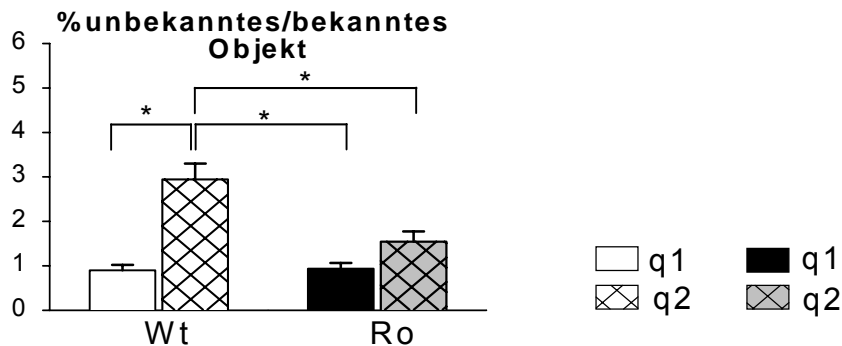


Abbildung 19: Die Parameter zur Untersuchung der Objekterkennung (q1 und q2 zur Berechnung s. Abschnitt 2.3) ergaben einen signifikanten Unterschied innerhalb der wt-Linie am zweiten Versuchstag (q1) mit zwei identischen Objekten verglichen mit dem dritten Versuchstag (q2) mit zwei verschiedenen Objekten im Test. Während am zweiten Versuchstag wt-Mäuse wie auch RO-Tiere für die Exploration beider identischer Objekte jeweils die gleiche Zeit aufwendeten, verbrachten wt-Mäuse mehr Zeit mit dem unbekanntem Objekt am dritten Versuchstag verglichen mit RO-Mäusen (Mittelwerte + SEM; * $p < 0.05$).

3.3 Die räumliche Lernkurve im mHB

Zur weiteren Untersuchung der Gedächtnisleistung der RO-Tiere wurden RO- (n=8) und wt-Mäuse (n=8) in einem räumlichen Test untersucht. Hierbei wurden vier Versuchsdurchgänge pro Tag über einen Zeitraum von fünf Tagen durchgeführt. Am letzten Versuchstag wurde die Sequenz der markierten Löcher verändert. Zur Auswertung wurde eine Drei-Faktoren Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt, wobei Mauslinie, Versuchsdurchlauf und Versuchstag als unabhängige Variablen definiert wurden. Die Werte beziehen

sich, wenn nicht ausdrücklich anders beschrieben, auf die Interaktion aller Faktoren. Zur vereinfachten Darstellung wurden die Versuchstage durch gestrichelte Linien markiert. Bezüglich der Wiederholungsfehler wurde eine signifikante Interaktion zwischen Mauslinie x Versuchsdurchgang ($F_{12, 168}=4,3$; $p=0,001$; Abbildung 20) ermittelt, wobei RO-Mäuse jeweils im zweiten Versuchsdurchgang mehr Wiederholungsfehler machten als wt-Tiere.

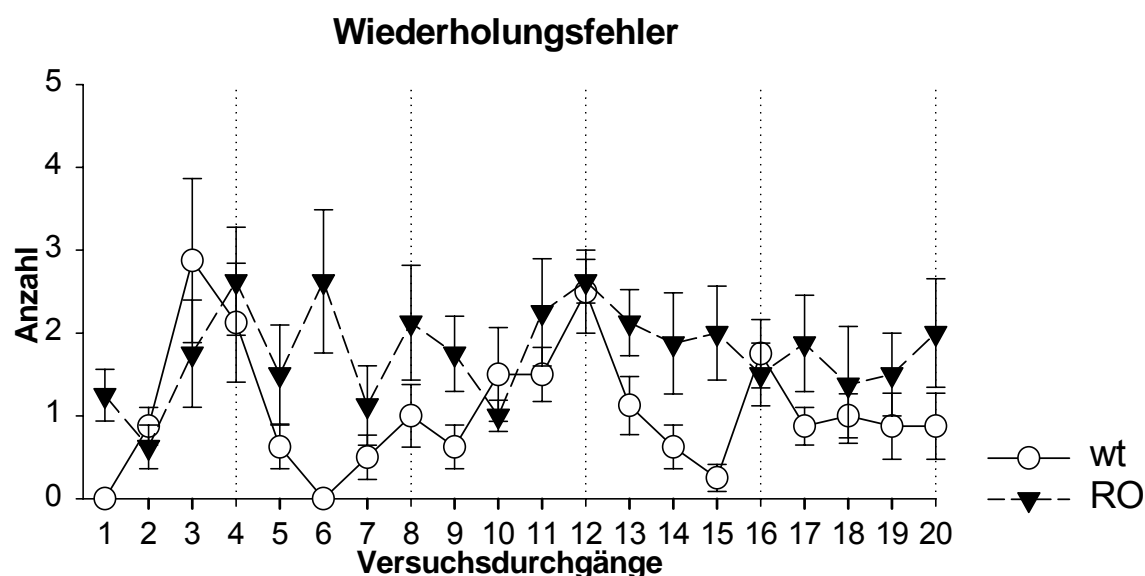


Abbildung 20: Bei der Anzahl der Wiederholungsfehler machten RO-Mäuse jeweils im zweiten Versuchsdurchgang mehr Wiederholungsfehler als wt-Mäuse (Mittelwerte \pm SEM).

Dagegen ergaben sich signifikante Unterschiede in der Interaktion aller drei Faktoren bei der Anzahl der falschen Zylinder ($F_{12, 168}=2,69$; $p=0,002$; Abbildung 21). Es zeigte sich, dass RO-Mäuse während des ersten Versuchsdurchgangs am zweiten Tag ($p=0,007$) mehr falsche Zylinder besuchten als wt-Mäuse. Im Gegensatz dazu besuchten RO-Mäuse weniger falsche Zylinder als wt-Tiere während des zweiten Versuchsdurchgangs am dritten Tag ($p=0,002$) und des ersten Versuchsdurchgangs am vierten Versuchstag ($p=0,02$). Die Anzahl der ausgelassenen Zylinder ergab eine signifikante Interaktion aller drei Faktoren ($F_{12, 168}=2,66$; $p=0,003$; Abbildung 22), dabei ließen RO-Tiere während des ersten Versuchsdurchgangs am ersten Tag ($p=0,001$) und des zweiten Versuchsdurchgangs am vierten Tag ($p=0,02$) weniger Zylinder aus als wt-Tiere. Die Analyse ergab für den Parameter Latenz Zylinder eine signifikante Interaktion zwischen Versuchsdurchlauf x Mauslinie ($F_{3, 42}=4,54$; $p=0,008$; Abbildung 23). Über die Versuchstage gemittelt zeigten RO-Mäuse eine kleinere Latenz als wt-

Tiere im ersten Versuchsdurchgang ($p=0,001$) sowie im zweiten Versuchsdurchgang ($p=0,001$).

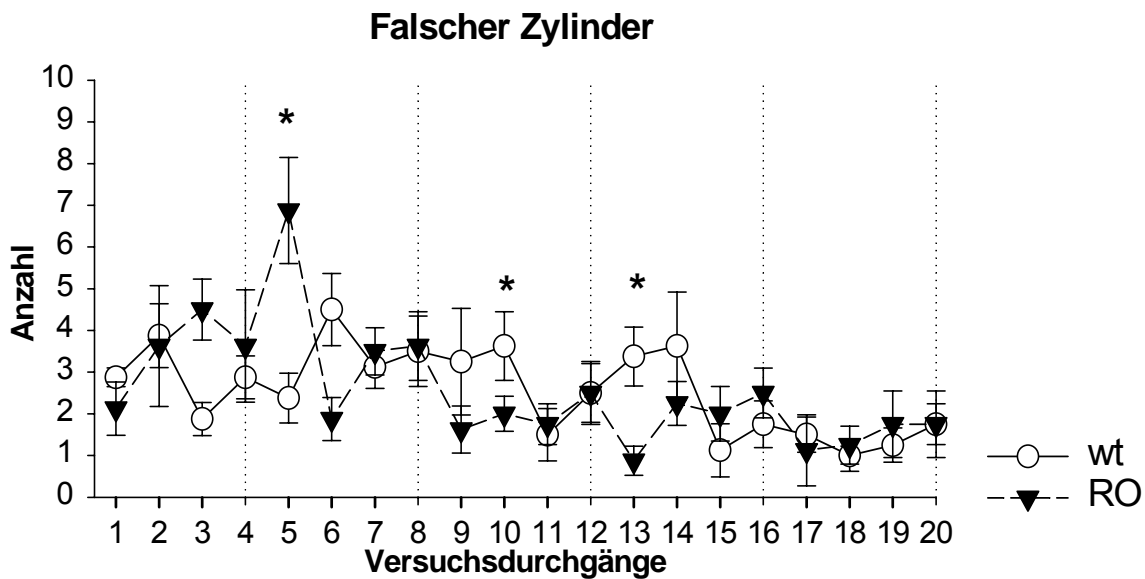


Abbildung 21: Bei dem Parameter zur Messung des deklarativen Gedächtnisses zeigten wt-Mäuse einen signifikanten Unterschied zu RO-Tieren. Während RO-Mäuse beim ersten Versuchsdurchgang am zweiten Tag mehr falsche Zylinder besuchten als wt-Mäuse, machten wt-Tiere mehr Fehler beim dritten Versuchsdurchgang am dritten Tag und beim ersten Durchgang am vierten Tag (* $p<0,05$ Mittelwerte \pm SEM).

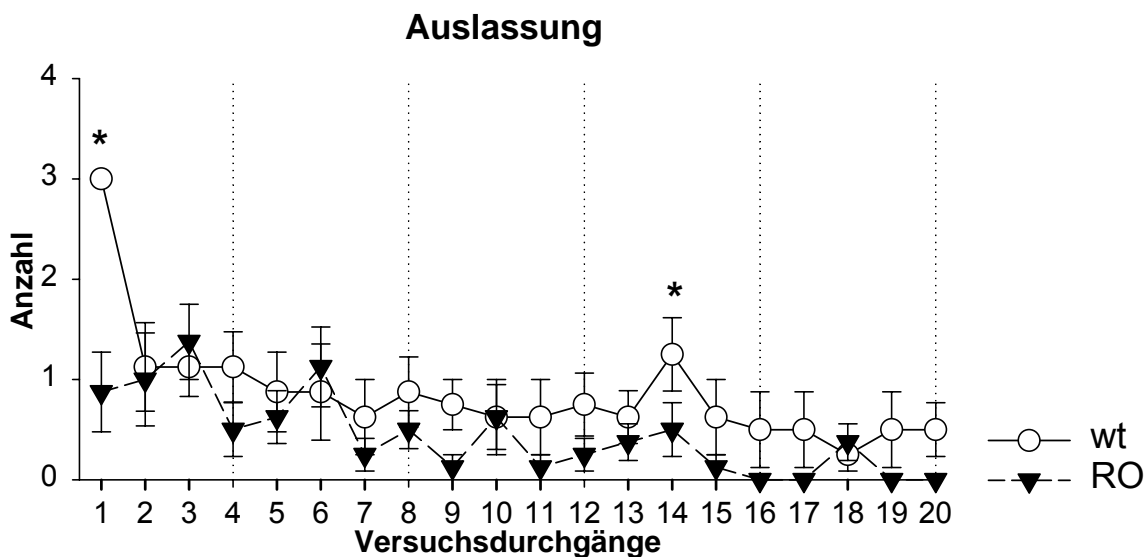


Abbildung 22: RO-Mäuse ließen während des ersten Versuchsdurchgangs am ersten Tag und des zweiten Versuchsdurchgangs am dritten Tag weniger Zylinder aus, als wt-Mäuse (* $p<0,05$ Mittelwerte \pm SEM).

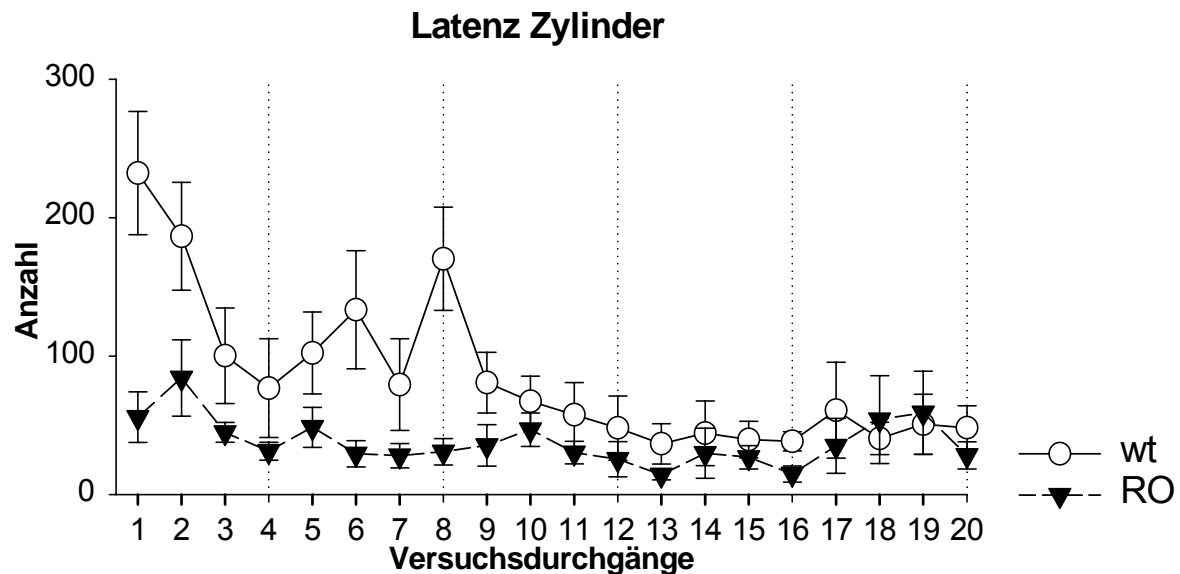


Abbildung 23: Bei der Latenz bis zum ersten Zylinderbesuch wurde eine signifikante Interaktion Mauslinie x Versuchsdurchgang ermittelt. Es zeigte sich, dass RO-Mäuse während der ersten und zweiten Versuchsdurchgänge eine bedeutend niedrigere Latenz zeigten als wt-Mäuse (Mittelwerte \pm SEM).

Trotz der Unterschiede in der Latenz bis zum ersten Zylinderbesuch zeigte sich keine Signifikanz für die Interaktion der Faktoren bei der Anzahl der explorierten Zylinder ($F_{12, 168}=1,31$; $p=0,22$; Abbildung 25).

Bei der Versuchsdauer konnte kein Unterschied zwischen den Mauslinien ermittelt werden ($F_{12, 168}=0,82$; $p=0,63$; Abbildung 25). Bezüglich der Angstparameter ergab die Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mauslinien (% *board*: $F_{12, 168}=1,58$; $p=0,10$; Abbildung 26; Latenz *board*: $F_{12, 168}=0,52$; $p=0,89$; *rearing board*: $F_{12, 168}=1,52$; $p=0,12$). Im Bezug auf die physiologische Erregung der Tiere ergab sich eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Mauslinie x Tag, wobei RO-Tiere am letzten Versuchstag über die Versuchsdurchgänge gemittelt weniger Kotbällchen absetzten als wt-Mäuse (Mauslinie x Versuchstag $F_{4, 56}=2,80$; $p=0,034$). Allerdings wurde kein Unterschied für den Parameter % *grooming* ermittelt ($F_{12, 168}=1,01$; $p=0,44$).

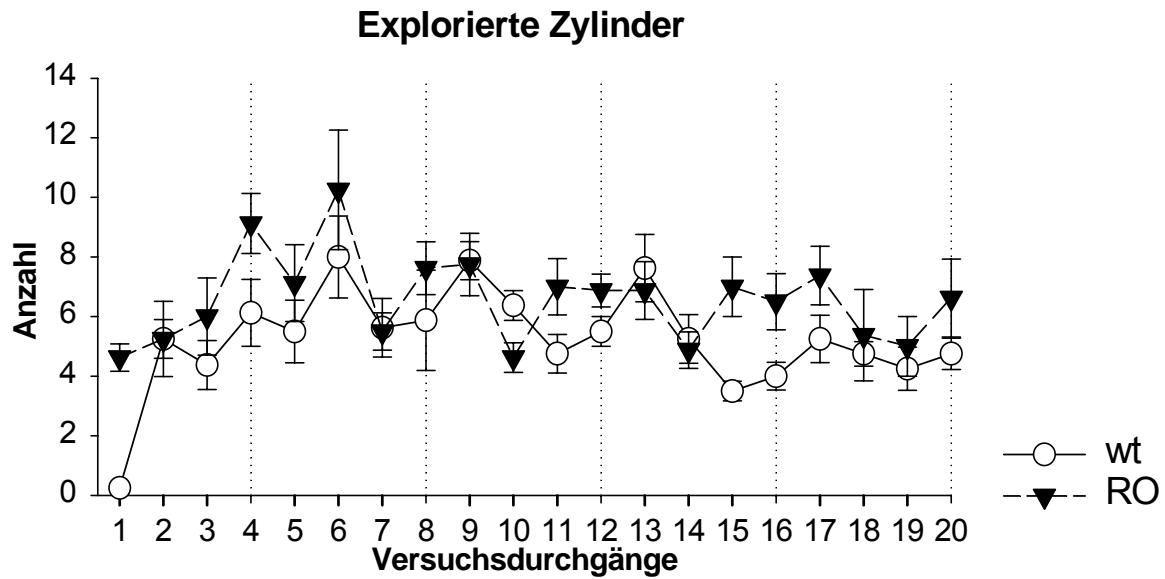


Abbildung 24: In dem räumlichen Lerntest zeigten beide Mauslinien keinen signifikanten Unterschied bei der Anzahl der explorierten Zylinder (Mittelwerte \pm SEM).

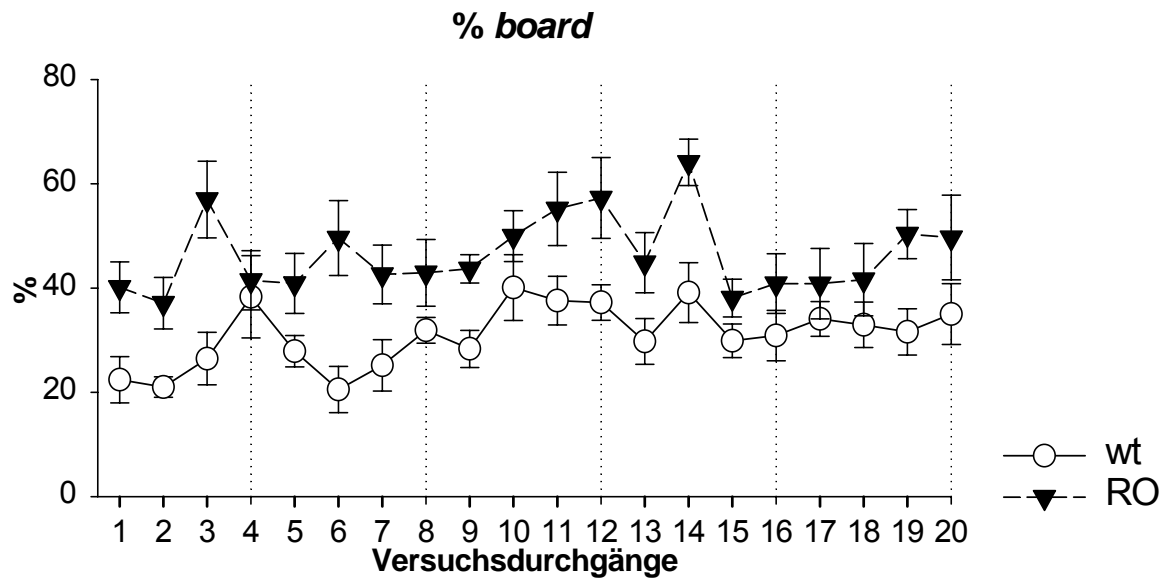


Abbildung 25: Die Zeit, welche die Tiere auf dem board verbrachten, dient zur Messung des angstbezogenen Verhaltens. Die Varianzanalyse ergab hierbei keinen Unterschied zwischen den beiden Mauslinien (Mittelwerte \pm SEM).

Bezüglich der lokomotorischen Aktivität (Linienübertritte) ergab die Interaktion aller drei Faktoren einen signifikanten Effekt ($F_{12, 168}=2,49$; $p=0,005$; Abbildung 27). Die post-hoc Analyse zeigte, dass RO-Mäuse weniger aktiv waren als wt-Tiere während des ersten ($p=0,001$) und zweiten ($p=0,001$) Versuchsdurchgangs am ersten Tag sowie während des ersten ($p=0,007$), zweiten ($p=0,02$) und dritten ($p=0,002$) Versuchsdurchgangs am zweiten Tag. Dieser Unterschied blieb bestehen während des ersten Versuchsdurchgangs am dritten Tag ($p=0,001$) und während des zweiten Versuchsdurchgangs des vierten Tages ($p=0,005$) sowie während des ersten Versuchsdurchgangs am fünften Tag ($p=0,01$). Im Gegensatz dazu wurde in der generellen Exploration (*rearing box*) keine signifikante Interaktion der drei Faktoren ermittelt ($F_{12, 264}=1,59$; $p=0,09$; Abbildung 28).

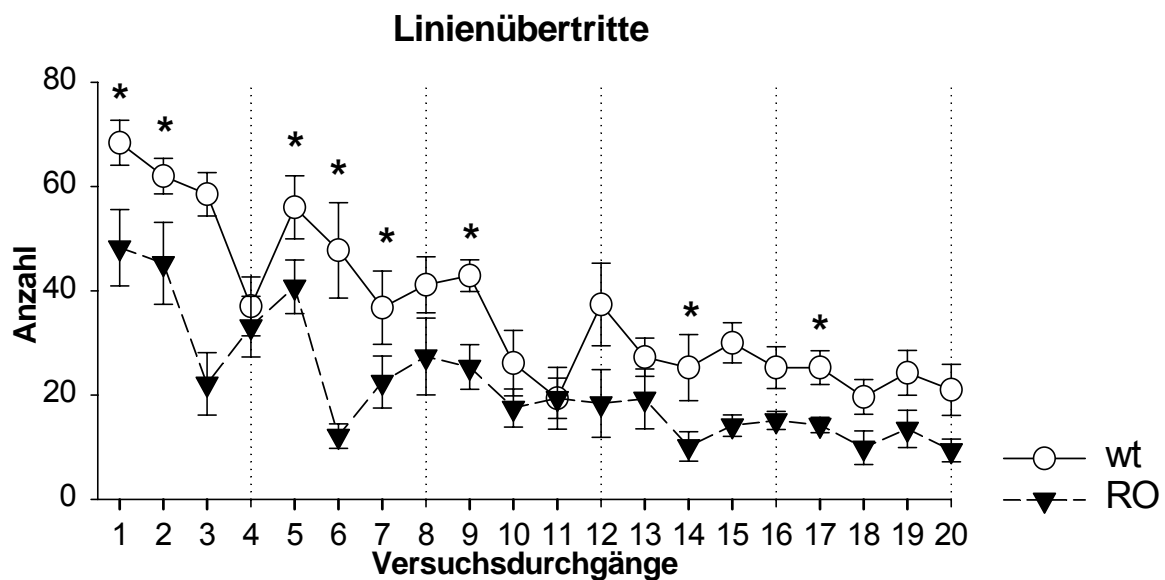


Abbildung 26: In der räumlichen Lernkurve im mHB war die lokomotorische Aktivität bei wt-Tieren signifikant höher als bei RO-Mäusen (Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0.05$).

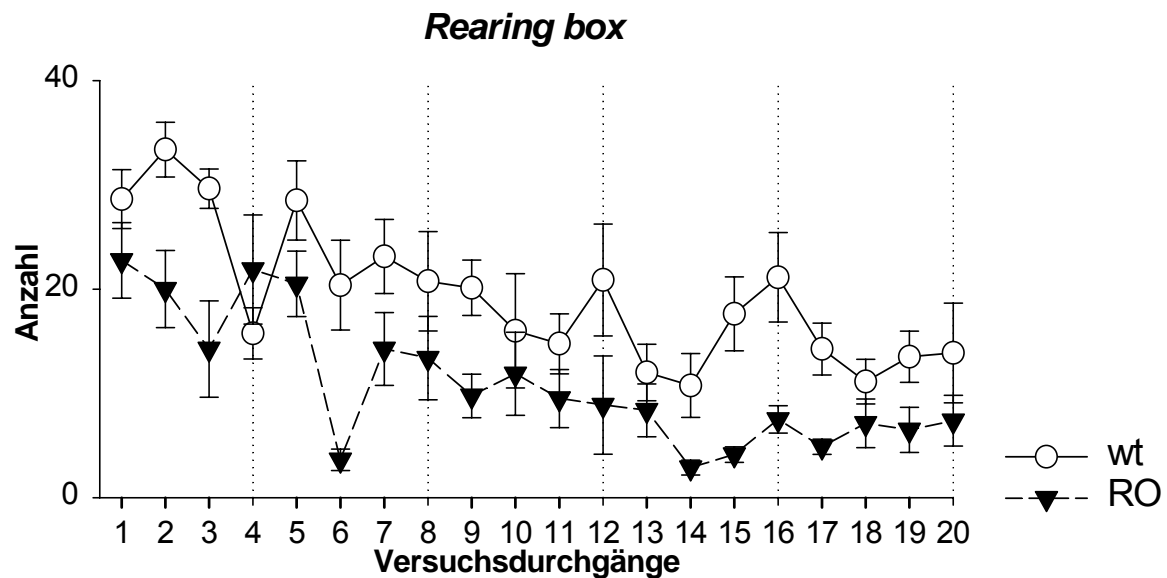


Abbildung 27: Bezüglich der generellen Exploration in der räumlichen Lernkurve zeigten die beiden Mauslinien keinen signifikanten Unterschied (Mittelwerte \pm SEM).

Die Analyse bezüglich der Interaktion mit der sozialen Gruppe ergab für beide Mauslinien keine signifikante Interaktion ($F_{12, 168}=1,33$; $p=0,21$).

3.4 Die pharmakologische Validierung

Zur Validierung des Verhaltensphänotyps der RO-Mäuse wurde ein selektiver Objekterkennungstest unter dem Einfluss eines Acetylcholinesterasehemmers (Metrifonate) durchgeführt. Eine Woche nach der Verhaltensphänotypisierung im mHB wurden RO-Mäuse ($n=13$) in der selektiven Objekterkennung getestet. Eine behandelte Gruppe (Pharma, $n=7$) wurde mit einer Vehikel-Gruppe (Vehikel, $n=6$) verglichen. Die Daten wurden mittels einer Zwei-Faktoren Varianzanalyse mit Messwiederholung ausgewertet, wobei Behandlung und Versuchstag die beiden unabhängigen Variablen darstellten. Bei einer signifikanten Interaktion der Faktoren wurde eine post-hoc Analyse durchgeführt. Demzufolge beziehen sich die aufgeführten Freiheitsgrade und p-Werte ausschließlich auf die Interaktion Behandlung x Versuchsdurchlauf sowie die Ergebnisse der post-hoc Analyse. Pharma-Tiere zeigten im Vergleich zu Vehikel Mäusen keine Unterschiede in der Lokomotion (gelaufene Distanz $F_{1, 11}=0,068$; $p=0,798$; Abbildung 26) und der generellen Exploration (*rearings* $F_{1, 11}=0,67$; $p=0,43$; Abbildung 26).

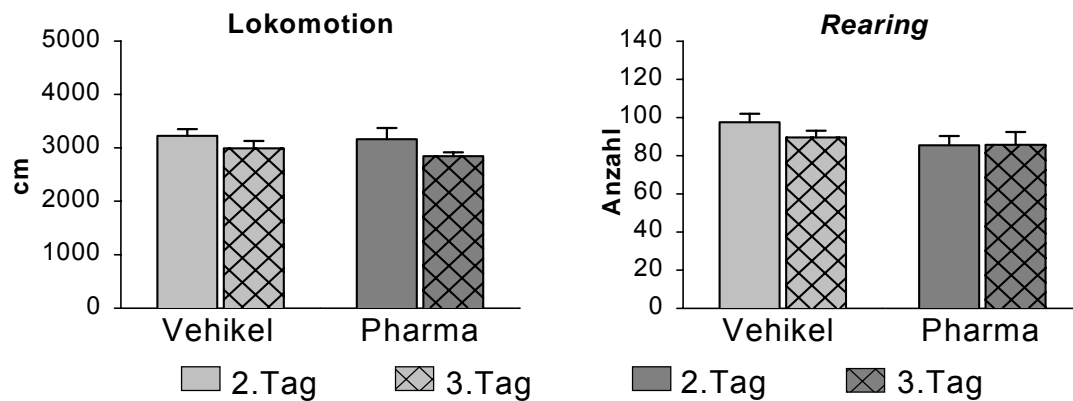


Abbildung 28: Bei der pharmakologischen Validierung zeigte sich in dem selektiven Objekterkennungstest bei der Lokomotion (gelaufene cm) und der generellen Exploration (rearing) kein signifikanter Unterschied zwischen Vehikel-Mäusen und der behandelten Gruppe (Mittelwert + SEM).

Bei der Exploration beider Objekte unterschieden sich die Pharma-Mäuse nicht von den Vehikel-Tieren (e_1 , e_2 ; $F_{1, 11}=0,082$; $p=0,78$; Abbildung 29).

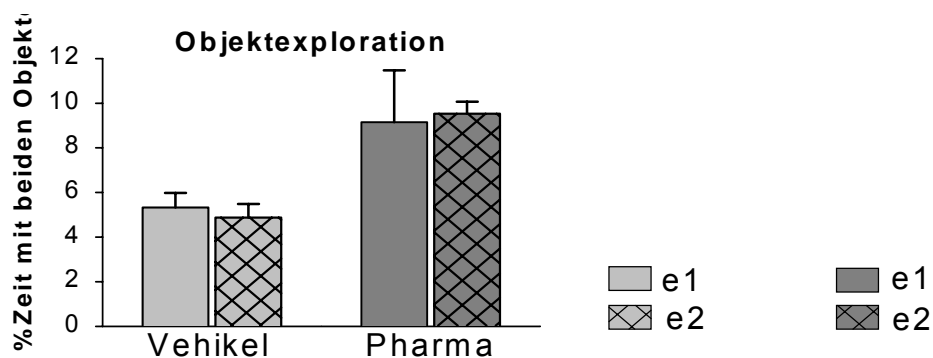


Abbildung 29: Pharma-Tiere explorierten die beiden identischen Objekte (Berechnung von e_1 und e_2 s. Abschnitt 2.3) am zweiten Versuchstag (e_1) genauso lang wie die verschiedenen Objekte am dritten Versuchstag (e_2). Des weiteren zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Linien bei der Objektexploration an den beiden Versuchstagen (Mittelwerte + SEM).

Der Vergleich beider Experimentalgruppen in den Quotienten q_1 und q_2 ergab eine signifikante Interaktion ($F_{1, 11}=7,01$; $p=0,023$; Abbildung 30). Die post-hoc Analyse zeigte, dass zum einen die Pharma-Tiere einen höheren q_2 als q_1 hatten ($p=0,01$) und zum anderen der q_2 der Pharma-Gruppe höher als q_1 ($p=0,02$) und höher als q_2 ($p=0,005$) der Vehikel-Tiere war.

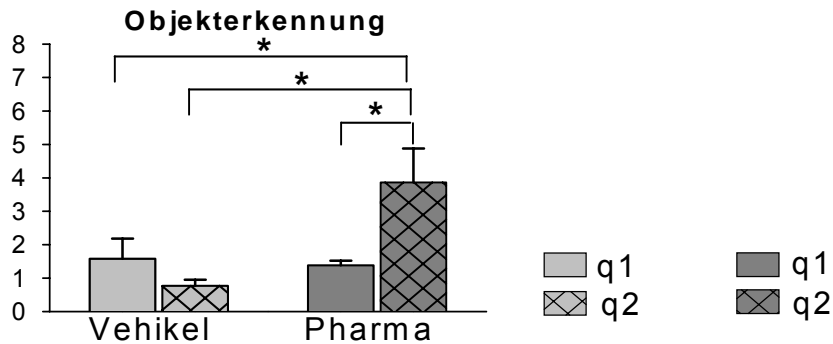


Abbildung 30: Die Quotienten zur Untersuchung der Objekterkennung (q1 und q2 zur Berechnung s. Abschnitt 2.3) ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsdurchläufen der Pharma-Tiere (q1 und q2). Des weiteren wurde ein signifikanter Unterschied zu den Vehikel-Tieren am zweiten und am dritten Versuchstag ermittelt. Während am zweiten Versuchstag Pharma-Mäuse wie auch Vehikel-Tiere beide identischen Objekte ungefähr gleich lang explorierten, verbrachten Pharma-Mäuse mehr Zeit mit dem unbekanntem Objekt am dritten Versuchstag verglichen mit Vehikel-Mäusen (Mittelwerte + SEM; * $p < 0.05$).

3.5 c-Fos Analyse nach der selektiven Objekterkennung

Für die Auswertung der c-Fos Färbung wurden pro Tier und Hirnregion 20 Hirnschnitte analysiert. Dabei wurde die Anzahl der Zellen willkürlich von jeweils einer Hemisphäre ermittelt. Anschließend wurde aus diesen Zahlen der Mittelwert der aktiven Zellen pro Tier und Hirnregion errechnet. Diese Mittelwerte gingen als absolute Zahl für jedes Tier pro Hirnregion in die Ein-Faktoren Varianzanalyse ein. Die zwei Kontrollgruppen (Stress, basal) dienten zur Überprüfung der Methode. Somit wurde bei diesen Tieren ausschließlich die Anzahl der c-Fos exprimierenden Zellen im Nukleus Paraventricularis gezählt. Hierbei zeigte die Versuchsgruppe nach 10 minütigem Schwimmen eine signifikante Erhöhung der c-Fos Expression verglichen mit den basalen Tieren ($F_{1, 11} = 6,27$; $p = 0,03$; Abbildung 31).

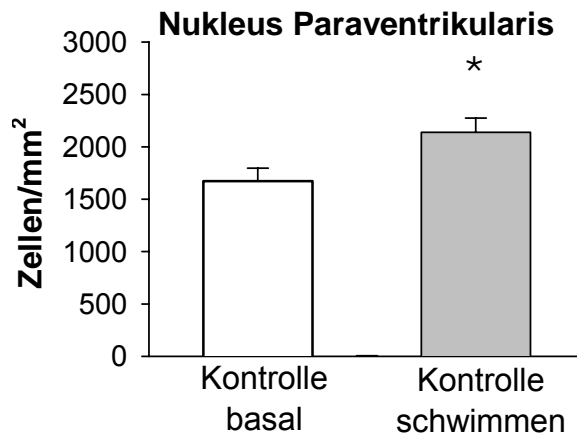


Abbildung 31: Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung von c-Fos im PVN der beiden Kontrollgruppen zeigte signifikant mehr aktive Zellen bei den gestressten Tieren verglichen mit unbehandelten basalen Mäusen ($n=6$; Mittelwerte + SEM; * $p < 0.05$).

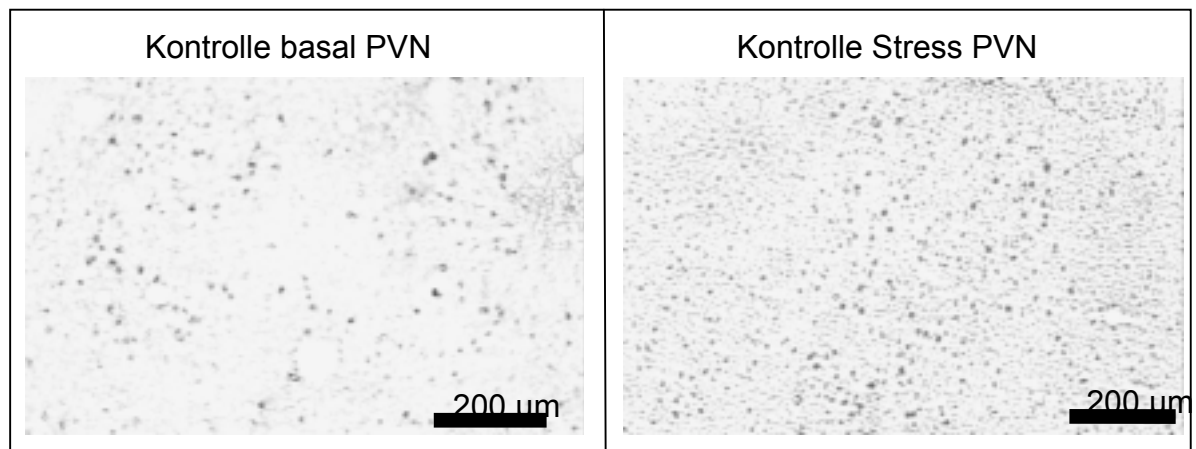


Abbildung 32: Exemplarische Ausschnitte aus dem PVN (10fach vergrößert) zeigen die c-Fos Expression bei der basalen Kontrollgruppe im Vergleich zu Mäusen, welche durch Schwimmen gestresst wurden.

Die Resultate der RO-Mäuse verglichen mit wt-Tieren nach der selektiven Objekterkennung zeigten einen signifikanten Effekt sowohl im *Barrel Kortex* als auch im perirhinalen Kortex. Während RO-Mäuse im *Barrel Kortex* mehr c-Fos exprimierten als wt-Tiere ($F_{1, 11} = 5,5$; $p=0,04$; Abbildung 33), zeigten sie im

perirhinalen Kortex eine signifikant geringere Expression als wt-Mäuse ($F_{1, 11} = 10,96$; $p = 0,007$; Abbildung 34).

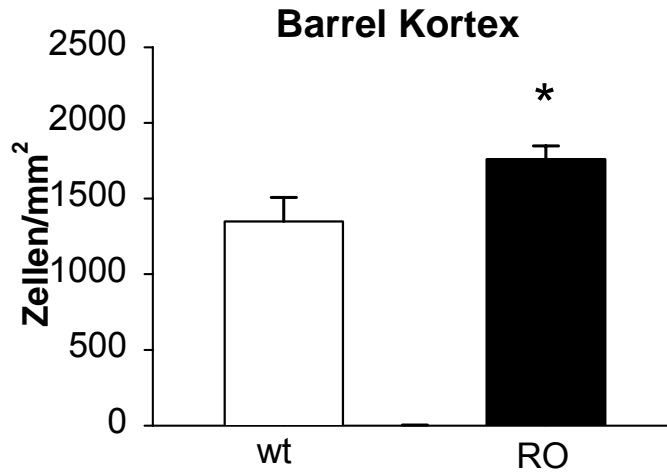


Abbildung 33: Die quantitative Auswertung der c-Fos Expression im Barrel Kortex ergab signifikant mehr aktive Zellen bei RO-Mäusen verglichen mit wt-Tieren ($n=6$; Mittelwerte + SEM; * $p < 0.05$).

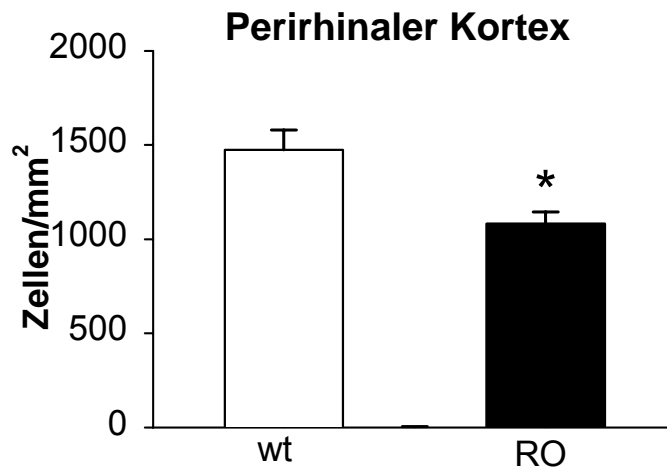


Abbildung 34: Während der selektiven Objekterkennung exprimierten RO-Tiere signifikant weniger c-Fos im perirhinalen Kortex als wt-Mäuse ($n=6$; Mittelwerte + SEM; * $p < 0.05$).

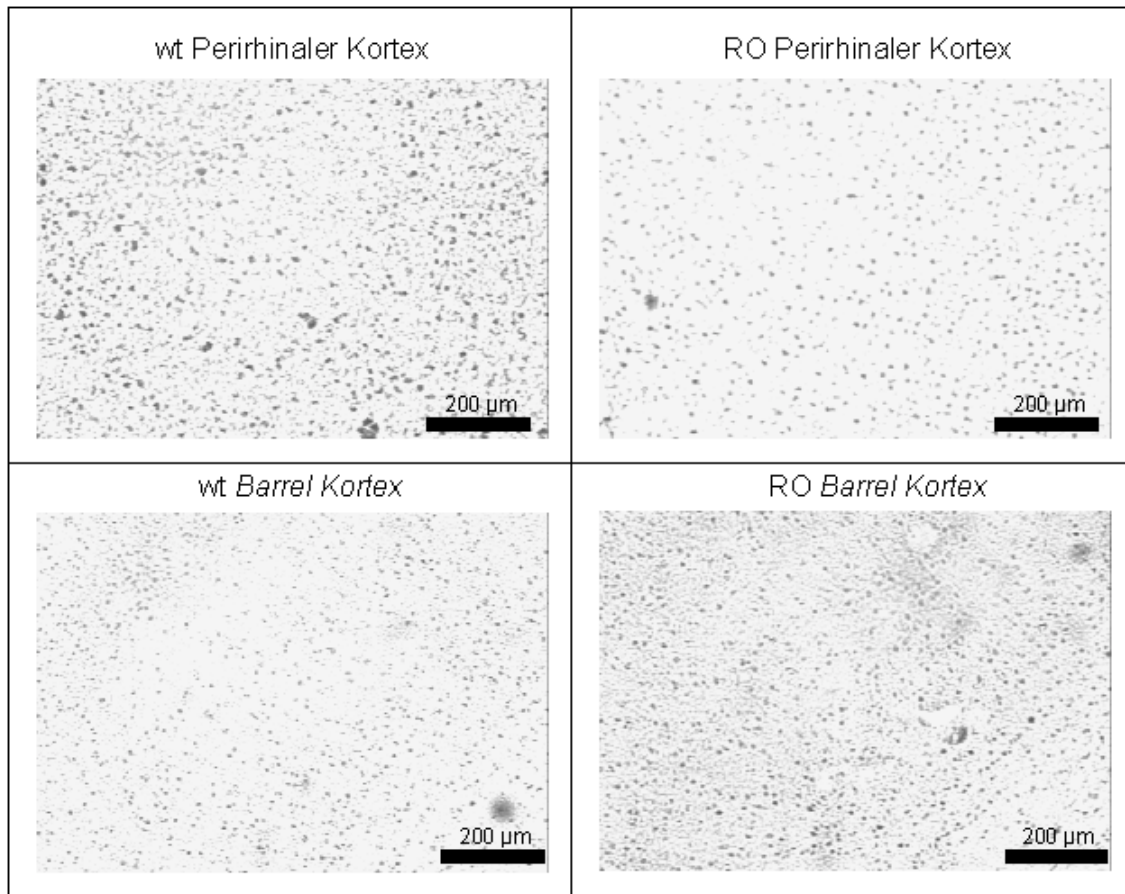


Abbildung 35: Exemplarische Darstellung des Barrel Kortex und perirhinalen Kortex in Hirnschnitten (10 fach vergrößert) von wt- und RO-Mäusen mit einer immunohistochemischen c-Fos Färbung. Die Tiere wurden zuvor in einem selektiven Objekterkennungstest untersucht.

3.6 Die Kopplungsanalyse

Für die Kopplungsanalyse wurden 93 Mikrosatellitenmarker verstreut über das gesamte Genom bei 48 phänotyp positiven N2-Tieren der RO-Linie untersucht. Die Auswertung erfolgte mittels eines Chi-Quadrat-Tests, wobei die zu erwartende Häufigkeit des Auftretens von parentalen bzw. rekombinanten Loci mit der beobachteten Häufigkeit verglichen wurde.

Als Signifikanzschwelle wurde $\chi^2=15$; $p=0,0001$ festgelegt. Die Auswertung der Kopplungsanalyse ergab keine signifikante Kopplung zwischen dem Phänotyp und einem genetischen Marker (Tabelle 11).

Tabelle 11: Resultate der statistischen Auswertung der Kopplungsanalyse.

Marker	parental	rekombinant	Chi2
D1Mit211	49%	51%	0,02
D1Mit216	54%	46%	0,23
D1Mit303	58%	42%	0,95
D1Mit338	53%	47%	0,11
D1Mit424	54%	46%	0,22
D2Mit365B	49%	51%	0,02
D2Mit380B	43%	57%	0,9
D2Mit411A	53%	47%	0,11
D2Mit525A	48%	53%	0,1
D3Mit130A	49%	51%	0,02
D3Mit169A	56%	44%	0,61
D3Mit76	56%	44%	0,61
D3Mit84	61%	39%	1,98
D4Mit180A	46%	54%	0,22
D4Mit31	35%	65%	3,6
D4Mit39	49%	51%	0,02
D4Mit87	44%	56%	0,61
D5Mit138A	38%	63%	2,5
D5Mit20A	42%	58%	0,95
D5Mit255	51%	49%	0,02
D5Mit388A	61%	39%	1,68
D6Mit105	63%	37%	2,13
D6Mit183	54%	46%	0,22
D6Mit289A	48%	53%	0,1
D6Mit348	46%	54%	0,23
D7Mit145	39%	61%	1,98
D7Mit227	46%	54%	0,22
D7Mit238	46%	54%	0,22
D7Mit259	54%	46%	0,22
D8Mit112A	44%	56%	0,61
D8Mit31	46%	54%	0,22
D8Mit339A	56%	44%	0,5
D8Mit42A	46%	54%	0,22
D9Mit12	39%	61%	1,98
D9Mit18A	34%	66%	4,12
D9Mit289A	48%	53%	0,1
D9Mit297A	44%	56%	0,64
D9Mit311A	33%	68%	4,9
D10Mit123A	46%	54%	0,22
D10Mit134	38%	62%	2,08
D10Mit271	41%	59%	1,2
D10Mit3A	45%	55%	0,4

Marker	parental	rekombinant	Chi2
D10Mit42A	46%	54%	0,22
D11Mit214	39%	61%	1,98
D11Mit242	56%	44%	0,61
D11Mit271	61%	39%	1,98
D11Mit322	54%	46%	0,23
D11Mit36	56%	44%	0,61
D11Mit82	57%	43%	0,9
D11Mit86	60%	40%	1,6
D12Mit221	54%	46%	0,22
D12Mit259	47%	53%	0,11
D12Mit263	53%	48%	0,1
D12Mit34A	47%	53%	0,11
D13Mit139A	33%	67%	5,33
D13Mit14	33%	67%	5,33
D13Mit144A	38%	63%	3
D13Mit164	29%	71%	8,33
D13Mit198	31%	69%	6,75
D13Mit202A	41%	59%	1,2
D13Mit21	35%	65%	4,08
D13Mit24	38%	62%	2,57
D13Mit262	48%	53%	0,1
D13Mit287	38%	62%	2,08
D13Mit30	34%	66%	4,79
D13Mit63	30%	70%	7,68
D13Mit64	30%	70%	7,68
D13Mit67	40%	60%	2,08
D13Mit88	31%	69%	6,75
D13Mit97	38%	63%	3
D14Mit155A	58%	42%	0,95
D14Mit174A	60%	40%	1,6
D14Mit97B	56%	44%	0,61
D15Mit171	42%	58%	0,95
D15Mit270A	50%	50%	0
D15Mit85	45%	55%	0,4
D16Mit101	38%	63%	3
D16Mit30A	35%	65%	4,08
D16Mit146	38%	63%	3
D16Mit189A	41%	59%	1,2
D16Mit5	41%	59%	1,32
D16Mit75A	40%	60%	2,08
D16Mit88A	40%	60%	2,08
D17Mit133A	44%	56%	0,61
D17Mit180	43%	57%	0,9

Marker	parental	rekombinant	Chi2
D17Mit206	49%	51%	0,02
D18Mit183	55%	45%	0,4
D18Mit187	65%	35%	3,6
D18Mit60	45%	55%	0,4
D19Jpk1A	40%	60%	2,08
D19Mit11	38%	62%	2,57
D19Mit111	34%	66%	4,12
D19Mit19	43%	57%	0,9

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung und Penetranz des Verhaltensphänotyps der RO-Linie

Zur Erforschung von psychischen Krankheiten sind Tiermodelle von unerlässlicher Bedeutung. Im Gegensatz zu pharmakologisch oder verhaltensbiologisch induzierten Krankheitsbildern bei Versuchstieren kann man bei genetisch manipulierten Tiermodellen neben der Symptomatik auch die zugrundeliegenden Ursachen und die Behandlungsmöglichkeiten einer Erkrankung untersuchen (Mckinney & Bunney 1969). Die Validität eines klinisch relevanten Tiermodells basiert daher neben einem stabilen Verhaltensphänotyp auch auf einer pharmakologischen Validierung dieses Phänotyps. In Verbindung mit dem ENU Projekt wird vor allem auch die Identifikation noch nicht erforschter Kandidatengene angestrebt (Soewarto et al., 2000; Hrabé de Angelis et al., 2000).

4.1.1 Der Verhaltensphänotyp

Die Exploration einer neuen Umgebung ist essentiell für das Überleben eines Tieres. Zum Zweck der Futtersuche wie auch zur Entdeckung von Gefahren besitzen die meisten Lebewesen einen natürlichen Explorationsantrieb (Berlyne, 1960). Diese angeborenen Eigenschaften können als Basis zur Untersuchung des Verhaltensphänotyps bei Mäusen genutzt werden. Im mHB wurden diese natürlichen Verhaltensweisen in einer Vielzahl von Parametern gemessen, um so den Verhaltensphänotyp von C3H-wt-Mäusen und RO-Tieren zu untersuchen (s. Kapitel 2.2.1). Hierbei zeigten RO-Mäuse ein ähnliches Verhalten wie wt-Tiere bezüglich der Lokomotion, der Exploration, des Angstverhaltens und der sozialen Affinität. Allein die Parameter zur Messung der Objektdiskriminierung (Abbildung 15) lagen bei den RO-Tieren außerhalb der Normwerte, die für das Verhalten der wt-Tiere berechnet wurden. Obwohl RO-Mäuse die Objekte insgesamt ähnlich lange explorierten wie wt-Mäuse (Abbildung 10), verbrachten sie diese Zeit vorwiegend mit dem bekannten Objekt. Diese Verhaltensweise deutete auf eine beeinträchtigte Fähigkeit bei der Diskriminierung zwischen dem bekannten und unbekanntem Stimulus hin. Auffällig ist hierbei, dass wt-Mäuse basal beide Objekte fast zeitgleich explorieren (Abbildung 16), während sie in der Konfirmation das

bekannte Objekt zuerst untersuchten. RO-Tiere hingegen verhielten sich diesbezüglich in beiden Versuchsdurchgängen identisch, indem sie das bekannte Objekt deutlich vor dem Unbekannten explorierten.

Studien zufolge explorieren Tiere, die zwischen einem bekannten und einem unbekanntem Objekt wählen können, das unbekannte bedeutend länger (Ennaceur & Delacour, 1988; Buckley & Gaffan, 1998; Bussey & Saksida, 2002; Tanaka, 1993; Powell et al., 2002; Swards & Swards, 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Tiere mit Läsionen im perirhinalen Kortex beide Objekte ungefähr gleich lang explorierten (Bussey, et al. 2003; Buckley & Gaffan, 1998; Bussey & Saksida, 2002; Mumby et al. 2002). Daraus wurde geschlossen, dass Nagetiere mit einem intakten Gedächtnissystem einen bekannten Stimulus als solchen erkennen und daraufhin mehr Zeit mit dem unbekanntem Objekt verbringen. Das Verhalten der wt-Tiere in der vorliegenden Studie entsprach demzufolge einem funktionierenden Gedächtnissystem, während die beeinträchtigte Objekterkennung bei RO-Tieren auf einen Fehler in einem der notwendigen Verarbeitungssysteme hindeutete. Dabei können unterschiedliche Faktoren eine Rolle spielen. Zur Wiedererkennung eines Objektes gehört neben der Gedächtnisleistung auch die Fähigkeit zur Wahrnehmung des Gegenstandes. Zur genaueren Untersuchung der RO-Linie wurden im Laufe dieser Arbeit weitere Verhaltenstests sowie immunhistologische Methoden angewandt.

4.1.2 Penetranz

Zur Untersuchung der Stabilität und Penetranz des Verhaltensphänotyps wurde die RO-Linie über sieben Generationen auf der C3H-Inzuchtlinie basierend gezüchtet (Abbildung 36). Der Phänotyp galt als bestätigt, wenn ein Tier bei der Relation der verbrachten Zeit mit den jeweiligen Objekten mehr als $2,75/2 \times$ Standardabweichung vom wt-Verhalten abwich. Es wurde von jeder Generation eine Stichprobe von Tieren getestet. Die Penetranz des Phänotyps lag im Durchschnitt über alle Generationen bei 46%, wobei zwischen den Generationen erhebliche Schwankungen zu beobachten waren. Bei einer dominanten Variante geht man theoretisch von einer Penetranz von 50% aus, da jeweils eine Variante mit einer wt-Maus verpaart wird. Folglich sollten 50% der Tiere zwei wt-Allele erhalten und die anderen 50% ein wt-Allel und das veränderte dominante Allel der Varianten erben (Mendel, 1865).

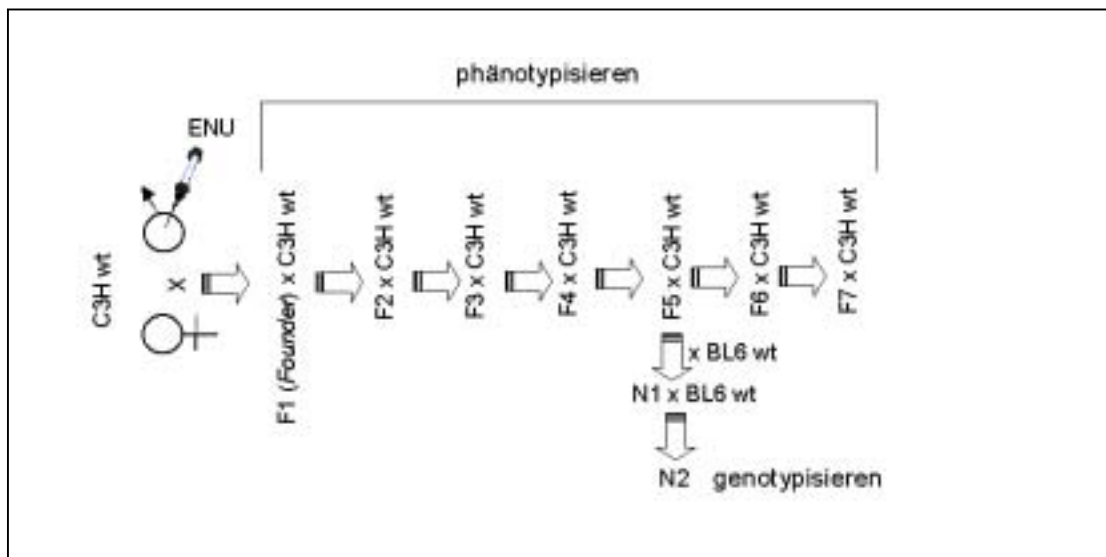


Abbildung 36: Schema des Zuchtplans der RO-Linie, bei welcher ein dominanter Vererbungsgang vermutet wurde.

Die großen Schwankungen zwischen den Generationen könnten größtenteils auf die relativ geringe Anzahl der getesteten Tiere pro Generation zurückzuführen sein. Wichtig war, dass der Phänotyp in jeder Generation erneut beobachtet wurde. Die durchschnittliche Penetranz von 46% wies darauf hin, dass insgesamt eine Annäherung an den statistisch idealen Wert von 50% durch eine große Anzahl von Tieren erreicht wurde. Man kann in dem Fall nicht von einer vollständigen Penetranz sprechen. Jedoch wurde der Phänotyp mit einer nahezu idealen Häufigkeit weiter vererbt.

4.2 Die selektive Objekterkennung

Die selektive Objekterkennung ist ein Verhaltenstest, bei dem den Tieren außer dem bekannten und unbekanntem Objekt kein weiterer Stimulus präsentiert wird. Der selektive Objekterkennungstest wurde zur Untersuchung des deklarativen Gedächtnisses entwickelt, da die Tiere das bekannte Objekt als solches erkennen müssen (Ennacour & Delacour, 1988; Dodart et al., 1997). Hierbei handelt es sich um eine hypothesenorientierte gezielte Untersuchung, sodass eine Vielzahl von Verhaltensweisen wie z.B. sozialer Kontakt und Angstverhalten, die im mHB gemessen wurden, im selektiven Objekterkennungstest nicht untersucht werden können. Dafür werden Unterschiede zwischen den Tieren bezüglich der

Objekterkennung verstärkt hervorgehoben. Aufgrund des Versuchsaufbaus ist es möglich, die Exploration von zwei identischen unbekanntem Objekten mit der von einem bekannten und einem unbekanntem Objekt zu vergleichen.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus der Verhaltensphänotypisierung im *mHB* konnte bei der selektiven Objekterkennung kein Unterschied bezüglich der Lokomotion und generellen Exploration (Abbildung 17) zwischen den Tieren gefunden werden. Obwohl RO-Tiere die beiden identischen Objekte insgesamt länger explorierten als *wt*-Mäuse (Abbildung 18), ergab sich bei beiden Mauslinien keine Präferenz für eines der Objekte (Abbildung 19). Folglich kann eine Seitenpräferenz der Tiere ausgeschlossen werden.

Im Laufe des Objekterkennungstests investierten beide Mauslinien gleich viel Zeit in die Exploration der beiden verschiedenen Objekte (Abbildung 18). Allerdings zeigten *wt*-Mäuse im Gegensatz zu RO-Tieren mehr Interesse für das unbekanntem Objekt als für das bekannte (Abbildung 19). Diese Verhaltensweise deutete darauf hin, dass RO-Tiere schlechter zwischen den Objekten diskriminieren konnten als *wt*-Mäuse (Bartolini et al., 1996; Sargolini et al., 2002, Ryabinin et al., 2002). Aufgrund der Zeit, welche die beiden Mauslinien zur Objektexploration verwendeten kann ausgeschlossen werden, dass die beeinträchtigte Objekterkennung auf einer reduzierten Motivation der RO-Mäuse beruhen könnte. Allerdings blieb weiterhin ungeklärt, ob RO-Tiere die Objekte schlechter wahrnehmen konnten oder ob es sich um eine reduzierte Gedächtnisleistung handelte. Insgesamt bestätigten die Resultate, dass RO-Mäuse nicht nur in einem komplexen Verhaltenstest wie dem *mHB* eine reduzierte Fähigkeit zur Objekterkennung zeigten, sondern auch in einem selektiven Objekterkennungstest. Daraus lässt sich schließen, dass es sich bei der RO-Linie um einen stabilen Phänotyp handelte, der sich nicht auf einen spezifischen Versuchsaufbau bezog.

4.3 Die räumliche Lernkurve

Bei der räumlichen Lernkurve sollten die Tiere lernen, eine Markierung an einem Zylinder mit einer Futterbelohnung zu assoziieren. Bei dieser komplexen kognitiven Aufgabe kann sowohl die Leistung des Arbeitsgedächtnisses als auch die des deklarativen Gedächtnisses untersucht werden. Die zeitlich begrenzte Speicherkapazität des Arbeitsgedächtnisses sollte durch wiederholte Besuche

eines markierten Zylinders innerhalb eines Versuchsdurchgangs eingeschätzt werden. Die Leistung des deklarativen Gedächtnisses dagegen wurde mittels der Anzahl der Besuche der falschen Zylinder definiert (siehe Kapitel 2.5). Im Gegensatz zum Objekterkennungstest wurde hierbei die Fähigkeit des Erlernens einer assoziativen Aufgabenstellung und weniger das angeborene Explorationsverhalten untersucht. Aufgrund der räumlichen Komponente wird bei diesem Verhaltensversuch neben dem perirhinalen Kortex auch der Hippokampus zur Verarbeitung der Aufgabenstellung benötigt, was einen weiteren Unterschied zur Objekterkennung darstellte.

Das Verhalten der Tiere deutete weder auf einen Unterschied bezüglich des Arbeitsgedächtnisses noch auf Abweichungen in der deklarativen Gedächtnisleistung hin. Beide Mauslinien benötigten die gleiche Zeit bis zum Lösen der Aufgabenstellung. Die grundlegende Motivation, in einem Zylinder nach der Futterbelohnung zu suchen, war bei den RO-Tieren anfangs tendenziell höher als bei wt-Mäusen (Abbildung 23). Jedoch zeigte sich auch nach einer Angleichung beider Mauslinien in diesem Parameter kein Unterschied in der kognitiven Leistung der Tiere. Die Motivation, alle drei Futterbelohnungen zu suchen, wurde mit der Anzahl der ausgelassenen Futterbelohnungen (Abbildung 22) eingeschätzt und auch hier war kein Unterschied zwischen den beiden Mauslinien festzustellen.

In dem räumlichen Lerntest waren RO-Tiere in der *box* sowohl lokomotorisch als auch bei der generellen Exploration weniger aktiv als wt-Mäuse (Abbildung 26 und 27). Im Gegensatz dazu verbrachten sie tendenziell mehr Zeit auf dem *board* (Abbildung 25). Allerdings besuchten RO-Tiere trotz ihrer vermehrten Zeit auf dem *board* nicht mehr Zylinder als wt-Mäuse (Abbildung 24).

In einer Studie von Roullet & Lasalle (1995) wurden acht verschiedene wt-Mauslinien in einem komplexen räumlichen Verhaltensversuch mit Futterbelohnung getestet. Als Ergebnis zeigte sich, dass C3H-Mäuse die Aufgabenstellung nach fünf Versuchsdurchgängen nicht erfüllen konnten. Aus dem Grund wurden diese Mäuse in einem zweiten Experiment mit fünfzehn Versuchsdurchgängen erneut untersucht. Die Resultate ließen darauf schließen, dass C3H-wt-Mäuse einen unterdurchschnittlichen Lerneffekt zeigten. Als Erklärung wurde auf die visuelle Beeinträchtigung von C3H-Tieren hingewiesen, da diese wt-Linie unter einer retinalen Degeneration leidet und im Alter von fünf

Wochen komplett erblindet (Sidman & Green, 1965; Nagy & Misanin, 1970). Ammassari-Teule et al. (1993) kamen zu den gleichen Resultaten im Bezug auf C3H-wt-Mäuse. Allerdings führte hier eine Modifizierung des Labyrinths, in welchem taktile Orientierungshilfen eingebaut wurden, dazu dass C3H-wt-Tiere eine Verbesserung der Lernleistung zeigten. Nagetiere können mit Hilfe ihrer Schnurrhaare auch geringe taktile Unterschiede ertasten und somit die eher geringen visuellen Fähigkeiten ausgleichen (Guió-Robles et al., 1989; Lipp & Van der Loos, 1991; Brecht et al., 1997).

In der räumlichen Lernkurve wurden die Zylinder mit Futterbelohnung mittels eines Textilbandes markiert. Dies führte zu einem Unterschied in der Oberflächenstruktur zwischen den richtigen und den falschen Zylindern, welcher von den Mäusen ertastet werden konnte. Somit konnten auch blinde Tiere einen richtigen von einem falschen Zylinder unterscheiden. Insgesamt zeigten beide Mauslinien eine vorhandene Lernfähigkeit, die sich vor allem in der Reduktion der Versuchsdauer verdeutlichte. Allerdings ließ sich in der erbrachten Leistung kein Unterschied zwischen den beiden Mauslinien feststellen. Folglich schienen RO-Mäuse im Bezug auf räumliche hippokampusabhängige Aufgabenstellungen keine Beeinträchtigung zu besitzen. Man kann somit davon ausgehen, dass es sich bei dem Verhaltensphänotyp der RO-Mäuse um einen sehr spezifischen Phänotyp handelte, welcher sich selektiv auf ganz bestimmte Gedächtnissysteme beschränkte.

4.4 Die pharmakologische Validierung

Die klinische Relevanz eines Tiermodells beruht neben einem vergleichbaren Krankheitsbild vor allem auch auf einer aussagefähigen Behandlungsmöglichkeit (Mckinney & Bunney, 1969). Demzufolge stellen pharmakologische Untersuchungen einen essentiellen Schritt zur Validierung eines Tiermodells dar. In der vorliegenden Arbeit wurde zur pharmakologischen Bestätigung der RO-Linie der Acetylcholinesterasehemmer Metrifonate eingesetzt. Eine Vielzahl von Untersuchungen mit läsionierten Tieren und Alzheimerpatienten konnte zeigen, dass Metrifonate zu einer Verbesserung der kognitiven Leistung führte (Cummings et al., 2000; Williams, 1999; Lamb & Faulds, 1997; Ikonen et al., 1999; Scali et al., 1997; Riekkinen et al., 1996). Seine Wirkung basiert auf einer Erhöhung der Acetylcholin-Konzentration im Gehirn, durch Inhibition des Enzyms

Acetylcholinesterase. Zur Analyse der pharmakologischen Wirkung auf das Verhalten der Tiere wurde eine Gruppe behandelter RO-Mäuse mit einer Vehikel-Gruppe, ebenfalls bestehend aus Tieren der RO-Linie, in einem selektiven Objekterkennungstest verglichen. Bei der Objektexploration konnte eine generelle Seitenpräferenz bei beiden Experimentalgruppen ausgeschlossen werden, da keines der beiden identischen Objekte länger exploriert wurde als das andere (Abbildung 30). Bei der Objektdiskriminierung wurde durch die Behandlung mit Metrifonate eine eindeutige Verbesserung erzielt, die dazu führte, dass die behandelten Tiere mehr Zeit mit dem unbekanntem Objekt verbrachten (Abbildung 30). Folglich konnte man davon ausgehen, dass das bekannte Objekt als solches erkannt wurde. Allerdings verbrachten die Vehikeltiere sowohl am zweiten als auch am dritten Tag insgesamt weniger Zeit mit den Objekten als die behandelten Tiere (Abbildung 29). Dies bestätigt die Behauptung von Blokland (1996), dass der Neurotransmitter Acetylcholin primär für eine erhöhte Aufmerksamkeit verantwortlich gemacht werden sollte, welche auch zu einer Verbesserung der Gedächtnisleistung führt. Die verstärkte Aufmerksamkeit der behandelten Tiere wird durch die Tatsache unterstrichen, dass beide Versuchsgruppen keinen Unterschied in der generellen Exploration zeigten.

In Übereinstimmung mit früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Tiere, die ursprünglich in ihrer Gedächtnisleistung beeinträchtigt waren, durch eine pharmakologische Behandlung mit Metrifonate ihre Gedächtnisleistung erheblich steigern konnten (Scali et al., 1997; Riekkinen et al., 1996; Liu et al., 2002; Ikonen et al., 1999). Folglich schienen Mäuse der RO-Linie ein geeignetes Tiermodell für Demenz oder Amnesie darzustellen. RO-Tiere zeigten auf der Verhaltensebene sowohl eine vergleichbare Symptomatik als auch eine Verbesserung dieser Symptome nach einer entsprechenden pharmakologischen Behandlung.

4.5 Die Rolle des perirhinalen Kortex im Gedächtnissystem des Temporallappens

Der perirhinale Kortex gehört zusammen mit dem Hippokampus, dem parahippokampalen Kortex und dem entorhinalen Kortex zum Gedächtnissystem des medialen Temporallappens (Abbildung 36). Dieses System ist unter anderem für die Verarbeitung des deklarativen Gedächtnisses zuständig. Eine Störung eines der Glieder dieses Kreises hat erhebliche Gedächtnisstörungen zur Folge.

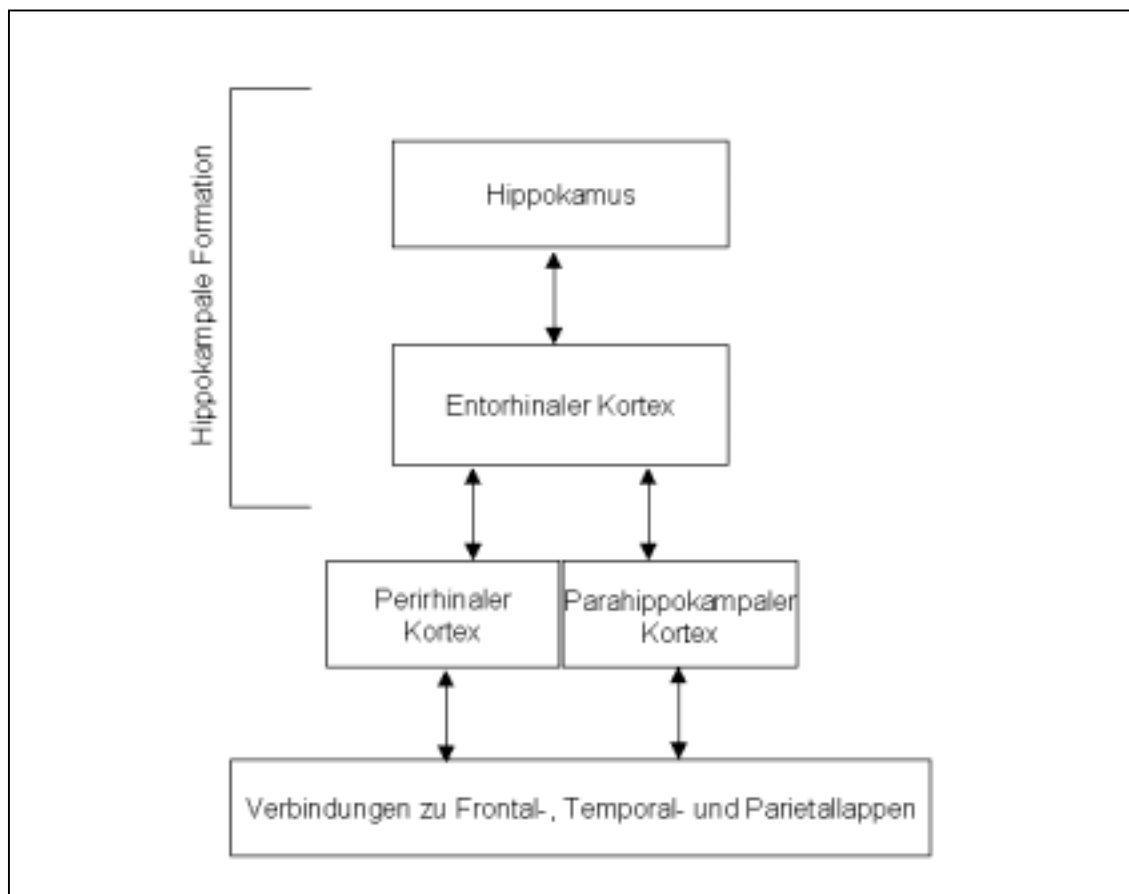


Abbildung 37: Schematische Ansicht des Gedächtnissystems des medialen Temporallappens (geändert nach Milner et al., 1998)

Der größte Teil der Informationen, die über den entorhinalen Kortex zum Hippokampus weitergeleitet werden, entsteht in den benachbarten Hirnregionen, dem perirhinalen Kortex und parahippokampalen Kortex. In diese Hirnareale wiederum verlaufen wechselseitige Projektionen aus anderen Bereichen des Gehirns wie z.B. des frontalen und des temporalen Lappens (Milner et al., 1998). Auf diese Weise können Wahrnehmungen verarbeitet und Gedächtnisinhalte gespeichert werden (Squire & Kandel, 1999). Bekanntlich sind die meisten deklarativen Gedächtnisfunktionen hippokampusabhängig. Allerdings konnte tierexperimentell mit elektrophysiologischen (Murray & Richmond, 2001) und immunhistochemischen (Brown & Aggleton, 2001; Bussey et al., 2002; Squire & Zola, 1998; Mumby et al., 2002; Tanaka, 1993) Methoden gezeigt werden, dass bei Diskriminierungsaufgaben weniger der Hippokampus, sondern mehr der perirhinale Kortex von Bedeutung ist. Quantitative Analysen des Proteins c-Fos führten zu der Annahme, dass die Gedächtnisleistung bei der Objekterkennung

unmittelbar mit einer Aktivität im perirhinalen Kortex und nicht zwingend im Hippokampus verbunden war.

Die Resultate der c-Fos Untersuchung von RO-Mäusen und wt-Tieren wiesen darauf hin, dass die neuronale Aktivität im perirhinalen Kortex bei RO-Mäusen geringer war als bei wt-Tieren (Abbildung 34). Aus früheren Experimenten ist ersichtlich, dass die c-Fos Expression im perirhinalen Kortex in Verbindung mit Diskriminierungsaufgaben eine sensible und valide Methode darstellt (Xiang & Brown, 1998; Miller et al., 1993). Zudem konnte eine Studie von Tanaka (1993) durch elektrophysiologische Ableitungen zeigen, dass die neuronale Aktivität bei der Objekterkennung unabhängig von der Relevanz oder der Komplexität eines Objektes gleichbleibend vorhanden war.

Folglich konnte man ausschließen, dass die unterschiedliche neuronale Aktivität im perirhinalen Kortex der beiden Mauslinien auf eine objektspezifische Besonderheit zurückzuführen wäre. Allerdings muß beachtet werden, dass die c-Fos Expression einen unspezifischen Indikator darstellt, der keine weiteren Schlüsse auf bestimmte molekulare Unterschiede der Tiere zulässt. Insgesamt zeigen die vorliegenden Daten einen Unterschied der neuronalen Aktivität zwischen wt-Mäusen und RO-Tieren in dem Gedächtnissystem des perirhinalen Kortex. In Verbindung mit den entsprechenden Verhaltensdaten ist anzunehmen, dass aus der reduzierten neuronalen Aktivität im perirhinalen Kortex eine beeinträchtigte Gedächtnisleistung bei RO-Mäusen resultierte.

4.6 Die sensorische Wahrnehmung im *Barrel* Kortex

Bei Mäusen spielen die Schnurrhaare eine große Rolle für die sensorische Wahrnehmung, den Gleichgewichtssinn und die Orientierung (Ahl, 1986). Im Gehirn werden die Schnurrhaare topographisch im *Barrel* Kortex repräsentiert, dieser befindet sich in der IV Schicht des somatosensorischen Kortex. Die sensorische Information eines einzelnen Haares wird an einen *barrel* weitergeleitet, der je nach Lokalisation des Schnurrhaares festgelegt ist (Kossut, 1992). Eine Vielzahl von Studien ergab, dass die c-Fos Expression in dieser Hirnregion sensibel auf sensorische Reize reagierte (Filipkowski et al., 2000 a; Melzer & Steiner, 1997; Staiger et al., 2002). Ein Experiment von Filipkowski (2000b) ergab, dass die c-Fos Expression im *Barrel* Kortex von der Beschaffenheit eines Stimulus beeinflusst werden kann. Objekte mit Löchern resultierten in einer

höheren c-Fos Expression als kompakte Gegenstände. Folglich schien die Messung von c-Fos im *Barrel* Kortex eine adäquate Methode darzustellen, um auch geringe Unterschiede in der Exploration von Objekten detektieren zu können. Bei der quantitativen c-Fos Analyse von RO-Mäusen und wt-Tieren zeigte sich eine erhöhte neuronale Aktivität im *Barrel* Kortex bei RO-Mäusen verglichen mit wt-Mäusen (Abbildung 33). Dies führte zu der Annahme, dass RO-Tiere bei der Objektexploration mehr sensorische Informationen an den *Barrel* Kortex weiterleiteten als wt-Mäuse. Da beide Gruppen identische Objekte erhielten konnte dieser Unterschied nicht durch die Eigenschaft dieser Gegenstände hervorgerufen werden. Zusätzlich verbrachten RO-Mäuse mehr Zeit mit der Exploration der beiden identischen Objekte (e1). Folglich schien sowohl die Explorationsdauer als auch die Intensität, mit der RO-Mäuse die Objekte untersuchten, größer zu sein als bei wt-Tieren. Allerdings beschränkte sich diese Verhaltensweise auf die beiden identischen Objekte oder auf den bekannten Stimulus. Im Zusammenhang mit den immunhistochemischen Ergebnissen aus dem perirhinalen Kortex zeigten diese Resultate, dass RO-Mäuse einerseits zu einer verstärkten Exploration der Objekte neigten, jedoch andererseits durch eine reduzierte neuronale Aktivität im perirhinalen Kortex eine Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung daraus hervorging.

4.7 Die Kopplungsanalyse

Neben Assoziationsanalysen stellen Kopplungsanalysen die gängigste Methode zur Lokalisation von Kandidatengen dar. Bei diesem Verfahren wird nach einem Genlocus gesucht, der mit einem bestimmten Phänotyp kosegregiert (Borecki & Suarez, 2001). Bei den RO-Mäusen wurden 93 Mikrosatellitenmarker, welche über das gesamte Genom der Tiere verteilt lagen, untersucht und statistisch ausgewertet. Soweit konnten die Ergebnisse dieser Untersuchungen keine entsprechende genetische Region lokalisieren. Um einen auffälligen Genlocus zu entdecken, muss er gekoppelt mit einem der Mikrosatellitenmarker vererbt werden. Dies ist wahrscheinlicher je näher der gesuchte Locus an einem dieser Marker lokalisiert ist. Liegt dieser Genort in einem großen Abstand zu den eingesetzten Mikrosatellitenmarkern, kann es bei der Meiose zu einer Rekombination und somit zur Segregation der beiden kommen (Knippers, 2001).

Um dies zu verhindern sollten die Marker in nicht zu großen Abständen gewählt werden. Bei einem Abstand von mehr als 20 cM ist es wahrscheinlich, dass es zu einer Rekombination zwischen den Markern kommen kann. Eine Überprüfung der benutzten Mikrosatelliten führte zur Annahme, dass einige Stellen auf dem Genom mit Hilfe von weiteren Mikrosatellitenmarkern untersucht werden sollten (Tabelle s. Anhang).

4.8 Schlussbetrachtung

Gedächtnissysteme bauen auf komplexen Prozessen auf, die oft durch eine Fülle von Genen beeinflusst werden können. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Kandidatengenen für kognitive Prozesse beim Menschen wie auch bei der Maus beschrieben. Beim Menschen wurden die Gene mittels Kopplungs- bzw. Assoziationsanalysen ermittelt, während bei den Studien mit Mäusen ausschließlich gezielte genetische Manipulationen vorgenommen wurden (zur Übersicht Morley & Montgomery, 2001). Folglich ist es möglich, eine Beeinflussung eines Gedächtnissystems basierend auf einer monogenetischen Veränderung zu beobachten.

Auf Grund des stabilen Verhaltensphänotyps könnte trotz der modifizierten Grenzwerte die Möglichkeit einer genetischen Mutation bei der RO Linie nicht ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels der ENU-Methode eine Linie gezüchtet werden, die ein valides und klinisch relevantes Tiermodell darstellte. Sowohl in ihrem Verhaltensphänotyp als auch bezüglich der Behandlungsmöglichkeit können RO-Mäuse modellhaft Erkrankungen wie Amnesie oder Demenz darstellen. Aufgrund des sehr spezifischen Phänotyps von RO-Mäusen könnten diese Tiere zur Untersuchung von Zusammenhängen kognitiver Prozessen eingesetzt werden.

5 Zusammenfassung

In der Biomedizin haben Tiermodelle eine unentbehrliche Bedeutung erreicht. In den letzten Jahren wurde eine Methode zur Generierung von Tiermodellen eingeführt, welche auf willkürlichen genetischen Manipulationen mittels der mutagenen Substanz ENU basiert. Hierbei wurden relevante Mausvarianten ausschließlich aufgrund ihres Phänotyps selektiert und zur Gründung einer neuen Mauslinie verpaart.

Da es sich hierbei um einen hypothesenfreien Ansatz handelt, wurde für die Verhaltensphänotypisierung ein komplexer Versuchsaufbau gewählt, welcher es erlaubte, eine Vielzahl von Verhaltensdimensionen in einem Test zu untersuchen. Aufgrund der schnellen und zuverlässigen Untersuchungsmöglichkeiten schien das mHB besonders gut geeignet als Hochdurchsatzverfahren im Rahmen des ENU-Projektes.

Mit dieser Methode wurde eine dominante Mausvariante identifiziert, welche sich durch eine beeinträchtigte Objekterkennung von wt Tieren unterschied. Basierend auf diesem F1-Tier wurde die RO-Linie gegründet.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde die RO-Linie über sieben Generationen gezüchtet und im mHB verhaltenscharakterisiert, um vor allem die Penetranz und Stabilität des Phänotyps über mehrere Generationen zu untersuchen. Dabei wurde gezeigt, dass RO-Mäuse einen sehr selektiven Verhaltensphänotyp darstellten, der sich ausschließlich in der Objekterkennung von wt-Tieren differenzieren ließ. Die Penetranz des Phänotyps lag mit 46% in einem idealen Bereich für einen dominanten Vererbungsgang. Zur weiteren Analyse des Verhaltensphänotyps von RO-Mäusen wurden diese in zwei selektiven Verhaltenstests, dem Objekterkennungstest und einem räumlichen Lerntest, untersucht. Während sich der Verhaltensphänotyp in dem selektiven Objekterkennungstest bestätigte, wurde in dem komplexen räumlichen Lerntest kein Unterschied zwischen RO--und wt-Mäusen beobachtet. Folglich konnte gezeigt werden, dass sich die beiden Linien in hippokampusabhängigen Aufgabestellungen nicht voneinander unterschieden.

Durch immunhistologische als auch elektrophysiologische Untersuchungen sind Hirnareale im kortikalen Temporallappen definiert, welche zur Wahrnehmung und zur Verarbeitung der Informationen während eines Objekterkennungstests aktiviert

werden. Auf dieser Kenntnis basierend wurde die c-Fos Expression nach einem Objekterkennungstest von RO-Tieren und wt-Mäusen untersucht. Die Resultate zeigten, dass bei RO-Tieren eine erhöhte sensorische Aktivität ausgelöst wurde, jedoch war in der Hirnregion zur Verarbeitung und Speicherung dieser Informationen weniger neuronale Aktivität zu erkennen. Folglich könnte die beeinträchtigte Fähigkeit zur Objekterkennung auf einen Unterschied der Tiere bei der Verarbeitung von Gedächtnisinhalten zurückzuführen sein.

Zur Untersuchung der klinischen Relevanz der RO-Mäuse als Tiermodell wurde eine pharmakologische Validierung mit dem Acetylcholinesterasehemmer Metrifonate in einem selektiven Objekterkennungstest durchgeführt. Dabei wurde durch die Behandlung mit Metrifonate eine signifikante Verbesserung der Objektdiskriminierung bei RO-Tieren erreicht. Somit ist die RO-Linie als valides klinisches Tiermodell einzustufen.

Als erster Versuch zur Ermittlung des manipulierten Gens sollte mittels einer Kopplungsanalyse die chromosomale Region der Mutation im Genom ausfindig gemacht werden. Dafür wurden Mikrosatellitenmarker über das komplette Genom verteilt und nach einer gekoppelten Vererbung mit dem Phänotyp in Form eines rekombinanten Locus abgesucht. Soweit wurde noch keine signifikante Kopplung zwischen dem Phänotyp und einem der genetischen Marker gefunden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Abstände zwischen den Mikrosatelliten zu groß gewählt waren. Eine zweite Erklärung wäre, dass der Verhaltensphänotyp nicht auf einer genetischen Grundlage basierte.

6 Anhang

Tabelle 12: Grenzwerte der wt-Weibchen für die basale Testung und die Konfirmation im mHB. Im Vergleich dazu Mittelwert \pm SEM der RO-Weibchen mit bestätigtem Verhaltensphänotyp.

Parameter	Grenzwert wt ♀ basal		Grenzwert wt ♀ konfirm.		Mittelwert \pm SEM RO wt ♀	
	unten	oben	unten	oben	basal	konfirm.
Rearing box	9,7	49,7	12,3	53,3	27,3 \pm 3,9	29,1 \pm 4,6
Latenz rearing box	5,0	64,5	7,9	49,0	39,9 \pm 5,8	41,5 \pm 8,0
Rearing board	-0,6	2,1	-0,6	1,8	0,5 \pm 0,2	0,9 \pm 0,3
Eintritt <i>board</i>	1,4	16,4	1,8	15,2	5,5 \pm 0,8	6,2 \pm 0,7
% board	3,1	17,2	2,9	14,4	14,6 \pm 3,7	9,3 \pm 1,4
Latenz <i>board</i>	-14,6	188,2	7,4	135,7	109,6 \pm 19,9	89,2 \pm 18,1
Explorierte Löcher	-0,9	42,1	5,3	33,2	16,0 \pm 2,2	15,5 \pm 2,3
Latenz Löcher	-29,4	168,3	8,2	92,7	74,6 \pm 20,8	54,9 \pm 10,9
Latenz unbekanntes/bekanntes Objekt	3,2	7,3	-2,3	8,9	7,5 \pm 5,8	5,2 \pm 1,6
Frequenz unbekanntes/bekanntes Objekt	0,05	2,3	0,2	2,1	0,9 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1
% Zeit unbekanntes/bekanntes Objekt	1,1	2,9	1,1	2,49	0,7 \pm 0,1	0,7 \pm 0,2
Linienübertritte	47,1	178,5	58,4	174,9	95 \pm 9,8	94,0 \pm 7,2
% Gruppe	-2,3	14,9	-1,4	14,4	20,8 \pm 5,9	18,9 \pm 5,5
Latenz Gruppe	-20,1	184,7	9,5	106,5	86 \pm 21,9	46,4 \pm 5,5
Latenz grooming	146,7	318,1	97,4	296,2	221,9 \pm 17,5	159,1 \pm 20,0
Defäkation	-0,3	1,0	-0,4	0,7	0,4 \pm 0,1	1,2 \pm 0,3
Stretched attends	0	0	0	0	0 \pm 0	0 \pm 0

Tabelle 13: Basale Grenzwerte der N2-wt-Tiere für die Verhaltensphänotypisierung im mHB, im Vergleich dazu Mittelwerte \pm SEM der phänotypisierten und bestätigten RO-Tiere.

Parameter	Grenzwert		Grenzwert		Mittelwert \pm SEM	
	N2 wt ♀		N2 wt ♂		RO N2	
	unten	oben	unten	oben	♀	♂
Rearing box	40,2	65,4	29,7	53,6	52,6 \pm 2,5	49,5 \pm 2,6
Latenz rearing box	1,5	20,8	-0,3	30,9	12,1 \pm 1,2	13,8 \pm 1,3
Rearing board	-1,5	6,9	-0,3	1,4	5,5 \pm 0,9	2,8 \pm 0,6
Eintritt <i>board</i>	6,7	21,3	10,4	22,1	17,5 \pm 0,8	16,3 \pm 1,1
% board	6,7	18,4	7,4	19,1	17,1 \pm 0,9	14,8 \pm 0,9
Latenz <i>board</i>	8,8	64,8	-7,3	55,9	29,4 \pm 3,0	31,3 \pm 3,7
Explorierte Löcher	15,5	61,2	20,3	47,6	53,2 \pm 4,2	48,6 \pm 5,5
Latenz Löcher	-1,1	71,8	-0,7	30,5	29,4 \pm 3,0	27,8 \pm 3,5
Latenz unbekanntes/bekanntes Objekt	-1,0	2,7	-1,7	5,8	1,2 \pm 0,3	2,2 \pm 0,4
Frequenz unbekanntes/bekanntes Objekt	0,1	3,2	0,2	2,2	1,2 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1
% Zeit unbekanntes/bekanntes Objekt	0,3	5,12	0,9	2,7	0,2 \pm 0,04	0,5 \pm 0,05
Linienübertritte	98,4	168,6	80,1	161,9	121,5 \pm 4,1	126,3 \pm 6,6
% Gruppe	2,4	8,4	2,3	13,1	4,8 \pm 0,8	5,7 \pm 0,6
Latenz Gruppe	-0,2	96,6	10,3	94,1	48,1 \pm 8,3	37,9 \pm 3,8
Latenz grooming	136,6	348,6	78,1	353,6	203,1 \pm 17,2	202,9 \pm 17,4
Defäkation	-0,3	0,5	-0,6	1,4	0,4 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2
Stretched attends	0	0	0	0	0 \pm 0	0 \pm 0

Tabelle 14: Grenzwerte der N2-wt-Tiere für die Konfirmation der Verhaltensphänotypisierung im mHB, im Vergleich dazu Mittelwerte \pm SEM der phänotypisierten und bestätigten RO-Tiere.

Parameter	Grenzwert		Grenzwert		Mittelwert \pm SEM	
	N2 wt ♀		N2 wt ♂		RO N2	
	unten	oben	unten	oben	♀	♂
Rearing box	27,9	71,5	23,8	48,3	40,8 \pm 2,8	42,9 \pm 2,5
Latenz rearing box	1,1	22,8	5,1	22,9	11,9 \pm 1,1	15,7 \pm 1,8
Rearing board	-1,6	10,6	-0,3	8,5	11,8 \pm 7,6	2,8 \pm 0,5
Eintritt board	4,4	25,7	8,5	27,5	16,3 \pm 0,7	18,5 \pm 1,0
% board	6,7	27,6	11,6	31,5	20,3 \pm 1,7	19,4 \pm 1,4
Latenz board	-2,5	58,6	-0,4	24,2	20,0 \pm 2,7	12,1 \pm 1,5
Explorierte Löcher	17,6	66,6	19,6	61,0	39,8 \pm 2,6	46,6 \pm 3,5
Latenz Löcher	4,4	27,2	-3,9	37,5	22,4 \pm 2,9	16,3 \pm 2,4
Latenz unbekanntes/bekanntes Objekt	-3,6	12,1	-1,1	5,6	3,3 \pm 1,1	3,9 \pm 1,1
Frequenz unbekanntes/bekanntes Objekt	0,3	1,3	0,2	1,9	0,6 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1
% Zeit unbekanntes/bekanntes Objekt	0,7	2,4	0,6	3,9	0,4 \pm 0,06	0,5 \pm 0,05
Linienübertritte	87,1	153,4	66,9	131,6	103,4 \pm 6,0	108,9 \pm 4,0
% Gruppe	-2,0	17,0	-2,3	15,7	6,9 \pm 0,9	5,9 \pm 0,6
Latenz Gruppe	-38,5	117,9	-2,9	58,9	49,2 \pm 9,1	42,2 \pm 6,5
Latenz grooming	56,3	306,6	55,6	278,2	145,8 \pm 14,5	158,7 \pm 14,2
Defäkation	-0,3	1,1	-0,4	2,6	0,5 \pm 0,2	1,2 \pm 0,3
Stretched attends	0	0	0	0	0 \pm 0	0 \pm 0

Tabelle 15: Position der Mikrosatellitenmarker, welche für die Kopplungsanalyse bei RO-Tieren eingesetzt wurden. Dunkel hinterlegte Felder signalisieren Marker, welche neu hinzugefügt wurden, um Lücken größer als 20 cM zu vermeiden.

Marker	Position in cM nach MGI*	Abstand zum nächsten Marker in cM
D1Mit211	15	
D1Mit303	34,8	19,8
D1Mit216	49,7	14,9
D1Mit338	62	12,3
D1Mit424	81,6	19,6
D1Mit356	95,8	14,2
D1Mit155	112	16,2
Telomer	127	15
D2Mit365	17	
D2Mit380	40,4	23,4
D2Mit525	61,2	20,8
D2Mit411	77,6	16,4
D2Mit51	95,5	17,9
D2Mit265	105	9,5
Telomer	114	9
D3Mit130	3,9	
D3Mit169	20,6	16,7
D3Mit76	45,2	24,6
D3Mit84	71,8	26,6
D3Mit19	87,6	15,8
Telomer	95	7,4
D4Mit39	10,6	
D4Mit87	31,4	20,8
D4Mit31	51,3	19,9
D4Mit180	81	29,7
Telomer	84	3
D5Mit388	18	
D5Mit255	34	16
D5Mit20	52	18

Marker	Position in cM nach MGI*	Abstand zum nächsten Marker in cM
D5Mit138	69	17
D5Mit99	80	11
Telomer	92	12
<hr/>		
D6Mit348	2,6	
D6Mit183	26,5	23,9
D6Mit105	45,5	19
D6Mit289	62,3	16,8
Telomer	75	12,7
<hr/>		
D7Mit227	16	
D7Mit145	26,4	10,4
D7Mit238	53	26,6
D7Mit259	72	19
Telomer	74	2
<hr/>		
D8Mit339	23	
D8Mit31	33	10
D8Mit112	53	20
D8Mit42	71	18
Telomer	82	11
<hr/>		
D9Mit297	15	
D9Mit289	38	23
D9Mit12	55	17
D9Mit311	65	10
D9Mit18	71	6
Telomer	79	8
<hr/>		
D10Mit123	4	
D10Mit3	21	17
D10Mit42	44	23
D10Mit134	59	15
D10Mit271	70	11
Telomer	77	7
<hr/>		
D11Mit82	14	

Marker	Position in cM nach MGI*	Abstand zum nächsten Marker in cM
D11Mit271	21	7
D11Mit86	28	7
D11Mit242	31	3
D11Mit322	44	13
D11Mit36	47,64	3,64
D11Mit99	59,5	11,86
D11Mit214	70	10,5
Telomer	80	10
<hr/>		
D12Mit221	16	
D12Mit34	29	13
D12Mit259	45	16
D12Mit263	58	13
Telomer	66	8
<hr/>		
D13Mit14	10	
D13Mit198	16	6
D13Mit88	21	5
D13Mit164	24	3
D13Mit63	26	2
D13Mit64	30	4
D13Mit139	32	2
D13Mit21	35	3
D13Mit67	37	2
D13Mit97	40	3
D13Mit24	43	3
D13Mit202	47	4
D13Mit144	48	1
D13Mit30	52	4
D13Mit287	57	5
D13Mit262	68	11
Telomer	80	12
<hr/>		
D14Mit174	10,5	
D14Mit155	25	14,5

Marker	Position in cM nach MGI*	Abstand zum nächsten Marker in cM
D14Mit125	44,3	19,3
D14Mit97	58	13,7
Telomer	69	11
D15Mit85	16,4	
D15Mit270	28,4	12
D15Mit171	54,5	26,1
D15Mit161	69,2	14,7
Telomer	81	11,8
D16Mit130	4	
D16Mit88	9,7	5,7
D16Mit146	16,9	7,2
D16Mit101	17	0,1
D16Mit75	26,7	9,7
D16Mit5	38	11,3
D16Mit189	55,2	17,2
Telomer	72	16,8
D17Mit133	10,4	
D17Mit180	29,4	19
D17Mit206	44,3	14,9
D17Mit123	56,7	12,4
Telomer	73	16,3
D18Mit60	16	
D18Mit183	37	21
D18Mit187	47	10
Telomer	60	13
D19Mit111	15	
D19Mit19	26	11
D19Mit11	41	15
D19Jpk1	55	14
Telomer	57	2

* Mouse Genome Informatics (www.informatics.jax.org).

7 Literatur

Adriani W, Sargolini F, Coccarello R, Oliverio A, Mele A 2000 Role of dopaminergic system in reactivity to spatial and non-spatial changes in mice
Psychopharmacology 150:67-76

Ahl AS 1986 The role of vibrissae in behavior: a status review
Veterinary Research Communications 10:245-268

Alvarez P, Zola-Morgan S, Squire LR. 1994 The animal model of human amnesia: Long-term memory impaired and short-term memory intact
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91:5637-5641

Ammassari-Teule M, Fagioli S, Rossi-Arnaud C 1994 Radial maze performance and open-field behaviours in aged C57BL/6 mice: further evidence for preserved cognitive abilities during senescence
Physiology & Behavior 55:341-345

Ammassari-Teule M, Hoffmann H-J, Rossi-Arnaud C. 2003 Learning in inbred mice: strain-specific abilities across three radial maze problems
Behavior Genetics 23: 405-412

Andreatini R, Bacellar LFS 2000 Animal models: Trait or state measure? The test-retest reliability of the elevated plus-maze and behavioral despair
Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 24:549-560

Artal P, de Tejada PH, Tedo CM, Green DG 1998 Retinal image quality in the rodent eye
Visual Neuroscience 15:597-605

Balling R 2001 ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice
Annual Review of Genomics and Human Genetics 2:463-492

Bartolini L, Casamenti F, Pepeu G 1996 Aniracetam Restores Object Recognition Impaired by Age, Scopolamine, and Nucleus Basalis Lesions
Pharmacology Biochemistry and Behavior 53:277-283

Bartus RT, Flicker C, Dean RL, Pontecorvo M, Figueiredo JC, Fisher SK 1985 Selective memory loss following nucleus basalis lesions: long term behavioral recovery despite persistent cholinergic deficiencies
Pharmacology Biochemistry and Behavior 23:125-135

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
Behavioral Pharmacology 12:151-162

Berlyne DE 1950 Novelty and curiosity as determinants of exploratory behaviour
British Journal of Psychology 41:68-80

Blokland A 1995 Acetylcholine: a neurotransmitter for learning and memory?
Brain Research Reviews 21:285-300

Borecki IB, Suarez BK 2001 Linkage and association: basic concepts
In: Rao DC, Province MA (eds). Genetic dissection of complex traits. Academic Press, St.Louis:45-66

Bowen DM, Davison AN 1983 The failing brain
Journal of Chronic Diseases 36:3-13

Brecht M, Preilowski B, Merzenich MM 1997 Functional architecture of the mystacial vibrissae
Behavioural Brain Research 84:81-97

Brown MW, Aggleton JP 2001 Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus?
Nature Reviews Neuroscience 2:51-61

Brown SDM 1998 Mouse models of genetic disease: New approaches, new paradigms
Journal of Inherited Metabolic Disease 21:532-539

Buckley MJ, Gaffan D 1998 Perirhinal cortex ablation impairs visual object identification
Journal of Neuroscience 18:2268-2275

Bussey TJ, Saksida LM, Murray EA 2002 Perirhinal cortex resolves feature ambiguity in complex visual discriminations
European Journal of Neuroscience 15:365-374

Bussey TJ, Saksida LM 2002 The organization of visual object representations: a connectionist model of effects of lesions in perirhinal cortex
European Journal of Neuroscience 15:355-364

Bussey TJ, Saksida LM, Murray EA 2003 Impairments in visual discrimination after perirhinal cortex lesions: testing "declarative" vs. "perceptual-mnemonic" views of perirhinal cortex function
European Journal of Neuroscience 17:649-660

Carvell GE, Simons DJ 1990 Biometric Analyses of Vibrissal Tactile Discrimination in the Rat
Journal of Neuroscience 10:2638-2648

Champtiaux N, Changeux JP 2002 Knock-out and knock-in mice to investigate the role of nicotinic receptors in the central nervous system
Current Drug Target CNS Neurological Disorders 1:319-330

Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS 2001 A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field
Neuroscience & Biobehavioral Reviews 25:235-260

Coghill EL, Hufill A, Parkinson N, Davison C, Glenister P, Clements S, Hunter J, Cox R, Brown SDM 2002 A gene-driven approach to the identification of ENU mutans in the mouse
Nature Genetics 30:255-256

Contarino A, Dellu F, Koob GF, Smith GW, Lee KF, Vale W, Gold LH 1999 Reduced anxiety-like and cognitive performance in mice lacking the corticotropin-releasing factor receptor 1
Brain Research 835:1-9

Crawley JN 2000 What's wrong with my mouse
Jon Wiley & Sons

Cummings JL, Nadel A, Masterman D, Cyrus PA. Efficacy of metrifonate in improving the psychiatric and behavioral disturbances of patients with Alzheimer's disease
Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology 14, 101-108. 2000

Dodart JC, Mathis C, Ungerer A 1997 Scopolamine-induced deficits in a two trial object recognition task in mice
Neuroreport 8:1173-1178

Duva CA, Kornecook TJ, Pinel JPJ 1999 Animal models of medial temporal lobe amnesia: the myth of hippocampus
In: Haug M, Whalen RE (eds). Animal models of human emotion and cognition 197-214

Ennaceur A, Delacour J 1988 A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats.1: Behavioral studies
Behavioural Brain Research 31:47-59

Espejo EF 1997 Effects of weekly or daily exposure to the elevated plus-maze in male mice
Behavioural Brain Research 87:233-238

Feldman J 2003 What is a visual object
Trends in cognitive sciences 7:252-256

Field A 2003 Discovering statistics using SpSS for Windows
Sage Publications Ltd,

File SE, Wardill AG 1975 Validity of head dipping as a measure of exploration in a modified hole-board
Psychopharmacologia 44:53-59

- Filipkowski RK, Rydz M, Berdel B, Morys J, Kaczmarek L** 2000a Tactile experience induces c-fos expression in rat barrel cortex
Learning and Memory 7:116-122
- Filipkowski RK** 2000b Inducing gene expression in barrel cortex-focus on immediate early genes
Acta Neurobiologiae Experimentalis 60:411-418
- Flint J, Corley R, DeFries JC, Fulker DW, Gray JA, Miller S, Collins A.C.** 1995
A simple genetic basis for a complex psychological trait in laboratory mice
Science 269:1435
- Gardier AM, Bourin M** 2000 Appropriate use of "knockout" mice as models of depression or models of testing the efficacy of antidepressants
Psychopharmacology 153:393-394
- Giacobini E** 1998 Invited Review Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease therapy: from tacrine to future applications
Neurochemistry International 32:413-419
- Gifford DR, Lapane KL, Gambassi G, Landi F, Mor V, Bernabei R** 1999
Tacrine use in nursing homes: implications for prescribing new cholinesterase inhibitors. SAGE Study Group. Systematic Assessment of Geriatric Drug Use via Epidemiology
Neurology 52:238-244
- Goldman-Rakic PS** 1996 Memory: Recording experience in cells and circuits: Diversity in memory research
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93:13435-13437
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM** 1999
Introduction to Genetic Analysis
New York: W. H. Freeman & Co,
- Guic-Robles E, Valdivieso C, Guajardo G** 1989 Rats can learn a roughness discrimination using only their vibrissal system
Behavioral Brain Research 31:285-289
- Harbach PR, Filipunas AL, Wang Y, Aaron CS** 1992 DNA sequence analysis of spontaneous and N-ethyl-N-nitrosourea-induced hprt mutations arising in vivo in cynomolgus monkey T-lymphocytes
Environmental and Molecular Mutagenesis 20:96-105
- Hode Y, Ratomponirina C, Gobaille S, Maitre M, Kopp C, Misslin R** 1999 Hypo expression of benzodiazepine receptors in the amygdala of neophobic BALB/c mice compared to C57BL/6 Mice
Pharmacology Biochemistry and Behavior 65:35-38
- Holmstedt B, Nordgren I, Sandoz M, Sundwall A** 1978 Metrifonate
Archives of Toxicology 41:3-29

Hrabe de Angelis M, Flaswinkel H, Fuchs H, Rathkolb B, Soewarto D, Marschall S, Heffner S, Pargent W, Wuensch K, Jung M, Reis A, Richter T, Alessandrini F, Jakob T, Fuchs E, Kolb H., Kremmer E, Schaeble K, Rollinski B, Roscher A, Peters C, Meitinger T, Strom T, Steckler T, Holsboer F, Klopstock T, Gekeler F, Schindewolf C, Jung T., Avraham K, Behrendt H, Ring J, Zimmer A, Schughart K, Pfeffer K, Wolf E, Balling R 2000 Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis
Nature Genetics 25:444-447

Hunter AJ, Nolan P.M., Brown SDM 2000 Towards new models of disease and physiology in the neurosciences: The role of induced and naturally occurring mutations
Human Molecular Genetics 9:893-900

Ikonen S, Schmidt BH, Riekkinen J 1999 Characterization of learning and memory behaviors and the effects of metrifonate in the C57BL strain of mice
European Journal of Pharmacology 372:117-126

Jann MW 1998 Preclinical pharmacology of metrifonate
Pharmacotherapy (Supplement) 18:55-67

Jones MW 2002 A comparative review of rodent prefrontal cortex and working memory
Current Molecular Medicine 2:639-647

Kelley AE* 1993 Locomotor activity and exploration
Methods in Behavioral Pharmacology 10:499-517

Knippers R 2001 Molekulare Genetik
Thieme Verlag

Kopp C, Vogel E, Misslin R 1999 Comparative study of emotional behavior in three inbred strains of mice
Behavioural Processes 47:161-174

Kossut M 1992 Plasticity of the barrel cortex neurons
Progress in Neurobiology 39:389-422

Lamb HM, Faulds D 1997 Metrifonate
Drugs & Aging 11:490-496

Lipp H-P, van der Loos H 1991 A computer-controlled Y-maze for the analysis of vibrissotactile discrimination learning in mice
Behavioral Brain Research 45:135-145

Lister RG 1990 Ethologically-based animal models of anxiety disorders
Pharmacology Therapy 46:321-340

Liu L, Ikonen S, Heikkinen T, Tapiola T, van Groen T, Tanila H 2002 The effects of long-term treatment with metrifonate, a cholinesterase inhibitor, on

cholinergic activity, amyloid pathology, and cognitive function in APP and PS1 doubly transgenic mice
Experimental Neurology 173:196-204

Maekawa A, Ogiu T, Matsuoka C, Onodera H, Furuta K, Kurokawa Y, Takahashi M, Kokubo T, Tanigawa H, Hayashi Y, . 1984 Carcinogenicity of low doses of N-ethyl-N-nitrosourea in F344 rats; a dose-response study
Gann 75:117-125

McKinney WT, Jr., Bunney WE, Jr. 1969 Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research
Archives of General Psychiatry 21:240-248

Melzer P, Steiner H 1997 Stimulus-dependent expression of immediate-early genes in rat somatosensory cortex
Journal of Comparative Neurology 380:145-153

Mendel G 1865 Versuche über Pflanzenhybriden
Verhandlungen des Naturforschenden Vereins in Brünn IV:3-47

Mihalick SM, Langlois JCaKJD 2000 Strain and sex differences on olfactory discrimination learning in C57BL/6J and DBA/2J inbred mice (mus musculus)
Journal of Comparative Psychology 114:365-370

Miller EK, Li L, Desimone R 1993 Activity of neurons in anterior inferior temporal cortex during a short-term memory task
Journal of Neuroscience 13:1460-1478

Milner B, Squire LR, Kandel ER 1998 Cognitive neuroscience and the study of memory
Neuron 20:445-468

Misslin R, Ropartz P 1981 Responses in mice to a novel object
Behaviour 78:169-177

Montero VM, Wright LS, Siegel F 2001 Increased glutamate, GABA and glutamine in lateral geniculate nucleus but not in medial geniculate nucleus caused by visual attention to novelty
Brain Research 916:152-158

Morley KI, Montgomery GW 2001 The genetics of cognitive processes: candidate genes in humans and animals
Behavior Genetics 31:511-531

Mumby DG, Glenn MJ, Nesbitt C, Kyriazis DA 2002 Dissociation in retrograde memory for object discriminations and object recognition in rats with perirhinal cortex damage
Behavioral Brain Research 132:215-226

Murray EA, Richmond BJ 2001 Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations
Current Opinion in Neurobiology 11:188-193

Nagy ZM, Misanin JR 1970 Visual perception in the retinal degenerate C3H mouse
Journal of Comparative and Physiological Psychology 72:306-310

Nolan P.M., Peters J, Strivens M, Rogers D, Hagan J, Spur N, Gray IC, Vizor L, Brooker D, Whitehill E, Washbourne R, Hough T, Greenaway S, Hewitt M, Lui X, McCormack S, Pickford K, Selley R, Wells C, Tymowska-Lalanne Z, Roby P, Glenister P, Thronton C, Thaung C, Stevenson J-A, Arkell R, Mburu P, Hardisty R, Kiernan A, Erven A, Steel KP, Voegelings S, Guenet J-L, Nickols C, Sadri R, Naase M, Isaacs A, Davies K, Browne M, Fisher EMC, Martin J, Rastan S, Brown SDM, Hunter J 2000 A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse
Nature Genetics 25:440-443

Nordgren I, Bergström M, Holmstedt B, Sandoz M 1978 Transformation and action of metrifonate
Archives of Toxicology 41:31-41

Noveroske JK, Weber JS, Justice MJ 1999 The mutagenic action of N-ethyl-N-nitro urea in the mouse
Mammalian Genome 11:478-483

Ohl F, Oitzl MS, Fuchs E 1997 Assessing cognitive functions in the tree shrews: visuo-spatial and spatial learning in the home cage
Journal of Neuroscience Methods 81:35-40

Ohl F, Fuchs E 1998 Memory performance in tree shrews: effect of stressful experiences
Neuroscience and Biobehavioral Reviews 23:319-323

Ohl F 1999 Auswirkungen von chronisch psychosozialem Stress auf kognitive Fähigkeiten von Tupaia (*Tupaia belangeri*)
Dissertation Universität Göttingen

Ohl F, Holsboer F, Landgraf R 2001a The modified hole board as a differential screen for behavior in rodents
Behavioral Research Methods Instrumental Computation 33:392-397

Ohl F, Sillaber I, Binder E, Keck ME 2001b Differential analysis of behavior and diazepam-induced alterations in C57BL/6N and BALB/c mice using the modified hole board test.
Journal of Psychiatric Research 35:147-154.

Paxinos GT, Franklin KB 2000 Mouse brain in stereotaxic coordinates
Morgan Kaufmann, San Francisco

Popova NK, Vishnivetskaya GB, Ivanova EA, Skrinskaya JA, Seif I 2000 Altered behavior and alcohol tolerance in transgenic mice lacking MAO A: a comparison with effects of MAO A inhibitor clorgyline
Pharmacology Biochemistry and Behavior 67:719-727

Popp RA, Bailiff RG, Skoff LC, Johnson FM, Lewis SE 1983 Analysis of a mouse alpha-globin gene mutation induced by ethylnitrosourea
Genetics 105:157-167

Powell SB, Paulus MP, Hartman DS, Godel T, Geyer MA 2003 RO-10-5824 is a selective dopamine D4 receptor agonist that increases novel object exploration in C57 mice
Neuropharmacology 44: 473-481

Reinikainen KJ, Koponen H, Jolkkonen J, Riekkinen J 1990 Decreased somatostatin-like immunoreactivity in the cerebrospinal fluid of chronic schizophrenic patients with cognitive impairment
Psychiatric Research 33:307-312

Riekkinen J, Schmidt B, Stefanski R, Kuitunen J, Riekkinen M 1996 Metrifonate improves spatial navigation and avoidance behavior in scopolamine-treated, medial septum-lesioned and aged rats
European Journal of Pharmacology 309:121-130

Robertson HA 1991 Immediate-early genes, neuronal plasticity, and memory
Biochemistry and Cell Biology 70:729-737

Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF 1999 Corticosterone response to the plus-maze: High correlation with risk assessment in rats and mice
Physiology & Behavior 68:47-53

Russell LB 1989 Reciprocal relationship between mouse germ-cell mutagenesis and basic genetics: from early beginnings to future opportunities
Environmental and Molecular Mutagenesis 14 Suppl 16:23-29

Ryabinin AE, Miller MN, Durrant S 2002 Effects of acute alcohol administration on object recognition learning in C57BL/6J mice
Pharmacology Biochemistry and Behavior 71:307-312

Sargolini F, Roulet P, Oliverio A, Mele A 2002 Effects of intra-accumbens focal administrations of glutamate antagonists on object recognition memory in mice
Behavioural Brain Research 00:1-11

Sarnyai Z, Sibille E, Pavlides C, Fenster RJ, McEwen BSaTM 2000 Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin1A receptors
Neurobiology 97:14731-14736

Scali C, Giovannini MG, Bartolini L, Prosperi C, Hinz V, Schmidt B, Pepeu G 1997 Effect of metrifonate on extracellular brain acetylcholine and object recognition in aged rats
European Journal of Pharmacology 325:173-180

Schindler U, Rush DK, Fieding S 1984 Nootropic drugs: Animal models for studying effects on cognition
Drug Development Research 4:567-576

Scoville WB, Milner B. 1957 Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions
Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry 20:11-21

Seguin L, Liscia P, Guezennec Y, Fillion G 1998 Effects of moderate and intensive training on functional activity of central 5-HT_{1B} receptors in the rat substantia nigra
Acta Physiologica Scandinavica 162:63-68

Sewards TV, Sewards MA 2002 Innate visual object recognition in vertebrates: some proposed pathways and mechanisms
Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular and Integrative Physiology 132:861-891

Sidman RL, Green MC 1965 Retinal degeneration in the mouse. Location of the rd locus in linkage group XVII
Journal of Heredity 56:23-29

Soewarto D, Fella C, Teubner A, Rathkolb B, Pargent W, Heffner S, Marschall S, Wolf E, Habre de Angelis M 1999 The large-scale Munich ENU-mouse-mutagenesis screen
Mammalian Genome 11:507-510

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
Neurobiology of Learning and Memory 75:214-229

Squire LR, Davis HP 1981 The pharmacology of memory: a neurobiological perspective
Annual Review of Pharmacology and Toxicology 21:323-356

Squire LR, Hamann S, Knowlton B 1994 Dissociable learning and memory systems of the brain
Behavioral and Brain Sciences 17:422-423

Squire LR, Kandel ER 1999 Gedächtnis Die Natur des Erinnerns
Spektrum Verlag

Squire LR, Zola SM 1996 Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
93:13515-13522

Squire LR, Zola SM 1998 Episodic memory, semantic memory, and amnesia
Hippocampus 8:205-211

Staiger JF, Masannek C, Bisler S, Schleicher A, Zuschratter W, Zilles K
2002 Excitatory and inhibitory neurons express c-Fos in barrel-related columns
after exploration of a novel environment
Neuroscience 109:687-699

Tanaka K 1993 Neuronal mechanisms of object recognition
Science 262:685-688

**Timpl P, Spanagel R, Sillaber I, Kresse A, Reul JM, Stalla GK, Blanquet V,
Steckler T, Holsboer F, Wurst W** 1998 Impaired stress response and reduced
anxiety in mice lacking a functional corticotropin-releasing hormone receptor 1
Nature Genetics 19:162-166

Vann SD, Brown MW, Aggleton JP 2000 Fos expression in the rostral thalamic
nuclei and associated cortical regions in response to different spatial memory
tests
Neuroscience 101:983-991

Whitehouse PJ, Struble RG, Clark AW, Price DL 2003 Alzheimer disease:
plaques, tangles, and the basal forebrain
Annual Neurology 12:494

Williams RW, Flaherty L, Threadgill DW 2003 The math of making mutant mice
Genes Brain Behavior 2:191-200

Xiang JZ, Brown MW 1998 Differential neuronal encoding of novelty, familiarity
and recency in regions of the anterior temporal lobe
Neuropharmacology 37:657-676

Zhang JH, McQuade JMS, Vorhees CV, Xu M 2002 Hippocampal expression of
c-fos is not essential for spatial learning
Synapse 46:91-99

Zhu XO, Brown MW, McCabe BJ, Aggleton JP 1995 Effects of the novelty or
familiarity of visual stimuli on the expression of the immediate early gene c-fos in
rat brain
Neuroscience 69:821-829

Zhu XO, McCabe BJ, Aggleton JP, Brown MW 1996 Mapping visual recognition
memory through expression of the immediate early gene c-fos
Neuroreport 7:1871-1875

Lebenslauf

- 06.11.1970 geboren in Wolkendorf/Rumänien
- 1977 – 1979 Johann-Peter-Hebel-Grundschule in Singen, Baden-Württemberg
- 1979 – 1981 Grundschule Anselfingen, Baden-Württemberg
- 1981 – 1990 Friedrich-Wöhler-Gymnasium in Singen, Baden-Württemberg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
- 1990 – 1991 Beschäftigung als Au-Pair in Santa Cruz, Kalifornien, USA
- 1991 – 1994 Sprachstudium verbunden mit der Aneignung von alternativen Heilmethoden in Santa Cruz, Kalifornien, USA
- 1994 – 1996 Heilpraktikerschule Harald Lotz in München
Abschluss: staatl. geprüfte Heilpraktikerin
- 1996 – 1998 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität in Bochum
- 07.1998 – 10.1998 Praktikum bei Olympus im Chromosome Research Center Hachioji, Japan
- 1998 – 2001 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilian Universität in München. Prüfungsfächer: Neurobiologie, Humangenetik, Medizinische Mikrobiologie und Psychologie
- 2000 – 2001 Diplomarbeit am Max-Planck Institut für Psychiatrie zum Thema: „Untersuchungen zur Verhaltensphänotypisierung bei Mäusen,“
Abschluss: Dipl. Biol.
- 2001 - 2003 Doktorarbeit am Max-Planck Institut für Psychiatrie
Thema: „Charakterisierung und Validierung von ENU-Mausvarianten“

Danksagung

Danken möchte ich an erster Stelle Prof. Dr. Gerd Schuller für die Bereitschaft, meine Dissertation als externe Arbeit zu betreuen.

Für die Verfügungsstellung des Themas am ENU Projekt möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Dr. Florian Holsboer bedanken. Dr. Frauke Ohl danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung und die mir gewährte Freiheit im Laufe der Projekte.

Dian Soewarto, Dr. Sybille Wagner, Dr. Helmut Fuchs und Dr. Martin Hrabé de Angelis bin ich dankbar für die gute Zusammenarbeit an der GSF. Außerdem möchte ich den technischen Angestellten und den Tierpflegern an der GSF herzlich für das freundliche Entgegenkommen und das gute unkomplizierte Arbeitsklima danken. Vor allem Sandra Hoffmann, Andreas Mayer und Andrea Bässler hatten immer ein offenes Ohr und gute Ratschläge in allen Situationen parat. Ernesto Rincon Loarca danke ich für seine Arbeit als Verhaltensscreener an der GSF und seine Bemühung, teilweise schwierige Arbeitsumstände zu bewältigen.

Dr. Meyer vom Max-Delbrück-Zentrum in Berlin danke ich für die Durchführung der Kopplungsanalyse. Dabei möchte ich auch Dr. Jan Deussing und Martin Kohli danken, die geduldig meine Fragen bezüglich der genetischen Analysen ertrugen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Michaela Hartl und den Tierpflegern im MPI für die Hilfe bei der Zucht und Versorgung der Tiere bedanken.

Dr. Susanne Droste und Simone Krömer möchte ich ganz besonders für Diskussionen, Motivationen, Aufmunterungen jeder Art und die nette ehrliche Art danken. Ein herzlicher Dank gilt auch Marjolein Beekman, die sich stets für Fragen jeder Art Zeit für mich genommen hat.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Corinna Storch (wie der Vogel) für den guten Umgangston und die vielen Momente des Lachens. In dem Zusammenhang möchte ich auch Ursula Habersetzer, Angelika Rödel, Daniela Harbich und Christoph Thöringer sehr herzlich danken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Carolin Knorr (wie die Suppe) für die „psychologische Betreuung“ und fachlich kompetenten Ratschläge sehr bedanken.

Ein weiteres Dankeschön möchte ich Helmut Goldbrunner für vielseitige und schnelle Hilfe bei jeglichen EDV Problemen aussprechen.

Mein herzlichster Dank gilt Dipl. Ing. Michael Meisinger für eine wertvolle und inspirierende Freundschaft.