

**Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors als Parameter für die  
retrospektive Belastungseinschätzung in Nagernmodellen**

von  
Katharina Schönhoff

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors als Parameter für die  
retrospektive Belastungseinschätzung in Nagernmodellen**

von  
Katharina Schönhoff  
aus Berlin

München 2021

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Departement  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Mitbetreuung durch Dr. Eva-Lotta von Räden, Ph.D.

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Potschka

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Roswitha Dorsch

Tag der Promotion: 17. Juli 2021

*Meiner Familie*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>II. LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
<b>1. Belastungseinschätzung in Tiermodellen</b>	<b>3</b>
1.1. Relevanz von Tiermodellen für die Forschung	3
1.2. Ethische Bewertung von Tiermodellen	5
1.3. Parameter der Belastungseinschätzung	8
<b>2. 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor</b>	<b>15</b>
2.1. Allgemeines	15
2.2. Lokalisation	18
2.3. Funktionelle Bedeutung	21
2.4. 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor als Zielstruktur pharmakologischer Therapieansätze	23
2.5. 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptorexpression bei Stress und Epilepsie	27
<b>3. Stereologische Quantifizierung</b>	<b>33</b>
3.1. Prinzip von Delesse	34
3.2. Volumenschätzung nach Cavalieri	36
3.3. Probennahmeverfahren	38
<b>III. ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG</b>	<b>41</b>
<b>IV. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>44</b>
<b>1. Versuchstiere</b>	<b>44</b>
1.1. <i>Restraint</i> -Stressmodell	45
1.2. Post-Status-Epilepticus-Modelle	45
<b>2. Gewebeaufbereitung</b>	<b>46</b>
<b>3. Immunhistochemische Färbungen</b>	<b>47</b>
<b>4. Kolokalisationsanalyse</b>	<b>54</b>
<b>5. Bildanalyse</b>	<b>55</b>
<b>6. Stereologische Volumenbestimmung</b>	<b>59</b>
<b>7. Rezeptorvolumen</b>	<b>60</b>

Inhaltsverzeichnis	VI
<b>8. Statistik</b>	<b>60</b>
<b>V. ERGEBNISSE</b>	<b>63</b>
1. Qualitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	63
2. 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptorexpression im <i>Restraint</i> -Stressmodell	64
3. 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptorexpression in den Epilepsiemodellen	66
4. Vergleich der ermittelten Parameter mit den Ergebnissen der $\mu$ PET-Studien	70
5. Korrelation der 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptorexpression mit den Resultaten der $\mu$ PET-Studie im <i>Restraint</i> -Stressmodell	71
6. Korrelation der 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptorexpression mit biochemischen Parametern und Verhaltensparametern in den Epilepsiemodellen	72
<b>VI. DISKUSSION</b>	<b>79</b>
1. Diskussion der Methodik	79
2. Diskussion der Ergebnisse	83
<b>VII. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>91</b>
<b>VIII. SUMMARY</b>	<b>92</b>
<b>IX. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>93</b>
<b>X. ANHANG</b>	<b>124</b>
1. Geräte	124
2. Software	125
3. Lösungen und Substanzen	125
4. Etablierung der Färbungen	130
5. Protokolle	133
6. Fehlerkoeffizienten der Volumenbestimmung des Referenzraumes nach Cavalieri	135
7. R-Skripte	136

---

**XI. PUBLIKATIONSLISTE**

**140**

**XII. DANKSAGUNG**

**141**



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

[ <sup>18</sup> F]FDG	2-deoxy-2-[ <sup>18</sup> F]fluoro-D-glucose	Hz	Hertz
[ <sup>18</sup> F]MPPF	2'-methoxyphenyl-(N-2'-pyridinyl)-p-[ <sup>18</sup> F]fluoro-benzamidoethylpiperazine	IHC	Immunhistochemie
[ <sup>3</sup> H]8-OH-DPAT	8-hydroxy-2-[di-N-propylamino- <sup>3</sup> H]tetralin	ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
°C	Grad Celsius	i.p.	intraperitoneal
5-HT	Serotonin	kg	Kilogramm
5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor	Serotonin-1A-Rezeptor	lat.	lateinisch
A <sub>A</sub>	Flächendichte	M	Molar
Abb.	Abbildung	mg	Milligramm
Abk.	Abkürzung	min	Minuten
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym ( <i>Angiotensin-converting enzyme</i> )	mM	Millimolar
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	mm	Millimeter
AF	Alexa Fluor®	MOL	Molekularzellschicht ( <i>Stratum moleculare</i> )
AK	Antikörper	mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger rionucleid acid</i> )
ANOVA	Varianzanalyse	NeuN	Nukleus des Neurons ( <i>neuronal nuclei</i> )
ARRIVE	Richtlinien für das Berichten von <i>In-vivo</i> -Experimenten ( <i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i> )	nm	Nanometer
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>	OD	Optische Dichte
BLA	basolaterale <i>Amygdala</i>	OF	<i>Open-Field</i> -Test
Bp <sub>nd</sub>	Bindungspotential ( <i>Non-displaceable binding potential</i> )	p	Signifikanzniveau
BSA	Bovines Serumalbumin	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
BWB	<i>Black-White-Box</i> -Test	PBST	Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween®
CA	Ammonshorn ( <i>Cornu ammonis</i> )	PET	Positronen-Emissions-Tomografie
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat	PFA	Paraformaldehyd
CE	Fehlerkoeffizient ( <i>coefficient of error</i> )	P <sub>P</sub>	Punktedichte

COVID-19	Coronavirus-Erkrankung 2019 ( <i>Corona Virus Disease 2019</i> )	PYR	Pyramidenzellschicht ( <i>Stratum pyramidale</i> )
CRH	<i>Corticotropin-Releasing-Hormon</i>	RL	Richtlinie
DAB	3,3'Diaminobenzidin	s	Sekunden
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft	SE	<i>Status Epilepticus</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	SO	Korbzellschicht ( <i>Stratum oriens</i> )
EEG	Elektroenzephalografie	SR	Strahlenschicht ( <i>Stratum radiatum</i> )
EG	Europäische Gemeinschaft	SSRI	selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer ( <i>Selective Serotonin Reuptake Inhibitors</i> )
engl.	Englisch	SUB	<i>Subiculum</i>
EPM	<i>Elevated-Plus-Maze-Test</i>	SURS	systematische, einheitliche, zufällige Probennahme ( <i>Systematic uniform random sampling</i> )
EU	Europäische Union	TierSchG	Tierschutzgesetz
g	Gramm	TLE	Temporallappenepilepsie
GABA	gamma-Aminobuttersäure	V <sub>Ref</sub>	Referenzvolumen
GCL	Körnerzellschicht ( <i>Stratum granulare</i> )	vs.	gegen ( <i>versus</i> )
GD	<i>Gyrus dentatus</i>	V <sub>v</sub>	Volumendichte
GFAP	saures Gliafaserprotein ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )	ZNS	Zentrales Nervensystem
GIRK	G-Protein-aktivierter Kaliumkanal ( <i>G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel</i> )	μA	Mikroampere
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid	μm	Mikrometer
HIER	hitzeinduzierte Demaskierung ( <i>heat induced epitope retrieval</i> )		
Hil	<i>Hilus</i>		
HPA	<i>Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse</i> ( <i>hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i> )		
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )		

## I. EINLEITUNG

Die Vorkommnisse im Rahmen der Coronavirus-Erkrankung 2019 (COVID-19)-Pandemie im vergangenen Jahr unterstreichen einmal mehr die Notwendigkeit der Verwendung von Tiermodellen in der Forschung. Sowohl für das Verständnis der Mechanismen der Erkrankung als auch die rapide und gleichzeitig sichere Impfstoffentwicklung, sind Tiermodelle von hoher Relevanz (GENZEL et al., 2020). Parameter der Belastungseinschätzung dienen dazu, den Schweregrad von Tiermodellen einzuschätzen und Modelle mit geringerer Belastung der Tiere zu priorisieren (WOLFENSOHN et al., 2013; LIDSTER et al., 2016). Gründe für die Belastungsminimierung sind vor allem ethische Bestrebungen und die Ermittlung von qualitativ hochwertigen Forschungsergebnissen sowie die Verbesserung der Wahrnehmung von Tiermodellen in der Öffentlichkeit. Bei Tieren unter (chronischer) Stressbelastung konnten Veränderungen des serotonergen Systems beobachtet werden (SAMAD et al., 2006; PUGLISI-ALLEGRA und ANDOLINA, 2015). Besonders Serotonin-1A (5-HT<sub>1A</sub>)-Rezeptoren sind in großer Anzahl im Säugergehirn vorzufinden und maßgeblich an der serotonergen Neurotransmission beteiligt (POMPEIANO et al., 1992; POPOVA und NAUMENKO, 2013; CARHART-HARRIS und NUTT, 2017; ALBERT und VAHID-ANSARI, 2019). Zahlreiche experimentelle und klinische Studien konnten die Rolle des Rezeptors in Bezug auf Angst, Depression, Impulsivität und soziale Interaktion nachweisen (HANDLEY, 1995; BLIER und DE MONTIGNY, 1999; LESCH und GUTKNECHT, 2004; CARHART-HARRIS und NUTT, 2017; LEWIS et al., 2020). Auch als Reaktion auf Stress zeigten sich Adaptionsmechanismen des Gehirns, in Form einer angepassten Rezeptorantwort (HALEEM et al., 2002). Aufgrund der weiten Verbreitung im Gehirn und des Einflusses auf die Stressantwort, stellt sich die Frage nach der möglichen Nutzung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als Parameter der Belastungseinschätzung in Tiermodellen. Darüber hinaus reguliert das serotonerge System die neuronale Erregbarkeit, wobei dem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor eine hyperpolarisierende und hemmende Rolle zugesprochen wird (CARHART-HARRIS und NUTT, 2017). Aus diesem Grund hat das serotonerge System und insbesondere der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor vermehrt Beachtung in der Erforschung von neuropsychiatrischen Erkrankungen wie der Epilepsie gefunden (JANUSZ und KLEINROK, 1989; GRAF et al., 2004; LÓPEZ-MERAZ et al., 2005; BAGDY et al., 2007; SAPA et al., 2014; GHARIB et al., 2018).

In einem Stress- und zwei chronischen Epilepsiemodellen unserer Forschungsgruppe konnte in den vergangenen Jahren mithilfe von Positronen-Emissions-Tomografie-Aufnahmen ein erhöhtes Bindungspotential des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antagonisten 2'-methoxyphenyl-(N-2'-pyridinyl)-p-[<sup>18</sup>F]fluoro-benzamidoethylpiperazine ([<sup>18</sup>F]MPPF) in verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten Korrelationen des [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotentials mit verschiedenen Verhaltensparametern festgestellt werden, welche im Rahmen der Studien ermittelt wurden (DI LIBERTO et al., 2018; VAN DIJK et al., 2018; BUCHECKER et al., 2020).

Neurologische Erkrankungen sind häufig mit einem erhöhten Risiko der Entwicklung von psychiatrischen Komorbiditäten wie zum Beispiel Depressionen und Angst begleitet, welche die Lebensqualität der Betroffenen massiv beeinflussen können (MAZARATI et al., 2007; KANNER et al., 2010; PINEDA et al., 2010; INOSTROZA et al., 2012; BROOKS-KAYAL et al., 2013; SEO et al., 2013; KANNER, 2016; JOSEPHSON und JETTÉ, 2017). Oftmals sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht genau verstanden und vor allem bei Patienten mit kognitiven Einschränkungen wird eine Vielzahl dieser Begleiterkrankungen nicht erkannt (HERMANN et al., 2000; PINEDA et al., 2010; HELMSTAEDTER und WITT, 2017). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Verhaltensänderungen in Nagern Modellen psychiatrische Komorbiditäten widerspiegeln können (GASTENS et al., 2008; MAZARATI et al., 2008; SEO et al., 2013; MINJAREZ et al., 2017). Tiermodelle können helfen, die Mechanismen zwischen der Erkrankung und den Komorbiditäten genauer zu verstehen (KANNER, 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird das Potential der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als Parameter für die Belastungseinschätzung in Tiermodellen und als möglicher Biomarker für die Evaluation von psychiatrischen Komorbiditäten neurologischer Erkrankungen, anhand einer retrospektiven immunhistochemischen Studie evaluiert.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Belastungseinschätzung in Tiermodellen

#### 1.1. Relevanz von Tiermodellen für die Forschung

In einer Veröffentlichung der *European Animal Research Association* schrieben die Autoren, dass im Zeitraum von 2015 bis 2017 in der Europäischen Union (EU) durchschnittlich etwa 9,6 Millionen Tiere zu Versuchszwecken verwendet wurden (EUROPEAN ANIMAL RESEARCH ASSOCIATION, 2020). Diese werden zu einem Großteil in der Grundlagenforschung und der präklinischen Forschung verwendet (BRYDA, 2013; LILLEY et al., 2020). Es werden unter anderem Aspekte wie Krankheitsentstehung, Pharmakotherapie und mögliche Komorbiditäten, also Begleiterscheinungen der eigentlichen Erkrankung, untersucht (LIDSTER et al., 2016).

Mit zunehmender Tendenz wird die Frage der Notwendigkeit von Tierversuchen diskutiert. Einige Menschen vertreten die Ansicht, dass die Forschung an Tieren unethisch und nicht mehr notwendig sei (JENNINGS und SILCOCK, 1995; BAUMANS, 2004; FESTING und WILKINSON, 2007; MERKLEY et al., 2018; STRECH und DIRNAGL, 2019). Die öffentliche Wahrnehmung deckt sich nicht zwangsläufig mit der Realität. Entgegen der oft verbreiteten Meinung ist beispielsweise der Verkauf von kosmetischen Produkten, welche tierexperimentell getestet wurden, seit 2009 nicht mehr gestattet (siehe VO (EG) Nr. 1223/2009). In 2019 adressierten PETA Organisationen verschiedener europäischer Länder eine Petition an die EU mit der Forderung, Forschung auf Basis von Tierversuchen mit sofortiger Wirkung zu stoppen (siehe Petition Nr. 1125/2019). Die Autoren argumentierten, dass der Wissenszuwachs durch tierversuchsbasierte Forschung gering und somit ungerechtfertigt sei. Dieser Aussage widersprach die Europäische Kommission in ihrer Antwort. Stattdessen befanden die politischen Vertreter, dass zahlreiche Therapieoptionen beispielsweise von Krebserkrankungen, chronischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Infektionskrankheiten ohne versuchstierkundliche Forschung nicht existieren würden (EUROPÄISCHES PARLAMENT, 2019).

Eine dieser Infektionskrankheiten sorgte im vergangenen Jahr für Aufsehen in vielen Bereichen der Gesellschaft. GENZEL et al. (2020) nutzten die aktuellen Ereignisse im

Kontext der COVID-19-Pandemie, um die Relevanz von Tiermodellen in der Forschung zu unterstreichen. Zwar bestätigen die Autoren die unterstützende Funktion von tierversuchsfreien Modellen, schrieben aber auch, dass derzeit kein Alternativmodell die Komplexität des Körpers abbilden könne. Dies würde insbesondere bei einem Virus wie SARS-CoV-2 (von engl. *severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*) und den vielfältigen assoziierten Pathologien deutlich. Darüber hinaus diskutierten die Autoren die Relevanz von Tiermodellen im Kontext der Impfstoffentwicklung in Bezug auf Wirksamkeit und Sicherheit. Gerade unter dem Aspekt, eine Vielzahl von Menschen kurzfristig impfen zu wollen, besteht der Wunsch, Nebenwirkungen von Impfstoffkandidaten frühzeitig zu erkennen. Für die Erforschung des Virus sind bereits zahlreiche Spezies zum Einsatz gekommen, wobei die Untersuchung des Hamsters einen wesentlichen Beitrag zur Entdeckung des Zielproteins des Virus, dem ACE2 (von engl. *Angiotensin-converting enzyme 2*), leisten konnte (CHAN et al., 2020; COHEN, 2020). Nager, insbesondere Mäuse und Ratten, sind nach wie vor die meistgenutzte Spezies zur Erforschung von Krankheiten (NESTLER und HYMAN, 2010; GENZEL et al., 2020). BELZUNG und LEMOINE (2011) unterstrichen die Relevanz der Nagermodelle für die Erforschung von Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Beispielsweise konnten durch die Detektion der Neurogenese im *Hippocampus* von Nagern, Rückschlüsse für die Pharmakotherapie von Menschen mit Depressionen gezogen werden. Vorteile bei der Verwendung von Nagern in Tiermodellen sind die verhältnismäßig schnelle Reproduktion und die Größe der Tiere (BARRÉ-SINOUSI und MONTAGUTELLI, 2015). Darüber hinaus wird auch zunehmend die Verwendung anderer Spezies, zum Beispiel von Zebrafischen, diskutiert (GRONE und BARABAN, 2015).

Ein wichtiger Aspekt bei der Auswahl eines geeigneten Tiermodelles ist die Beachtung der folgenden drei Parameter (WILLNER, 1984; BELZUNG und LEMOINE, 2011):

- 1) Augenscheinvalidität (engl. *face validity*): Parameter, welcher beschreibt, bis zu welchem Grad das Tiermodell den klinischen Symptomen bei einem anderen Tier oder beim Menschen entspricht.
- 2) Konstruktvalidität (engl. *construct validity*): Parameter, welcher beschreibt, bis zu welchem Grad das Tiermodell der Pathogenese bei einem anderen Tier oder beim Menschen entspricht.
- 3) Vorhersagevalidität (engl. *predictive validity*): Parameter, welcher beschreibt, inwiefern Aussagen über zukünftig auftretende Ereignisse getroffen werden

können, beispielsweise über die Wirksamkeit eines zukünftig eingesetzten Medikamentes.

Zwar sollten in einem übertragbaren Tiermodell die Hauptaspekte der untersuchten Fragestellung abgebildet werden, es muss aber keinesfalls identisch mit der Erkrankung beim Menschen sein (BARRÉ-SINOSSI und MONTAGUTELLI, 2015). Unter diesem Gesichtspunkt müssen darüber hinaus die Praktikabilität der Durchführung, die Wirtschaftlichkeit und die ethische Vertretbarkeit berücksichtigt werden (LIDSTER et al., 2016).

## 1.2. Ethische Bewertung von Tiermodellen

Wie bereits beschrieben, gibt es immer wieder aufflammende Debatten um die ethische Vertretbarkeit der Verwendung von Tieren zu Versuchszwecken. Der Schutz der Tiere ist in Deutschland in Artikel 20a des Grundgesetzes als Staatsziel verankert. Darüber hinaus werden die Tiere, welche zu Versuchszwecken gehalten werden, auf nationaler Ebene durch das Tierschutzgesetz (TierSchG), die Tierschutz-Versuchstierverordnung, die Versuchstiermeldeverordnung und die Tierschutztransportverordnung geschützt. Auf europäischer Ebene stehen Tiere unter dem Schutz der sogenannten Versuchstierrichtlinie, *Richtlinie (RL) 2010/63/EU des europäischen Parlamentes und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendete Tiere*. Die RL gilt für Wirbeltiere, und auch für selbstständig Nahrung aufnehmende Larven, Föten von Säugetieren im letzten Drittel der Entwicklung sowie Kopffüßer. Versuche an Tieren dürfen nur durchgeführt werden, sofern sie ethisch vertretbar sind (siehe §7 Abs. 3 und §8 TierSchG). Allerdings sind ethische Perspektiven relativ und reichen von absoluter Ablehnung von Tierversuchen, über die Akzeptanz von Tiermodellen im Interesse des Wissensgewinns, bis zur uneingeschränkten Befürwortung der Verwendung von Tieren in der Forschung (GROSS und TOLBA, 2015). Ein Konzept zur Verbesserung von Tierversuchen ist das 3R-Prinzip, welches innerhalb der RL 2010/63/EU verankert ist. Der von RUSSELL und BURCH (1959) geprägte Begriff des 3R-Prinzips beschreibt 1) den Ersatz (engl. *Replacement*), 2) die Reduzierung (engl. *Reduction*) und 3) die Verbesserung (engl. *Refinement*) von Tiermodellen. FERDOWSIAN und GLUCK (2015) diskutierten in ihrer Veröffentlichung die ethischen Herausforderungen bezüglich der Forschung mit Versuchstieren. Sie kritisierten, dass sich das 3R-Prinzip nur

geringfügig mit der ethischen Rechtfertigung beschäftigt und forderten die Überprüfung individuell in jedem Tiermodell. Die Max-Planck-Gesellschaft hat den Begriff des 3R-Prinzips erweitert und ein viertes R für die Verantwortung (engl. *Responsibility*) der Wissenschaftler für die kontinuierliche Verbesserung des Tierschutzes hinzugefügt (siehe [www.mpg.de](http://www.mpg.de)).

Mit dem *Replacement* ist innerhalb des 3R-Prinzips der Ersatz des Tiermodells durch andere Methoden oder die Verwendung von anderen Spezies, zum Beispiel Wirbellose oder Zelllinien, gemeint. Ersteres wird immer wieder von Tierschützern und anderen Interessengruppen gefordert, setzt allerdings voraus, dass es Alternativen zum Tiermodell gibt. *Reduction* bezeichnet die Veränderung des Versuchsaufbaus, sodass weniger Tiere bei ähnlichem Informationsgewinn verwendet werden können. Auch die Verwendung von Materialien aus vorangegangenen Studien innerhalb einer retrospektiven Studie, dient der *Reduction* im Sinne des 3R-Prinzips. Automatisierte Auswertungsmethoden ermöglichen eine *Reduction* in Tiermodellen, da potentiell mehr Daten aus vorliegenden Materialien gewonnen werden können und somit zusätzliche Versuche redundant werden (LIDSTER et al., 2016). Die ARRIVE-Richtlinien (von engl. *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) beinhalten Empfehlungen zum standardisierten und detaillierten Berichten von Daten. Die Berücksichtigung dieser Richtlinien kann gegebenenfalls zur *Reduction* beitragen, da reproduzierbare Ergebnisse gewonnen werden könnten, welche nicht aufgrund laborspezifischer Unterschiede wiederholt werden müssten (PERCIE DU SERT et al., 2020). Eine Wissenslücke, welche im Sinne der *Reduction* verhindert werden kann, entsteht durch das Ausbleiben des Berichtens negativer Ergebnisse. Dies kann dazu führen, dass ähnliche Versuche beispielsweise an verschiedenen Standorten mehrfach durchgeführt werden. LIDSTER et al. (2016) konnten in einer Umfrage zeigen, dass eine Vielzahl an negativen Forschungsergebnissen nicht veröffentlicht werden oder auch nur schwer zu veröffentlichen sind.

Einige Wissenschaftler kritisieren den bürokratischen Aufwand, welcher durch die Vielzahl an regulatorischen Maßnahmen im Kontext des 3R-Prinzips entstanden ist. Durch die rechtlichen Einschränkungen gehen wertvolle Ressourcen verloren, welche somit nicht der eigentlichen Forschungstätigkeit gewidmet werden können. Einige Forscher sprechen somit von einem der *Reduction* entgegengesetzten Effekt (BLAKEMORE et al., 2012; GENZEL et al., 2020).



Das *Refinement* bezeichnet wiederum Methoden, die das Leiden der Tiere, verursacht durch beispielsweise Schmerzen oder Stress, reduzieren (BLAKEMORE et al., 2012). *Refinement*-Methoden von Tiermodellen sind beispielsweise Anpassungen von gut verträglichem, kalorienreichem Futter und subkutanen Wasserinjektionen, um postoperativen Gewichts- und Flüssigkeitsverlusten vorzubeugen (PRESCOTT et al., 2010). Die Applikationsform sowie das -volumen und -intervall von Substanzen beeinflussen die Tiere. So ist beispielsweise eine orale Gabe von Wasser weniger stressvoll als eine intraperitoneale (MORTON et al., 2001).

Es ist nach wie vor eine übliche Praxis, Mäuse an der Schwanzbasis aus dem Käfig zu nehmen. Hier sollten andere Methoden angewendet werden, da es nachweislich erheblichen Stress für die Tiere bedeutet auf diese Art transportiert zu werden. Es bestehen zahlreiche Alternativen, um die Tiere aus dem Heimkäfig zu befördern, so zum Beispiel in der offenen Hand oder mithilfe eines Tunnels. Beide Methoden werden als einfach zu etablieren beschrieben (GOUVEIA und HURST, 2017). Auch die Käfigausstattung, beispielsweise mit Versteckmöglichkeiten und Nestmaterial, kann als Bereicherung im Sinne des *Refinements* dienen. Darüber hinaus kann das Nestbauverhalten gleichzeitig als [Parameter der Belastungseinschätzung](#) (siehe unten) dienen. Allerdings sollte die Auswahl der *Refinement*-Maßnahmen mit Vorsicht getroffen werden. Eine Vielfalt an Gegenständen im Käfig kann zum Beispiel die Bildung von Nervenzellen (Neurogenese) fördern und somit die Anfallsschwelle erhöhen. Dieses wäre in einem Epilepsiemodell eher nachteilig für die Versuchsdurchführung (LIDSTER et al., 2016). Die Überwachungsmethoden der Tiere sollten im Sinne des *Refinements* möglichst wenig invasiv gewählt werden. So kann für die Aufzeichnung von Daten der Elektroenzephalografie (EEG) ein Transmitter anstelle eines Kabels verwendet werden (LIDSTER et al., 2016). Dazu wurden ausgiebige Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt, in welchen Unterschiede zwischen Transmitter- und Kabelaufzeichnungen anhand von Verhaltens- und biochemischen Parametern dargestellt werden konnten (KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019; VAN DIJK et al., 2020).

Unerwünschte Ereignisse zu registrieren und deren Vorkommen zu reduzieren zählt zum *Refinement* (GOLLEDGE und JIRKOF, 2016). In diesem Kontext ist auch die Definition des humanen Endpunktes (engl. *humane endpoint*) zu nennen (STEEN et al., 1999). Im Vorfeld der Versuchsdurchführung sollte schon bei der Antragsstellung klar definiert werden, an

welchem Punkt die durchgeführte Prozedur oder der gesamte Versuch zu beenden ist (siehe Artikel 17 RL 2010/63/EU).

Tiere können entweder am Ende oder durch das Auftreten unerwarteter Ereignisse auch während eines Versuches getötet werden. Kann die Belastung eines Tieres während des Versuches weitestgehend minimiert werden, besteht unter bestimmten Voraussetzungen die Möglichkeit, es auch über das Versuchsende hinaus weiterleben zu lassen. Diese Entscheidung sollte vorrangig aus ethischer Perspektive und den rechtlichen Rahmenbedingungen und darüber hinaus dem Nutzen für das Forschungsergebnis getroffen werden (ASHALL und MILLAR, 2014).

In Artikel 15 und Anhang VIII der RL 2010/63/EU werden die Tiermodelle anhand von Schweregraden in „keine Wiederherstellung des Lebens“, „gering“, „mittel“ und „schwer“ klassifiziert. Die Klassifizierung erfolgt im Vorfeld der Versuchsdurchführung. Dabei beschreibt der Schweregrad „gering“ beispielsweise ein nicht-invasives, bildgebendes Verfahren wie die Positronen-Emissions-Tomografie (PET) unter Sedation oder Narkose. Vom mittleren Schweregrad kann bei einem chirurgischen Eingriff unter Vollnarkose gesprochen werden. Der dritte Schweregrad „schwer“ ist beispielsweise eine Toxizitätsstudie, bei welcher der letale Endpunkt bestimmt wird (BAUMANS, 2005). Auch innerhalb dieser Kategorien ist die Belastung der Tiere nicht immer gleich. Die Belastungseinschätzung ist ein wichtiger Aspekt des *Refinements*. Zum einen kann die Belastungseinschätzung im Sinne der Forschungsfrage wichtige Hinweise geben. Die Dokumentation von veränderten Verhaltensmustern der Tiere helfen bei bestimmten Erkrankungen diese besser zu verstehen. Zum anderen ist es aus ethischer Sicht erstrebenswert, die Belastung der Tiere nachhaltig zu reduzieren und somit gleichzeitig aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten (LIDSTER et al., 2016). Es ist mittlerweile allgemein anerkannt, dass eine Belastungsminimierung der Tiere einen positiven Einfluss auf die Qualität der Studienergebnisse hat (BAUMANS, 2004; LILLEY et al., 2020).

### **1.3. Parameter der Belastungseinschätzung**

Wie in den beiden vorherigen Abschnitten erklärt, sind Nager eine wichtige Spezies in einer Vielzahl von Tiermodellen. Dadurch, dass die Notwendigkeit der Verwendung dieser Tiere nach wie vor besteht, gibt es ein ethisch-motiviertes Bestreben nach der Optimierung der Versuche dem 3R-Prinzip folgend. Es besteht ein Interesse an der

Evaluation von validen Parametern für die Belastungseinschätzung und an der Entwicklung von Schemata der Belastungseinschätzung in Tiermodellen. Bei gleicher oder ähnlicher prädiktiver Validität können Modelle mit einem höheren Grad der Belastung der Tiere vermieden werden (SMITH et al., 2018). Da (chronischer) Stress auch Studienergebnisse beeinträchtigen kann, besteht auch im Sinne des Forschungserfolges ein großes Interesse daran, die Belastung der Tiere gut zu überwachen (POOLE, 1997; HUANG et al., 2019; LILLEY et al., 2020). Für die Spezies der Nager besteht insbesondere ein Interesse an aussagekräftigen Parametern der Belastungseinschätzung. Nager neigen als Fluchttiere dazu Belastung, welche beispielsweise durch Stress oder Schmerzen verursacht wird, nicht zu zeigen (HUTCHINSON et al., 2005).

Verschiedene Arbeitsgruppen der Europäischen Kommission haben Unterlagen zur Belastungseinschätzung von Tiermodellen zusammengestellt (siehe [https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/index\\_en.htm](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/index_en.htm)). Im Rahmen der Arbeit unserer DFG-Forschungsgruppe (FOR 2591) wurden bereits zahlreiche Kandidaten als Parameter der Belastungseinschätzung identifiziert und an mehreren Forschungsstandorten und in verschiedenen Tiermodellen evaluiert. Auf Basis dieser Erkenntnisse wurden von unserer Arbeitsgruppe geeignete Parameter der Belastungseinschätzung in Tiermodellen ermittelt (MÖLLER et al., 2018; KOSKA et al., 2019; SEIFFERT et al., 2019; VAN DIJK et al., 2020; BOLDT et al., 2021).

Im Folgenden soll eine Übersicht von gemessenen Parametern der Belastungseinschätzung beschrieben werden. Dazu zählen:

- Allgemeine Parameter
- Verhaltensparameter
- Biochemische Parameter

### **Allgemeine Parameter**

Allgemeine Parameter, die den Zustand des Tieres erfassen, sind die **Nahrungsaufnahme** im Verlauf des Versuchs sowie das **Körpergewicht**. Diese stellen einfach zu ermittelnde und objektive Parameter der Belastungseinschätzung dar. Dabei empfiehlt sich sowohl die Betrachtung der Gewichtsentwicklung des Individuums als auch die Relation zu bekannten Entwicklungen innerhalb der Zuchtlinie zu beobachten (LIDSTER et al., 2016).

### Verhaltensparameter

Der Verschmutzungsgrad des Nests (engl. *level of soiling*) und das Nestbauverhalten (engl. *nestbuilding*) sind Parameter des Heimkäfigverhaltens.

Der Grad der **Verschmutzung des Nests** kann dabei beispielsweise anhand einer Skala, wie sie von VAN LOO und BAUMANS (2004) (1= sauber, 2= leichte Verunreinigung, 3= grobe Verunreinigung) beschrieben wurde, bewertet werden. Dabei wird zum einen die Sauberkeit des Nestbereiches und zum anderen die Verteilung von Kot und Urin im Käfig beurteilt.

Das **Nestbauverhalten** im Heimkäfig der Tiere wurde als Parameter der Belastungseinschätzung vorgeschlagen, nachdem beobachtet wurde, dass Mäuse unter starker Belastung wie Schmerzen oder Stress ein weniger ausgeprägtes Nestbauverhalten zeigten (MORETTI et al., 2005; GASKILL et al., 2013; JIRKOF et al., 2013b; HÄGER et al., 2015). Die Bewertungsskala für das Nestbauverhalten wurde in verschiedenen Publikationen für Mäuse (DEACON, 2006a; HESS et al., 2008; GASKILL et al., 2013; JIRKOF et al., 2013b) und Ratten (VAN LOO und BAUMANS, 2004; SCHWABE et al., 2020) definiert. Das Verhalten der Ratten scheint sich dabei von dem der Mäuse zu unterscheiden. Insbesondere bauen Ratten weniger komplexe Nester als Mäuse (MANSER et al., 1998; VAN LOO und BAUMANS, 2004). Eine der Erklärungen war, dass Ratten stärker von der Umgebungstemperatur beeinflusst werden (KINDER, 1927). VAN LOO und BAUMANS (2004) vermuteten, dass die Art des Nestmaterials und die Erfahrung mit diesem einen Einfluss auf die Komplexität der Nester haben könnten. In einer multizentrischen Studie unseres Konsortiums verglichen SCHWABE et al. (2020) Werte für das Nestbauverhalten an zwei Standorten und diskutierten den Einfluss von Geschlecht und Erfahrung der Tiere mit dem vorliegenden Nestmaterial. Die Empfehlung auf Basis dieser Studie ist es, Mittelwerte der Ergebnisse des Nestbauverhaltens mehrerer Tage zu nutzen und darüber hinaus die Evaluierenden gut zu schulen. Nagetiere sind nachtaktive Tiere, bauen ihre Nester vorwiegend in der dunklen, aktiven Zeit und schlafen in diesen während des Tages. Dies ist ein weiterer Aspekt, welcher bei der Auswahl des Zeitpunktes für die Bewertung der Komplexität der gebauten Nester beachtet werden sollte.

Ein physiologisches Verhalten von Nagern ist das **Graben** oder Buddeln (engl. *burrowing*) in der Erde (DEACON, 2006b). In einem einfach umzusetzenden Verhaltenstest wird das natürliche Buddelverhalten mithilfe von kiesgefüllten Röhren evaluiert. Dabei kann sowohl die Zeit bis zum Start des Grabens als auch der verbleibende Kies in der Röhre

nach einer definierten Zeit gemessen werde. Dieser Test wurde bereits zur Evaluation der Schmerzbelastung von Nagern und Wirksamkeit von Analgesie in Tiermodellen verwendet. Dabei zeigten Nager unter Schmerzen ein reduziertes Buddelverhalten (DEACON, 2006b; JIRKOF et al., 2010; ANDREWS et al., 2012; JIRKOF et al., 2013a; RUTTEN et al., 2014).

Der Test zum Bemessen der **sozialen Interaktion** zwischen Nagern wurden erstmals von FILE und HYDE (1978) beschrieben. Dieser Verhaltenstest wurde initial zum Ermessen der Angst der Tiere verwendet. Zur Durchführung werden die Tiere für eine bestimmte Zeit in einen abgegrenzten Raum verbracht. Tiere mit Angst, Autismus, Epilepsie oder Depressionen zeigen in diesem Test weniger soziale Interaktionen (FILE und HYDE, 1978; MELLANBY et al., 1981; KWON et al., 2006; BEERY und KAUFER, 2015). Als soziale Interaktion wird das Beschnüffeln oder die Fellpflege des anderen Tieres bezeichnet (FILE und HYDE, 1978). Dabei kann zwischen aktivem, passivem und aggressivem Verhalten unterschieden werden. Aktive Verhaltensmuster beschreiben dem anderen Tier zu folgen, es zu besteigen oder dieses anzuknabbern. Solange Letzteres nicht als Attacke des anderen Tieres gewertet wird, gilt es nicht als aggressives Verhalten. Passives Verhalten der Tiere bezeichnet den Körperkontakt der Tiere ohne weitere Interaktion (DE ANGELIS und FILE, 1979). Als Parameter kann die Zeit der aktiven, sozialen Interaktion gemessen werden (BEERY und KAUFER, 2015). (Semi-)automatische Systeme erleichtern die Erfassung der Werte (CRAWLEY, 2004; PAGE et al., 2009). Es gibt zahlreiche Faktoren, welche das Versuchsergebnis beeinflussen können. Eine bekannte Umgebung sowie gedimmtes Licht wirken sich positiv auf die soziale Interaktion aus (FILE und HYDE, 1978; GUY und GARDNER, 1985). Des Weiteren spielen die Ausstattung der Testfläche, beispielsweise mit Rückzugsmöglichkeiten, die Bekanntheit der Tiere untereinander und das Geschlecht eine Rolle (BEERY und KAUFER, 2015). Auch bei diesem Test gibt es speziesspezifische Unterschiede zwischen Ratten und Mäusen (DE ANGELIS und FILE, 1979).

Beim **Saccharin-Präferenz-Test** wird der Verlust der Vorliebe der Nager für eine süße Lösung im Vergleich zu Wasser als Indikator der Anhedonie gemessen (MAZARATI et al., 2007; INOSTROZA et al., 2012). Anhedonie bezeichnet die reduzierte oder fehlende Fähigkeit Interesse oder Freude zu zeigen (MOREAU, 2002; DER-AVAKIAN und MARKOU, 2012). Beim Menschen wird Anhedonie bei Patienten mit Depressionen beobachtet (MOREAU, 2002; GRØNLI et al., 2005). Die Tiere erhalten in diesem Test eine Flasche

gefüllt mit Saccharin-Lösung und eine Flasche gefüllt mit Wasser, um eine Präferenz für eine der beiden Flüssigkeiten zu evaluieren. In Tiermodellen zeigten die Tiere unter einer Belastung durch Stress und durch elektrische Stimulation in einem Kindling-Epilepsie-Modell eine reduzierte Präferenz für die Saccharin-Lösung (MOREAU, 2002; MAZARATI et al., 2007). Im Rahmen der Arbeit unserer Forschungsgruppe konnte dieser Unterschied in einem Kindling-Epilepsie-Modell bei Mäusen bestätigt werden. Auch hier zeigten die elektrisch stimulierten Tiere eine reduzierte Aufnahme der Saccharin-Lösung im Vergleich zur Kontrollgruppe (BOLDT et al., 2021). In einem weiteren Kindling-Epilepsie-Modell unserer Forschungsgruppe konnte bei Ratten wiederum kein Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen bezüglich der Saccharin-Präferenz festgestellt werden (MÖLLER et al., 2018).

In dem erstmals von HALL (1934) beschriebenen **Open-Field-Test** (OF) wird das natürliche Erkundungsbedürfnis von Nagern in einer neuen Umgebung genutzt, um die lokomotorische Aktivität der Tiere zu beurteilen (ARCHER, 1973; PRUT und BELZUNG, 2003; HÖLTER et al., 2015). Dieses Bedürfnis steht im direkten Konflikt dazu, als Beutetier freie, offene Flächen zu meiden (WHIMBEY und DENENBERG, 1967). Verwendet wird eine offene Fläche, welche nur an den Seiten begrenzt ist. Thigmotaxis bezeichnet das Verhalten von Nagern, sich nahe dem Wandbereich aufzuhalten (CHOLERIS et al., 2001). Da die Tiere sich schnell an diese neue Umgebung gewöhnen, eignet sich dieser Test, wenn überhaupt, nur in den ersten Minuten (min) zur Evaluation von angstassoziertem Verhalten (PRUT und BELZUNG, 2003; HÖLTER et al., 2015). Dies ist jedoch auch von Platz- und Lichtverhältnissen der Apparatur abhängig (CHOLERIS et al., 2001). Ermittelte Parameter sind vor allem die Bewegungen in der horizontalen und das Aufrichten des Körpers (engl. *rearing*). Aber auch die Latenzzeit bis zum ersten Aufenthalt im Zentrum, die Aufenthaltszeit in Zentrum und Wandbereich sowie die Defäkation können ermittelt werden (WILSON et al., 1976; SCHMITT und HIEMKE, 1998; HÖLTER et al., 2015; SEIBENHENER und WOOTEN, 2015; STURMAN et al., 2018). Tiere mit chemisch-induzierten Anfällen zeigten im OF reduziertes Erkundungsverhalten (MOHAJERI et al., 2004). Auch hier ermöglicht die Verwendung eines Video-Bewegungssystems mit Kamera und dazugehöriger Software eine einfache und unverzerrte Dokumentation. Der *Elevated-Plus-Maze-Test* und der *Black-White-Box-Test* sind Verhaltenstests zur Evaluation von angstassoziertem Verhalten. Beide Tests nutzen dabei den Konflikt zwischen natürlichem Erkundungsbedürfnis und der gleichzeitig bestehenden Aversion

der Tiere gegen helle und offene Räume (CRAWLEY und GOODWIN, 1980; HANDLEY und MITHANI, 1984; LISTER, 1987; RODGERS und DALVI, 1997; BOURIN und HASCOËT, 2003; WALF und FRYE, 2007).

Der **Elevated-Plus-Maze-Test (EPM)** wurde zuerst von MONTGOMERY (1955) als Y-förmige und später von HANDLEY und MITHANI (1984) als kreuzförmige Apparatur für die Evaluation von angstassoziertem Verhalten bei Ratten beschrieben. PELLOW et al. (1985) validierten die Methode für die Verwendung mit Mäusen. Der heute häufig verwendete EPM besteht aus einem erhöht aufgebautem Kreuz mit zwei offenen und zwei geschlossenen Armen (HANDLEY und MITHANI, 1984; HÖLTER et al., 2015). Ermittelt wird die Aufenthaltsdauer in den jeweiligen Armen und darüber hinaus die Zeit, welche im äußeren Drittel des offenen Armes verbracht wird. Der Aufenthalt in den offenen Armen, insbesondere im äußeren Drittel, dient als Indikator von reduziertem angstassozierten Verhalten (BELZUNG und GRIEBEL, 2001). Außerdem kann gezählt werden, wie oft die Tiere von den offenen Armen über den Rand in die Tiefe schauen, die im Englischen sogenannten „*head dips*“ (DEACON, 2013). Als ein weiterer Parameter werden die gestreckten Haltungen (engl. *stretching postures*) gezählt. Diese beschreiben das Strecken während des Aufenthalts in den geschlossenen Bereichen oder dem Zentrum der Apparatur (geschütztes Strecken) beziehungsweise in einem offenen Bereich (ungeschütztes Strecken). Sie dienen als Parameter der Risikobereitschaft der Tiere (FERNÁNDEZ ESPEJO, 1997). Somit kann beispielsweise die Wirkung von angstlösenden Substanzen, sogenannten Anxiolytika, im Tiermodell nachgewiesen werden (HANDLEY und MITHANI, 1984). Auch beim EPM-Test gibt es Unterschiede zwischen den verwendeten Spezies, verschiedenen Zeitpunkten der Durchführung des Tests und unterschiedlichen Lichtverhältnissen (BELZUNG und GRIEBEL, 2001). Nichtsdestotrotz ist der Test schnell durchzuführen, bedarf keines Trainings und ermöglicht eine Einschätzung von Veränderungen des angstassozierten Verhaltens (PELLOW et al., 1985; RODGERS und DALVI, 1997).

Der **Black-White-Box-Test (BWB)** besteht aus einem hellen und einem dunklen Kompartiment, meist über einen Transitbereich verbunden. Gemessene Parameter sind die Anzahl der Eintritte in die jeweiligen Abschnitte, die Aufenthaltsdauer in diesen und die Latenzzeit bis zum ersten Eintritt in die Kompartimente. Eine kürzere Latenzzeit für den Eintritt in das schwarze Kompartiment kann auf angstassoziertes Verhalten hinweisen. Bei reduziertem angstassozierten Verhalten begeben die Tiere sich häufiger

und/oder länger in den hellen Bereich der Apparatur. Auch die Anzahl der *stretching postures* werden bei diesem Test als Zeichen der Furchtlosigkeit gezählt. Mit diesem Test kann auch das grundsätzliche Explorationsbedürfnis der Tiere evaluiert werden, während das ‚Einfrieren‘ (engl. *freezing*) wiederum ein Indikator von Angst der Tiere ist (HASCOËT et al., 2001; HÖLTER et al., 2015).

### **Biochemische Parameter**

Biochemisch wurden im Rahmen der Arbeit unserer Forschungsgruppe unter anderem die BDNF- und Corticosteronkonzentration als potentielle Parameter der Belastungseinschätzung evaluiert.

Der **Wachstumsfaktor BDNF** (von engl. *brain-derived neurotrophic factor*) gehört zur Familie der Neurotrophine. BDNF ist im zentralen Nervensystem, vor allem in *Hippocampus* und Großhirnrinde, weit verbreitet (ERNFORS et al., 1990; HOFER et al., 1990). Funktionell beeinflusst BDNF verschiedene Gehirnfunktionen wie Neurogenese, Lernen und Erinnerung und moduliert die neuronale Signalübertragung (THOENEN, 1991; BINDER und SCHARFMAN, 2004; PARK und POO, 2013; BEKINSCHTEIN et al., 2014; LEAL et al., 2015; BJÖRKHOLM und MONTEGGIA, 2016). Der Wachstumsfaktor verstärkt erregende und schwächt hemmende Reizsignale (ERNFORS et al., 1991; BINDER und SCHARFMAN, 2004). So konnte in Epilepsiemodellen eine Erhöhung des BDNF-Spiegels mit der Anfallsaktivität in Zusammenhang gebracht werden (KOKAIA et al., 1995; NIBUYA et al., 1995). Auch die Empfänglichkeit für Stress steigt mit dem BDNF-Spiegel (BERTON et al., 2006; BEERY und KAUFER, 2015). Reduzierte BDNF-Spiegel zeigten wiederum eine inverse Korrelation mit angstassoziiertem Verhalten (CHEN et al., 2006). Bei Humanpatienten mit neuropsychiatrischen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson wurde eine reduzierte BDNF-Expression beobachtet (PHILLIPS et al., 1991; HOWELLS et al., 2000). Außerdem konnten mithilfe von BDNF-Agonisten Reparaturmechanismen an geschädigten Neuronen induziert und Symptome bei gestressten Tieren verbessert werden (ANDERO et al., 2012; DEOGRACIAS et al., 2012). Interessanterweise besteht eine gegenseitige Regulation von BDNF und Serotonin (5-HT). BDNF regt das Wachstum der 5-HT-Neurone an, während 5-HT die Expression von BDNF stimuliert (MATTSON et al., 2004). Die beschriebenen Untersuchungen geben Hinweise auf eine mögliche Nutzung von BDNF als biochemischer Parameter der Belastungseinschätzung. Allerdings konnte



diese im Rahmen der Arbeiten unserer Forschungsgruppe nicht abschließend validiert werden.

Eine typische Stressantwort auf biochemischer Ebene ist die gesteigerte Glucocorticoidsekretion (WHIRLEDGE und CIDLOWSKI, 2010). Stress verursacht eine erhöhte Freisetzung des *Corticotropin-Releasing-Hormons* (CRH), wodurch wiederum das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) ausgeschüttet wird. ACTH vermittelt die Synthese und Sekretion von Glucocorticoiden (RIVIER und VALE, 1983; SMITH und VALE, 2006). Ein negativer Feedbackmechanismus, vermittelt durch Cortisol, ACTH und CRH, reguliert die *Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse* (Abk. HPA von engl. *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*) (BAMBERGER et al., 1996). Das Haupt-Glucocorticoid, welches bei Nagern vorkommt, ist **Corticosteron** (INOSTROZA et al., 2012). Die Bestimmung der Konzentration des Corticosterons kann unter anderem in Serum, Haaren oder Fäzes erfolgen und einen Hinweis auf die Aktivität der HPA-Achse geben (SMITH und VALE, 2006; INOSTROZA et al., 2012). Fehlregulationen der HPA-Achse können auf Depressionen und Stress hinweisen und wurden als Mittel zur Evaluation des Tierwohls untersucht (MORMÈDE et al., 2007; BEERY und KAUFER, 2015). Eine erhöhte Ausschüttung von CRH und ACTH kann eine Fehlregulation der HPA-Achse verursachen. Als Folge bilden sich erhöhte Glucocorticoidspiegel im Körper. Bei Humanpatienten mit Depressionen wurden erhöhte Glucocorticoidspiegel festgestellt (PRICE et al., 1997). Auch bei Tieren nach einem *Status Epilepticus* (SE) konnten erhöhte Konzentrationen des Corticosterons im Plasma nachgewiesen werden (MAZARATI et al., 2009). Allerdings ist auch die Konzentration des Corticosterons als biochemischer Parameter vorsichtig zu interpretieren. So kann die Ursache für Veränderungen der Corticosteronkonzentration sowohl positiver (Eustress) als auch negativer (Distress) Stress sein (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2008).

## 2. 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor

### 2.1. Allgemeines

Schon Ende der 1950er Jahre isolierten RAPPORT et al. (1948) Serotonin aus Rinderserum und diskutierten dessen mögliche Rolle als Vasokonstriktor. Das Amin befindet sich zu 90% im Gastrointestinaltrakt (FINK und VOIGT, 2016). Es kommt dort hauptsächlich in den

enterochromaffinen Zellen der Mukosa des Darmes und den Thrombozyten vor. Diese nehmen das Serotonin bei der Passage der intestinalen Blutgefäße auf (FEUERSTEIN und DIENER, 2013). Ein verhältnismäßig geringer Anteil des Serotonins befindet sich in den Neuronen des zentralen Nervensystems. Serotonin kann die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren. Im Gehirn sind die serotonergen Neurone in den Raphe-Kernen lokalisiert, in welchen sich die Tryptophanhydroxylase-2 befindet, die für die Synthese von Serotonin notwendig ist (JACOBS und AZMITIA, 1992; STARKE, 2013; ALBERT et al., 2014). Die Synthese von Serotonin erfolgt aus der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan (AZMITIA et al., 1996). Die Syntheseleistung ist bei Säugetieren an die Verfügbarkeit der essentiellen Aminosäure gekoppelt und kann durch eine Mehraufnahme von Tryptophan mit der Nahrung gesteigert werden. Darüber hinaus ist, aufgrund der Konkurrenz um die Transporter, die Aufnahme von Tryptophan in das Gehirn vom Vorkommen anderer Aminosäuren abhängig (CRYAN und LEONARD, 2000). Auch die Verfügbarkeit des zytoplasmatischen Enzyms Tryptophanhydroxylase-2 im Gehirn beeinflusst die Syntheseleistung (WALTHER et al., 2003; ZHANG et al., 2004). Mittels der Tryptophanhydroxylase-2 wird L-Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan hydroxyliert. Im folgenden Schritt decarboxyliert die aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase 5-Hydroxytryptophan zu 5-Hydroxytryptamin (5-HT), welches auch als Serotonin bezeichnet wird. Anschließend erfolgt die Aufnahme des polaren Moleküls in Speichervesikel mithilfe eines Monoamintransporters (DAHLSTRÖM und FUXE, 1964; JACOBS und AZMITIA, 1992; STARKE, 2013; FINK und VOIGT, 2016). Nach der Ausschüttung von Serotonin in den synaptischen Spalt wird das Amin durch den Serotonin-Transporter zurück in das präsynaptische Neuron transportiert und wieder in Vesikel aufgenommen (HOLMES, 2008). Alternativ kann auch der Abbau des Serotonins zum Hauptendprodukt des Harns, der 5-Hydroxyindolessigsäure, erfolgen (FEUERSTEIN und DIENER, 2013; STARKE, 2013; FINK und VOIGT, 2016).

Zum heutigen Zeitpunkt sind zahlreiche Funktionen von Serotonin bekannt. Das Amin ist an der Regulation von Stress, Angst und Sexualverhalten beteiligt. Darüber hinaus hat Serotonin einen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme sowie das Schlaf- und Lernverhalten (GRAEFF et al., 1996; SMYTHIES, 2005; SHARP et al., 2007; FINK und VOIGT, 2016).

Weiterhin ist Serotonin Substrat für die Melaninsynthese (FINK und VOIGT, 2016).

Pathologische Veränderungen des Serotoninspiegels sind mit zahlreichen Krankheitsbildern assoziiert. Schon in den 1970er Jahren formulierte COPPEN (1967) die

Serotoninhypothese, nach welcher der Serotoninspiegel maßgeblich an der Entstehung von Depressionen beteiligt ist. Die Beteiligung von Serotonin am Krankheitsbild der Depression wird auch heute noch diskutiert und die Erhöhung des Serotoninspiegels therapeutisch genutzt (STARKE, 2013). Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (Abk. SSRI von engl. *selective serotonin reuptake inhibitor*) erhöhen durch selektives Blockieren von Transportern die Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt (SÁNCHEZ und HYTTEL, 1999; XIE et al., 2019). Neben Depressionen werden weitere neurologische und neuropsychiatrische Erkrankungen, wie Parkinson, Alzheimer, Autismus, Schizophrenie sowie Angst- und Verhaltensstörungen, mit Fehlfunktionen des serotonergen Systems in Zusammenhang gebracht (SCHAIN und FREEDMAN, 1961; AKHONDZADEH, 2001; LAI et al., 2003; CLARKE et al., 2004; HOLMES, 2008; DAYAN und HUYS, 2009; HUOT et al., 2011). Allerdings sind die vielfältigen Funktionen des serotonergen Systems auch bis zum heutigen Zeitpunkt nicht vollends verstanden (NAKAMURA und WONG-LIN, 2014). Die Vielzahl dieser, zum Teil sogar konträren, Funktionen wird den verschiedenen, bekannten 5-HT-Rezeptoren zugeschrieben. Dazu zählen 5-HT<sub>1-7</sub> mit ihren dazugehörigen Subtypen (NICHOLS und NICHOLS, 2008; POPOVA und NAUMENKO, 2013; NAKAMURA und WONG-LIN, 2014).

Die Serotonin-Rezeptoren stellen zum heutigen Zeitpunkt die größte und eine der phylogenetisch ältesten Familie der Neurotransmitterrezeptoren dar (NICHOLS und NICHOLS, 2008; FEUERSTEIN und DIENER, 2013). Während GADDUM und PICARELLI (1957) noch von zwei Serotoninrezeptorarten ausgingen, konnte mithilfe spezifischer Liganden eine Vielzahl von Subtypen des Serotonin-Rezeptors nachgewiesen werden (RAYMOND et al., 1999). Die Klassifikation ermittelte seinerzeit drei Subtypen, welche drei Familien zugeordnet wurden (BRADLEY et al., 1986). Nach einem Vorschlag von HUMPHREY et al. (1993) erfolgte die Charakterisierung der Rezeptoren von HOYER et al. (1994) (*International Union of Pharmacology*) anhand von molekularem Aufbau, Signaltransduktionsmechanismen und dem Bindungsverhalten zu Agonisten und Antagonisten. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten durch die Weiterentwicklung der Nachweismethoden, sieben Familien mit 16 Subtypen klassifiziert werden. Dabei ist der Hauptteil der Rezeptoren G-Protein-gekoppelt und nur der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ist ein ionotroper Rezeptor (SAUDOU und HEN, 1994; BARNES und SHARP, 1999; ALBERT und TIBERI, 2001; RAYMOND et al., 2001; FINK und VOIGT, 2016).

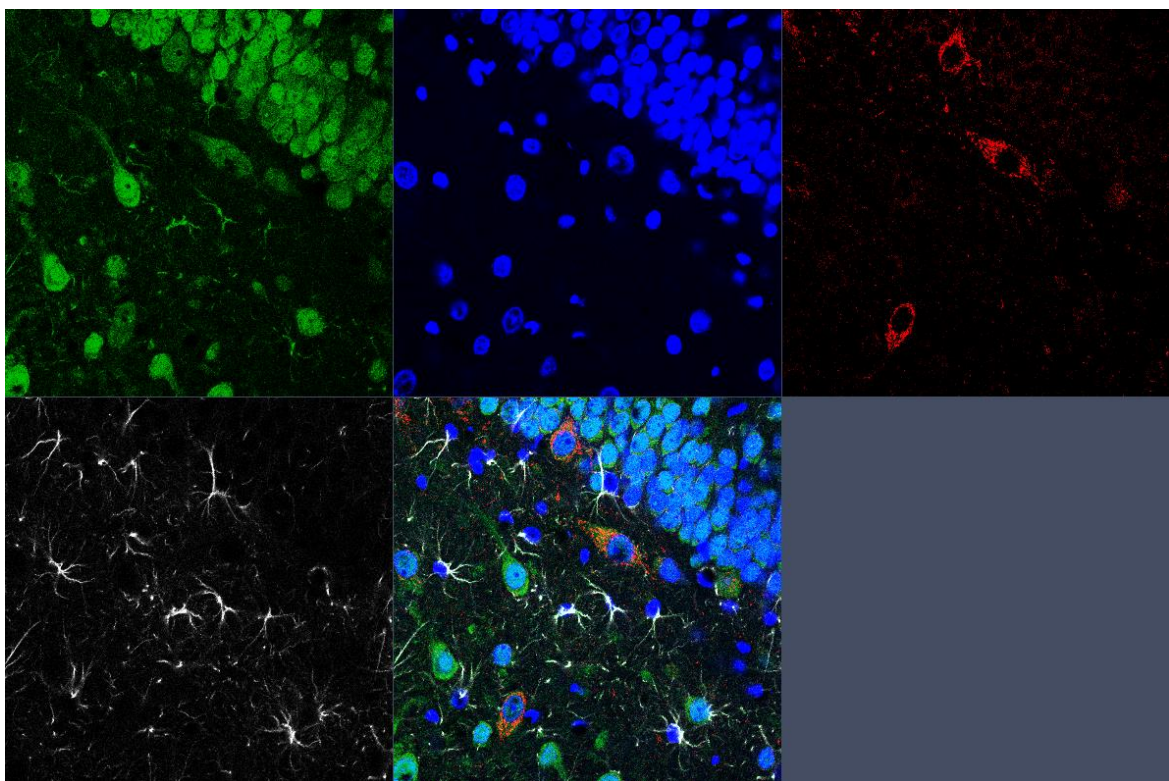
Der 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor 1A (5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor) ist der erste vollständig sequenzierte Serotonin-Rezeptor. Der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor besteht aus 421 (Maus) beziehungsweise 422 (Mensch, Ratte) Aminosäuren (FUJIWARA et al., 1990; STAM et al., 1992; CHAREST et al., 1993; BARNES und SHARP, 1999; RAYMOND et al., 1999). Dabei sind die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren bei Mensch und Ratte zu 88% homolog (FUJIWARA et al., 1990). Aufgrund seines prä- und postsynaptischen Vorkommens, der Relevanz für die serotonerge Neurotransmission sowie der Verfügbarkeit selektiver Agonisten und Antagonisten, ist er der am meisten erforschte Rezeptor innerhalb der Serotonin-Rezeptorfamilie (PEDIGO et al., 1981; POMPEIANO et al., 1992; POPOVA und NAUMENKO, 2013; FINK und VOIGT, 2016; CARHART-HARRIS und NUTT, 2017; ALBERT und VAHID-ANSARI, 2019). Als G-Protein gekoppelter Rezeptor besteht er aus sieben Transmembrandomänen, welche über jeweils drei hydrophile Schleifen intra- und extrazellulär verbunden werden (ZIFA und FILLION, 1992; RAYMOND et al., 1999; ALBERT und TIBERI, 2001; RAYMOND et al., 2001).

## 2.2. Lokalisation

Der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor ist in den Raphe-Kernen sowie deren serotonergen Projektionsgebieten lokalisiert. Zu letzteren zählen *Cortex*, *Septum*, *Amygdala*, *Hippocampus* und *Hypothalamus* (HOYER et al., 1994; KNAPP et al., 1998; LESCH und GUTKNECHT, 2004; SHARP et al., 2007). Bei den genannten Gebieten handelt es sich um Teile des limbischen Systems (BARNES und SHARP, 1999; RAJMOHAN und MOHANDAS, 2007). Dieser von MACLEAN (1952) geprägte Begriff, bezeichnet anatomische Strukturen, welche funktionell mit emotionalem Verhalten in Verbindung gebracht werden. Zu den vielfältigen Funktionen des limbischen Systems zählen darüber hinaus Schlaf-, Erinnerungs-, Motivations- und Sexualverhalten (RAJMOHAN und MOHANDAS, 2007). Wegen des vermehrten Vorkommens des Rezeptors im limbischen System kann angenommen werden, dass der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor diese Funktionen beeinflusst (PALCHAUDHURI und FLÜGGE, 2005).

Der Name *Hippocampus* leitet sich aus dem griechischen für Seepferdchen ab und hat seinen Ursprung in der Ähnlichkeit mit der anatomischen Form im Gehirn des Menschen. Die Struktur ist tief im medialen Temporallappen lokalisiert. Beim Nager ist der *Hippocampus* verhältnismäßig groß, hat eine nierenartige Form und befindet sich direkt

unterhalb der Großhirnrinde (RAJMOHAN und MOHANDAS, 2007; KNIERIM, 2015). Bestandteile des *Hippocampus* sind das Ammonshorn (Abk. CA von lat. *Cornu ammonis*) mit den Bestandteilen CA1 bis 4, der *Gyrus dentatus* (GD) und das *Subiculum* (SUB). Das Ammonshorn besteht aus dem *Stratum pyramidale* (Pyramidenzellschicht) und jeweils angrenzend das *Stratum oriens* (Korbzellschicht) und *Stratum radiatum* (Strahlenschicht). Der GD besteht aus dem *Hilus* (Hil) im Inneren der Struktur, dem *Stratum granulare* (Körnerzellschicht) und dem *Stratum moleculare* (Molekularzellschicht) (PAXINOS und WATSON, 2007). Funktionell projiziert der 1) entorhinale *Cortex* in den GD, 2) der GD in die CA3-Region und 3) die CA3-Region wiederum in die CA1-Region. Diese drei Schritte werden auch als trisynaptische Schleife bezeichnet (KNIERIM, 2015).



**Abbildung 1:** Exemplarische Darstellung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im *Hippocampus* (*Hilus* und angrenzender *Gyrus dentatus*) der Ratte.

Immunhistochemische Färbung von Hirngewebe einer Ratte: Grün – neuronale Kerne (NeuN), Blau – DNA der Zellen (DAPI), Rot – 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, Weiß – Astrozyten (GFAP) (eigene Abbildung).

Die visuelle Darstellung des Rezeptors erfolgte mit verschiedenen Methoden, wobei Autoradiografie und In-Situ-Hybridisierung häufig genutzt wurden.

Die **Autoradiografie** beschreibt eine Methode, bei der die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorbindung mithilfe eines selektiven Rezeptor-Agonisten, wie zum Beispiel 8-hydroxy-2-[di-N-propylamino-<sup>3</sup>H]tetralin ([<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT), dargestellt werden kann. Die Autoradiogramme

werden unter Verwendung mikrodensitometrischer Analysemethoden mit einem Lichtmikroskop ausgewertet (MARCINKIEWICZ et al., 1984; PAZOS und PALACIOS, 1985; VERGÉ et al., 1986; KUNG et al., 1995). Mithilfe verschiedener Liganden konnte eine hohe Rezeptordichte in den Raphe-Kernen, der *Amygdala*, dem entorhinalen *Cortex*, dem dorsolateralen *Septum* und dem *Hippocampus* (vor allem in GD, CA1 und 3), nachgewiesen werden (DESHMUKH et al., 1983; MARCINKIEWICZ et al., 1984; PAZOS und PALACIOS, 1985; VERGÉ et al., 1986; KUNG et al., 1995).

Anstelle eines Liganden können auch Antikörper zur Darstellung von Rezeptoren verwendet werden (**Immunoautoradiografie**). EL MESTIKAWY et al. (1990) konnten so eine Rezeptorexpression in *Septum* und *Hippocampus* nachweisen, welche der [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT-Expression ähnlich war. Die von EL MESTIKAWY et al. (1990) beschriebene Methode zur Gewinnung polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, kann außerdem zur **immunohistochemischen Darstellung** des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors verwendet werden. So konnten KIA et al. (1996b) ebenfalls eine hohe Rezeptordichte in limbischen Arealen, insbesondere dem lateralen *Septum*, der CA1- und GD-Bereiche des *Hippocampus* sowie frontalem und entorhinalen *Cortex* darstellen.

Die **In-Situ-Hybridisierung** eignet sich als Nachweismethode der Expression der Boten-RNA (Abk. mRNA von engl. *messenger RNA*). Eine Kombination mit autoradiografischen Methoden eignet sich zur Visualisierung (POMPEIANO et al., 1992). Mithilfe dieser Methode konnte der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor in den dorsalen Raphe-Kernen, in *Septum* und *Hippocampus* und dort explizit in den Neuronen der CA1-Region sowie im *Stratum granulare* des GD nachgewiesen werden (POMPEIANO et al., 1992; BURNET et al., 1995; PALCHAUDHURI und FLÜGGE, 2005).

Mithilfe von **Elektronenmikroskopie** können Informationen über die Verteilung der Rezeptoren auf Zellebene gewonnen werden. Dort befindet sich der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, ungleichmäßig verteilt in der Plasmamembran der Zellkörper und Dendriten (KIA et al., 1996a; KIA et al., 1996b; RIAD et al., 2000). Sowohl WHITAKER-AZMITIA et al. (1993) als auch AZMITIA et al. (1996) diskutierten das Vorkommen des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in den Gliazellen, vor allem in den Astrozyten. KIA et al. (1996a) nutzten spezifische Antikörper zum Nachweis des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors und konnten ein Vorkommen in den Gliazellen nachweisen, beschrieben dies aber als verhältnismäßig gering im Vergleich zu dem Vorkommen im somato-dendritischen Abschnitt. RIAD et al. (2000) konnten in hippocampalen Subregionen kein Signal für den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor in den Astrozyten

detektieren. In einer kürzlich veröffentlichten Publikation beschrieben die Autoren der *International Union of Basic and Clinical Pharmacology*, dass kontroverse Daten zur Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in den Gliazellen existieren (BARNES et al., 2021). Es sind zwei Subtypen des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors bekannt: 1) Autorezeptoren und 2) Heterorezeptoren. Beide sind hauptsächlich auf Dendriten und Zellkörpern von 1) 5-HT und 2) nicht-5-HT-Neuronen lokalisiert (VERGÉ et al., 1986; POMPEIANO et al., 1992; CLARKE et al., 1996; RIAD et al., 2000; ALBERT und TIBERI, 2001; ALBERT und VAHID-ANSARI, 2019). Die Autorezeptoren befinden sich hauptsächlich in den dorsalen und medianen Raphe-Kernen, die Heterorezeptoren in den corticalen und limbischen Regionen des Gehirns (JACOBS und AZMITIA, 1992; BURNET et al., 1995; PALCHAUDHURI und FLÜGGE, 2005; POPOVA und NAUMENKO, 2013; ALBERT und VAHID-ANSARI, 2019).

### **2.3. Funktionelle Bedeutung**

Der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor ist ein ausgesprochen wichtiger Bestandteil der serotonergen Neurotransmission im zentralen Nervensystem (ZNS) (SAVITZ et al., 2009).

Veränderungen des Serotoninspiegels haben Einfluss auf die Thermoregulation sowie das Sexual-, Aggressions-, Angst-, Stress- und Nahrungsaufnahmeverhalten (SHARP et al., 2007; POPOVA und NAUMENKO, 2013). Auch die lokomotorische Aktivität und das Erkundungsverhalten können beeinflusst werden (PARKS et al., 1998; RAMBOZ et al., 1998; CAREY et al., 2008). Darüber hinaus wurde ein Einfluss der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte auf das Immunsystem diskutiert (IKEN et al., 1995; IDOVA und DAVYDOVA, 2010).

Die Aktivierung des Membran-Rezeptors erfolgt durch den Botenstoff Serotonin oder einen Agonisten. Dieser Reiz führt zur Transformation des gekoppelten G-Proteins, wobei verschiedene Untereinheiten des G-Proteins mit dem Rezeptor interagieren können. Dadurch kommt es zur Hemmung der Adenylatzyklase, wodurch der Spiegel des cyclischen Adenosinmonophosphates (cAMP) absinkt (DE VIVO und MAAYANI, 1986; HOYER et al., 1994; RAYMOND et al., 1999; ALBERT und TIBERI, 2001; RAYMOND et al., 2001; LIN et al., 2002; GHARIB et al., 2018). Außerdem kommt es zur Einschränkung der Proteinkinase-A-Aktivität und reduzierter Öffnung von Kalziumkanälen (ALBERT und VAHID-ANSARI, 2019). Die verschlossenen Kalziumkanäle bewirken eine Hyperpolarisation und reduzierte Erregbarkeit der Nervenzelle (MAUK et al., 1988; GHARIB et al., 2018). Eine Untereinheit des G-Proteins kann außerdem nach innen

gerichtete Kaliumkanäle öffnen (Abk. GIRK von engl. *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel*) (AGHAJANIAN und LAKOSKI, 1984; CLARKE et al., 1996; ALBERT und TIBERI, 2001; ALBERT und VAHID-ANSARI, 2019). Die beschriebenen Mechanismen reduzieren die Serotoninausschüttung im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus. DOHERTY und PICKEL (2001) diskutierten den Einfluss des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors auf GABAerge-Neurone. PALCHAUDHURI und FLÜGGE (2005) konnten mithilfe von Antikörpern gegen den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor und GABAerge Neurone keinen Nachweis einer Kolo-kalisation der beiden Strukturen erbringen. SANTANA et al. (2004) zeigten wiederum eine Expression der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-mRNA in den GABAergen Interneuronen. Zwischen den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren gibt es funktionell erhebliche Unterschiede (RAYMOND et al., 1999). Parado-xerweise kann es neben der Hemmung auch zu einer 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-vermittelten Aktivierung der Adenylatzyklase kommen. In einer Mikrodialysestudie konnten CADOGAN et al. (1994) unter Verwendung eines 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten einen signifikanten Anstieg der extrazellulären cAMP-Konzentration feststellen. Auch MARKSTEIN et al. (1986) beschrieben die Aktivierung der Adenylatzyklase im *Hippocampus* von Ratten. Der Grund für diese komplett entgegengesetzte Wirkung lässt sich unter anderem mit der Vielzahl an Unterklassen der Adenylatzyklase erklären (RAYMOND et al., 1999). Dabei ist die Adenylatzyklase vom Typ II von besonderer Relevanz (ALBERT et al., 1999).

Die vielfältige Wirkung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors scheint sich darüber hinaus regional zu unterscheiden, und auch abhängig vom Rezeptortyp zu sein (CLARKE et al., 1996; LÜSCHER et al., 1997; FINK und VOIGT, 2016). Die Rezeptortypen unterscheiden sich in der Art des assoziierten G-Proteins (GARCIA-GARCIA et al., 2014). Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben existieren zwei Subtypen des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors, die Auto- und Heterorezeptoren.

Die 5-HT<sub>1A</sub>-**Autorezeptoren** werden durch Serotonin negativ reguliert. Durch die Freisetzung von Serotonin in den Raphe-Kernen erfolgt eine Aktivierung der 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren, welche über die bereits zuvor erklärten Mechanismen, eine hyperpolarisierende Wirkung auf die 5-HT-Neurone haben. Die Erregbarkeit der 5-HT-Neurone wird herabgesetzt und die Serotoninausschüttung folglich reduziert (INNIS und AGHAJANIAN, 1987; LANFUMEY et al., 1991; HOYER et al., 1994; BLIER et al., 1997; BARNES und SHARP, 1999; SHARP et al., 2007; POPOVA und NAUMENKO, 2013). Die



Funktion der 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptors scheint dabei von weiteren 5-HT-Rezeptoren unterstützt zu werden (STAMFORD et al., 2000; THOMAS et al., 2006).

Die Freisetzung von Serotonin in den Zielregionen aktiviert verschiedene Heterorezeptoren, darunter auch den 5-HT<sub>1A</sub>-**Heterorezeptor**. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind dieselben, wie die des 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptors. Auch der Heterorezeptor ist G-Protein gekoppelt und wird durch das Binden des Signalmoleküls aktiviert. Es kommt zur Hemmung der Adenylatzyklase, der cAMP-Spiegel wird folglich reduziert, die Öffnung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle erschwert und die neuronale Erregbarkeit herabgesetzt (RIAD et al., 2000). Die Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors vermittelt darüber hinaus verschiedene Reaktionen und Effekte. Der 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptor scheint einen Einfluss auf die Nervenzelldifferenzierung im juvenilen Gehirn zu haben (RIAD et al., 1994; YAN et al., 1997; MOGHA et al., 2012). Ein weiterer Subtyp des G-Proteins reguliert N-Nitrosodimethylamin und *Extracellular-signal Regulated Kinase*-Untereinheiten hoch und trägt somit zur Neurogenese bei (WHITAKER-AZMITIA et al., 1993; ALBERT und VAHID-ANSARI, 2019). Der Heterorezeptor hat darüber hinaus einen hemmenden Einfluss auf die Entstehung von Depressionen und Angst (ALBERT und VAHID-ANSARI, 2019). Zusammenfassend ist der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor in seiner funktionellen Bedeutung ausgesprochen vielfältig. Als Autorezeptor hat er einen hemmenden Einfluss auf die Serotoninausschüttung. In seiner Rolle als Heterorezeptor kann er spezifische, lokalisierte Antworten auf die Serotoninausschüttung modifizieren (ALBERT, 2012; ALBERT und VAHID-ANSARI, 2019). Dabei kann sich die Rezeptorantwort verändern und sich an externe Einflüsse wie beispielsweise Stress oder Medikamente anpassen (HALEEM et al., 2002).

#### **2.4. 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor als Zielstruktur pharmakologischer Therapieansätze**

Bereits in den 1960er Jahren diskutierten WOOLLEY und SHAW (1954) die Anwendung von 5-HT zur Therapie von psychischen Erkrankungen beim Menschen. Patienten mit Depressionen zeigen häufig Veränderungen des serotonergen Systems (BOLDRINI et al., 2008; SAVITZ et al., 2009; KAUFMAN et al., 2016). Dabei wurden vor allem niedrige Serotoninspiegel und eine erhöhte 5-HT-Rezeptorexpression festgestellt, welche auf den fehlenden Feedbackmechanismus durch den Serotoninmangel zurückzuführen sein kann (STOCKMEIER et al., 1998; XIE et al., 2019). Eine protektive Eigenschaft des 5-HT<sub>1A</sub>-

Rezeptors wurde in diesem Kontext diskutiert (GOODFELLOW et al., 2009). Die vielfältigen Veränderungen des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors wurden in verschiedenen Tiermodellen untersucht (SHARP et al., 2007). Aufgrund seines regulierenden Einflusses auf die Erregbarkeit der Nervenzellen wird der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor auch im Kontext von Stress und der Epilepsie diskutiert (CARHART-HARRIS und NUTT, 2017). Auf diese beiden Aspekte wird im nächsten Abschnitt (siehe [5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression bei Epilepsie und Stress](#)) genauer eingegangen.

Die Assoziation von neuropsychiatrischen Erkrankungen mit dem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor lenkte das Augenmerk auf die Verwendung von Agonisten und Antagonisten des Rezeptors (EISON und TEMPLE, 1986; BECH, 1993; ARGYROPOULOS et al., 2004). Der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor hat eine hohe Affinität zu 5-HT, aber auch andere Substanzen, wie beispielsweise [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT, Buspiron und Ipsapiron, können nachweislich an den Rezeptor binden (RAYMOND et al., 1999). Diese Substanzen konnten zum einen für den Nachweis eines veränderten Bindungsverhaltens bei erkrankten Patienten und zum anderen zur Therapie eingesetzt werden. Eine Vielzahl an Wirkungen wurde dokumentiert.

5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor Agonisten	5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor Antagonisten
5-HT	[ <sup>18</sup> F]MPPF
Buspiron	WAY-100635
[ <sup>3</sup> H]8-OH-DPAT	NAD-299
Ipsapiron (partieller Agonist)	Sipiperon
	Propranolol

**Tabelle 1: Übersicht ausgewählter 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor Agonisten und Antagonisten.**

Der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonist Buspiron wirkt angstlösend (ALBERT und VAHID-ANSARI, 2019). Dies konnte unter anderem im EPM-Test bei Mäusen und auch in einem Stressmodell bei Ratten nachgewiesen werden. Die Tiere zeigten unter Buspironwirkung weniger angstassoziiertes Verhalten (LEE und RODGERS, 1991; SAMAD et al., 2005). Die anxiolytische Wirkung von Buspiron kann durch Einsatz von Naloxon verstärkt werden, währenddessen Naloxon allein keinen solchen Effekt zeigt (BELZUNG und AGMO, 1997; NUNES-DE-SOUZA et al., 2000). Buspiron wird in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzt. Bei Tieren dient es dabei der Therapie von Verhaltensstörungen (FINK und VOIGT, 2016).

Auch [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT konnte nachweislich das angstassoziierte Verhalten reduzieren (NUNES-DE-SOUZA et al., 2000). Darüber hinaus wurden Effekte auf die Nahrungsaufnahme (DOURISH et al., 1985) und das (Sexual-)verhalten (AHLENIUS et al., 1981; MILLAN et al., 1991) beobachtet. Auch die Temperaturregulation wird beeinflusst. Tiere unter [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT-Einfluss können eine Hypothermie entwickeln (GOODWIN et al., 1985; BALCELLS-OLIVERO et al., 1998). Eine Kombination von [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT mit dem Antagonisten Spiperon kann die Wirkung des Agonisten komplett aufheben (PEÑA-RANGEL et al., 1999). Auf Zellebene scheint [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT einen regulierenden Einfluss auf den Autorezeptor zu haben und somit die Serotoninsynthese zu reduzieren (HJORTH et al., 1982).

Ein Problem, welches sich bei der Verwendung der Liganden ergibt, ist die mangelnde Spezifität (ALBERT und VAHID-ANSARI, 2019). Zwar binden die Agonisten und Antagonisten hauptsächlich an den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor im ZNS (MIDDLEMISS und FOZARD, 1983; HOYER et al., 1994), allerdings unterscheiden sie dabei nicht zwischen Auto- und Heterorezeptoren (ALBERT und VAHID-ANSARI, 2019). Nachdem erkannt wurde, wie unterschiedlich sich die beiden Rezeptorsubtypen verhalten (siehe oben [Funktionelle Bedeutung](#)) wurden spezifische Heterorezeptor-Liganden, wie zum Beispiel F15599, zu therapeutischen Zwecken entwickelt (ASSIÉ et al., 2010; LLADÓ-PELFORT et al., 2010; JASTRZĘBSKA-WIĘSEK et al., 2018; SNIECIKOWSKA et al., 2019).

Verschiedene Mechanismen regulieren die Expression von Rezeptoren. Agonisten und Antagonisten können sowohl zur Neusynthese von Rezeptoren als auch zur Reduktion der Zahl der Rezeptoren an der Zelloberfläche durch verschiedene Mechanismen führen. Durch die wiederholte Stimulation des Rezeptors kann es darüber hinaus zur Desensibilisierung kommen (FINK und FREY, 2016). Dieser Begriff bezeichnet die akute, reduzierte Signalweiterleitung nach Einwirkung des endogenen Liganden oder eines anderen Rezeptor-Agonisten. Bei längerfristiger Einwirkung entsteht eine Toleranz (RAYMOND et al., 1999; SCHÖNEBERG, 2008). Nach mehrfacher Applikation von 5-HT konnten sowohl GOZLAN et al. (1983), als auch VERGÉ et al. (1986) eine Reduktion des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Bindungsverhaltens beobachten. Die Autoren beschrieben in diesem Kontext eine Degeneration der serotonergen Neurone in den Raphe-Kernen des Gehirns. Anpassungen der Rezeptorantwort wurden von HALEEM et al. (2002) auch als natürlicher Mechanismus der Stressantwort diskutiert. SHARP und HJORTH (1990) zeigten in einer Mikrodialysestudie reduzierte, extrazelluläre 5-HT-Konzentrationen nach der Gabe des

Rezeptor-Agonisten [ $^3\text{H}$ ]8-OH-DPAT. Die chronische Anwendung des Agonisten führt außerdem zu einer reduzierten Genexpression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors (POPOVA et al., 2010; POPOVA und NAUMENKO, 2013). RIAD et al. (2001) konnten darstellen, dass es auch hier Unterschiede zwischen den Subtypen gibt. Eine Reduktion der Darstellung des Rezeptors mithilfe des 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten, konnte nur für Auto-, nicht aber für Heterorezeptoren nachgewiesen werden. Die Desensibilisierung kann aber auch therapeutisch genutzt werden. Bei Patienten mit Depressionen können SSRIs die 5-HT-Defizite ausgleichen (SHARP et al., 2007; XIE et al., 2019). Der SSRI blockiert die Wiederaufnahme von 5-HT aus dem synaptischen Spalt. Allerdings kommt es erst mit einiger Verzögerung zur Erhöhung der 5-HT-Spiegel. Durch die Blockierung der 5-HT-Kaskade, erhöht sich die 5-HT-Konzentration in den Raphe-Kernen. Die Autorezeptoren werden aufgrund des negativen Feedbackmechanismus gehemmt. Aus diesem Grund entsteht kurzfristig eine Reduktion des verfügbaren 5-HTs (ARTIGAS, 2013). Erst die längerfristige Behandlung mit dem SSRI führt vermutlich zur Desensibilisierung des Autorezeptors, wodurch sich die Erregbarkeit der Neurone und somit die 5-HT-Ausschüttung normalisiert. Dieser Effekt scheint einen positiven Einfluss auf die Wirksamkeit der SSRIs zu haben (ALBERT und LEMONDE, 2004; CEGLIA et al., 2004; SNIĘCIKOWSKA et al., 2019). Alternativ zu dieser Erklärung wurde von MALBERG et al. (2000) eine verstärkende Wirkung der chronischen Applikation von SSRIs auf die Neurogenese diskutiert. Außerdem konnte durch die Kombination mit einem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antagonisten die Wirkung der SSRIs verstärkt werden. Dies ist möglicherweise auf die Inhibition der Autorezeptoren und somit Vermeidung des initialen Abfalls der 5-HT-Konzentration zurückzuführen (BLIER et al., 1997).

Ein zusätzlicher Aspekt, welcher die Pharmakotherapie des serotonergen Systems beeinflusst, ist das sogenannte „Serotonin-Syndrom“. Dieses entsteht durch die Verwendung von Substanzen, welche Einfluss auf das serotonerge System haben. So kann das Serotonin-Syndrom beispielsweise durch hohe Dosierungen von [ $^3\text{H}$ ]8-OH-DPAT ausgelöst werden (DOURISH et al., 1985). Das Serotonin-Syndrom ist beim Tier durch Veränderungen der Körperhaltung und Stereotypen, wie Kopfweben oder Paddelbewegungen der Gliedmaßen, gekennzeichnet (HJORTH et al., 1982). Beim Menschen äußert sich das Syndrom in Form von milden Symptomen wie Tachykardie, Zittern und Tremor bis hin zu lebensbedrohlichen Symptomen wie Hyperthermie, Blutdruckabfall und Delirium (BOYER und SHANNON, 2005; VOLPI-ABADIE et al., 2013).

Auch Halluzinationen werden in diesem Kontext beschrieben (HJORTH et al., 1982). Das Syndrom wurde als Indikator der 5-HT-Rezeptoraktivierung identifiziert (ARVIDSSON et al., 1981). Dabei spielt vor allem der 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor eine Rolle, aber auch der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor ist bei der Entstehung des Syndroms involviert (LUCKI et al., 1984; VOLPI-ABADIE et al., 2013).

## 2.5. 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression bei Stress und Epilepsie

Biomarker sind messbare Parameter welche für die Diagnose, die Überwachung und die Prognose von Erkrankungen genutzt werden können (ARONSON und FERNER, 2017). Die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression wurde als Biomarker-Kandidat bei Untersuchungen zu Stress und Epilepsie mithilfe von verschiedenen Methoden der Darstellung, wie beispielsweise der Immunhistochemie (IHC), der Autoradiografie und dem PET-Scan, evaluiert. LOWRY (2002) stellte dar, dass bei stressassoziierten Erkrankungen vorrangig die Projektionsgebiete der Raphe-Kerne des Gehirns involviert sind, in welchen sich die serotonergen Neurone befinden. CHAOULOFF et al. (1999) konnten nachweisen, dass sich bei Humanpatienten mit stressassoziierten Erkrankungen Veränderungen der serotonergen Neurotransmission zeigten. Diese und weitere Studien lenkten das Interesse auf die Erforschung des Zusammenhangs zwischen Stress und dem serotonergen System.

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten, **Stress** experimentell bei Tieren auszulösen. Dazu zählen unter anderem Auslösung von sozialem Stress, Stress durch forcierte Immobilisation oder fehlende Fluchtmöglichkeiten (LEWIS et al., 2020). Der *Restraint*-Stress-Test bezeichnet ein Tiermodell, bei denen die Tiere durch eine forcierte Immobilisation gestresst werden. Insbesondere bei Beutetieren, zu welchen auch die Nager zählen, kann so effektiv Stress ausgelöst werden (BONFILS et al., 1963). Der *Forced-Swim*-Test wurde ursprünglich von PORSOLT et al. (1977) zur Untersuchung der Wirkung von Antidepressiva in einem Mausmodell der Depression beschrieben. Bei diesem Test werden die Tiere für eine bestimmte Zeit in einen Zylinder mit Wasser ohne Auswegoption gegeben und das Verhalten der Tiere wird beobachtet. Ratten und Mäuse zeigen im *Forced-Swim*-Test unterschiedliche Verhaltensmuster. Darüber hinaus gibt es zahlreiche weitere Faktoren, wie zum Beispiel das Alter, das Geschlecht und das Gewicht, welche das Testergebnis

beeinflussen können (BOGDANOVA et al., 2013). Auch zur Auslösung von Stress im Tiermodell kann der *Forced-Swim*-Test verwendet werden.

RAGHUPATHI und MCGONIGLE (1997) untersuchten den Einfluss von Stressoren auf die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression. Im *Restraint*-Stress-Test wurde in dieser Studie ein reduziertes Bindungsverhalten von Agonisten und Antagonisten in Subregionen des *Hippocampus* von Ratten gezeigt. Im *Forced-Swim*-Test stellten die Autoren eine erhöhte Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT fest. In einer weiteren *Restraint*-Stress-Studie aktivierten LAARIS et al. (1997) den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor bei Ratten mithilfe des partiellen Agonisten Ipsapiron und führten elektrophysiologische Messungen durch. Auch der Corticosteronspiegel wurde bestimmt, welcher als Biomarker-Kandidat der Stressantwort gilt. Niedrige Autorezeptoraktivität wurde mit erhöhten Spiegeln von Corticosteron in Zusammenhang gebracht. Wie bereits unter [Parameter der Belastungseinschätzung](#) erwähnt, kann Stress Fehlregulationen der HPA-Achse verursachen (BEERY und KAUFER, 2015). Dabei scheint der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor einen Einfluss auf die HPA-Achse zu haben. PAN und GILBERT (1992) ermittelten in ihrer Studie eine erhöhte Sekretion von ACTH und Corticosteron im Gehirn von Ratten. Sie vermuteten als Ursache die Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors.

ZHOU et al. (2014) zeigten bei Ratten in einem *Restraint*-Stressmodell mithilfe immunhistochemischer Methoden, den positiven Einfluss der Gabe des Agonisten [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT auf die Stressantwort. Die Autoren schlussfolgerten, dass eine selektive Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors zur Therapie von stressassoziierten Erkrankungen, wie Angststörungen oder Depressionen, von Nutzen sein könnte.

SZEWCZYK et al. (2014) konnten sowohl reduzierte mRNA- als auch Proteinexpressionslevel des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors unter verschiedenen Stressoren, wie chronischem Stress und Trächtigkeit, nachweisen. In einer Autoradiografie-Studie zeigten FLÜGGE (1995) unter Verwendung von [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT ein reduziertes Bindungsverhalten des Agonisten in cortikalen und hippocampalen Gebieten bei Tieren, welche psychosozialen Stress ausgesetzt wurden. Dieser wurde durch die Konkurrenz von mehreren Tieren um ein zuvor unbekanntes Gebiet ausgelöst. Die Autoren vermuteten eine Desensibilisierung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren aufgrund von Stress. Wie bereits beschrieben kann der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor auf äußere Einflüsse reagieren und seine Reaktion dementsprechend anpassen. Diese unterscheidet sich bei Exposition gegenüber akuten und chronischen Stressoren. Selbst bei milden, aber langanhaltenden Stressoren zeigen

die Autorezeptoren eine Desensibilisierung. Darüber hinaus wird auch im *Hippocampus* die Antwort der Heterorezeptoren angepasst (GRAEFF et al., 1996; LANFUMEY et al., 1999). Chronischer Stress oder die Gabe von Glucocorticoiden führt zu einer Reduktion der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte (LEONARD, 2006). Interessanterweise zeigte sich in der Studie von LAARIS et al. (1997), dass eine erzwungene Immobilisation keine Aktivitätsunterschiede des Rezeptors zwischen den Gruppen verursacht – Stress, durch eine neue, unbekannte Umgebung hingegen schon. Die Autoren der beiden Studien schlussfolgerten, dass die Art und Dauer des Stressors einen Einfluss auf die Veränderung der Rezeptorexpression haben (LAARIS et al., 1997; RAGHUPATHI und MCGONIGLE, 1997). LEWIS et al. (2020) stellten in einem kürzlich veröffentlichten Übersichtsartikel einen Zusammenhang zwischen Typ und Dauer eines Traumas und der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression dar. Darüber hinaus merkten die Autoren an, dass auch unterschiedliche Zuchtlinien einen Einfluss auf die Studienergebnisse der Tiermodelle haben können.

In einer  $\mu$ PET-Studie nutzten JOVANOVIĆ et al. (2011) den Antagonisten [<sup>11</sup>C]WAY-100635 als Radioliganden zur Evaluation des Bindungspotentials an den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor *in vivo*. Das Bindungspotential ( $B_{nd}$ ) erfasst die Bindung des Radioliganden an die Zielstruktur. Das  $B_{nd}$  wird mithilfe einer Referenzregion, in welcher die Zielstruktur wenig bis gar nicht vorkommt, korrigiert (CHOI et al., 2014; DI LIBERTO et al., 2018). In chronisch gestressten Tieren wurde in dieser *In-vivo*-Studie eine reduzierte Bindung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Liganden im *Hippocampus* dokumentiert. Außerdem zeigten die Tiere unter dem Einfluss von Stress Modifikationen von Verhalten und Gedächtnisleistung (JOVANOVIĆ et al., 2011). In einer  $\mu$ PET-Studie unserer Arbeitsgruppe zeigten BUCHECKER et al. (2020) unter Verwendung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antagonisten [<sup>18</sup>F]MPPF in einem *Restraint*-Stressmodell bei Ratten wiederum eine Erhöhung des Bindungspotentials. Im Rahmen dieser Studie wurden die Tiere in drei Gruppen untersucht. Eine Gruppe wurde zwei Stressoren ausgesetzt, welche aus dem täglichen Transport in das Labor und der Immobilisation in einer Plastikröhre (*Restraint*) bestanden. Die zweite Gruppe erfuhr lediglich den Transport als Stressor. Die Kontrollgruppe wurde von keinem der beiden Stressoren beeinflusst. Dabei zeigten Tiere mit täglichem Transport in das Labor im *Hippocampus* eine erhöhtes Bindungspotential des Radioliganden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Autoren unterstrichen die Relevanz den durch die Handhabung ausgelösten Stress in einer  $\mu$ PET-Studie separat zu ermitteln, um die Ergebnisse richtig

interpretieren zu können. Weiterhin wurde in der Studie diskutiert, dass das erhöhte Bindungspotential des Radioliganden eine Folge der Reduktion der endogenen Serotoninkonzentration sein könnte. Eine reduzierte Konzentration des endogenen Liganden würde eine geringere Konkurrenz um die Bindungsstelle, und somit erleichterte Bindung des Radioliganden an den Rezeptor, bedeuten. Abschließend beschrieben die Autoren, dass die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als Biomarker-Kandidat zur Erforschung von Stress im Tiermodell auch zukünftig evaluiert werden sollte (BUHECKER et al., 2020).

**Epilepsie** ist nach wie vor eine Erkrankung mit hohem Forschungsbedarf. Die Erkrankung wird von der *International League Against Epilepsy* (ILAE) als eine Erkrankung des Gehirns mit einer anhaltenden Prädisposition für die Entwicklung von Anfällen definiert. Das Auftreten von mindestens einem Anfall ist die Grundvoraussetzung, um von Epilepsie sprechen zu können. Ein Anfall wird von der *ILAE* als Auftreten von Symptomen als Folge von exzessiver neuronaler Aktivität im Gehirn definiert (FISHER et al., 2005). Es wird zwischen verschiedenen Anfallsformen unterschieden, so zum Beispiel zwischen fokalen und generalisierten Anfällen. Ursächlich für die Entwicklung der Erkrankung Epilepsie können genetische und erworbene Faktoren sein (PITKÄNEN et al., 2015). Die Temporallappenepilepsie (TLE) stellt die häufigste Form der Epilepsie in der Humanmedizin dar. Eines der Hauptprobleme bei der Therapie dieser Erkrankung ist die Pharmakoresistenz (VAN VLIET et al., 2014; ENGEL und SALAMON, 2015). Nicht selten treten assoziiert mit der Epilepsie Begleiterkrankungen auf. Die Tatsache, dass die Prävalenz von psychiatrischen Komorbiditäten bei Humanpatienten mit Epilepsie erhöht ist, hat das Interesse am funktionellen Einfluss des 5-HT-Systems im epileptischen Gehirn erhöht (GILLIAM et al., 2003; KANNER, 2016; JOSEPHSON und JETTÉ, 2017). Dabei konnte ein hemmender Effekt des Amins auf die Anfallsfrequenz nachgewiesen werden (DE LA TORRE et al., 1970; PASINI et al., 1992; LU und GEAN, 1998). Die Erkrankung der Epilepsie verursacht zahlreiche zelluläre und molekulare Veränderungen im Gehirn der Patienten. Dazu zählen unter anderem Veränderungen von spannungsabhängigen Ionenkanälen (REMY und BECK, 2006). Wie bereits unter [Funktionelle Bedeutung](#) beschrieben, hat die Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors einen hyperpolarisierenden und hemmenden Effekt auf die neuronale Erregbarkeit (CARHART-HARRIS und NUTT, 2017). Bei Humanpatienten mit TLE wurde eine erhöhte 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression im *Hippocampus* beschrieben. In diesen Studien wurde Material verwendet, welches von



TLE-Patienten gewonnen wurde, die im Rahmen der Anfallskontrolle operativ behandelt wurden. PERNHORST et al. (2013) zeigten in ihrer Studie eine erhöhte Expression der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-mRNA bei TLE-Patienten. FONSECA et al. (2017) untersuchten ebenfalls Hirnmaterial von TLE-Patienten mithilfe einer semi-quantitativen Western-Blot-Analyse. Dabei konnte eine Korrelation zwischen einer erhöhten 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte im *Hippocampus* und der Anfallsdauer gezeigt werden.

Zahlreiche Studien haben den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor in Bezug auf seine Eignung als pharmakologische Zielstruktur in verschiedenen Anfalls- und Epilepsiemodellen in Nagern erforscht (JANUSZ und KLEINROK, 1989; GRAF et al., 2004; LÓPEZ-MERAZ et al., 2005; BAGDY et al., 2007; SAPA et al., 2014; GHARIB et al., 2018). Zu diesen Modellen zählen unter anderem Kindling- und Post-SE-Modelle. Im Kindling-Modell werden epileptische Anfälle wiederholt durch niedrig-dosierte elektrische oder chemische Stimulation ausgelöst. Sofern Routineprotokolle verwendet werden, treten im Kindling-Epilepsie-Modell keine spontanen Anfällen auf (GODDARD et al., 1969; DHIR, 2012). In Post-SE-Modellen wird ein SE durch prokonvulsiv wirkende Substanzen oder elektrische Stimulation induziert. Als Folge des epileptogenen Insults entwickeln die Tiere spontane Anfälle (BRANDT et al., 2003; CHEN und WASTERLAIN, 2006).

In einer Autoradiografie-Studie zeigten CLARK et al. (1993) eine erhöhte Bindung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT im GD in einem *Amygdala*-Kindling-Modell bei Ratten. Die stimulierten Tiere zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere Bindung des Agonisten. Dieses Ergebnis wurde in einer Studie von KALYNCHUK et al. (2006) bestätigt. Auch in dieser Studie zeigten die stimulierten Tiere eine erhöhte Bindung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Liganden im GD. Zusätzlich konnte die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression im GD mithilfe von In-Situ-Hybridisierung nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich darüber hinaus eine positive Korrelation zwischen der Rezeptorexpression und angstassoziertem Verhalten (KALYNCHUK et al., 2006). Auch CAGNOTTO et al. (1998) nutzten autoradiografische Methoden mithilfe von [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT in einem *Hippocampus*-Kindling-Modell bei Ratten. Eine erhöhte Bindung des Agonisten wurde in verschiedenen Subregionen des *Hippocampus* (CA1, CA3, GD, *Hilus*) in der gekindelten Gruppe beobachtet. Die Autoren der Studien schlussfolgerten, dass die erhöhte 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression im Zusammenhang mit einer Erhöhung der Anfallsempfindlichkeit als Folge der Anfälle stehen könnte (CLARK et al., 1993; CAGNOTTO et al., 1998; KALYNCHUK et al., 2006). PINEDA et al. (2011) untersuchten

mithilfe der Autoradiografie die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression in einem Post-SE-Modell bei Ratten. Der SE wurde mithilfe von Pilocarpin induziert. Dabei unterschieden die Autoren zwischen Auto- und Heterorezeptoren anhand der Lokalisation in den Raphe-Kernen und dem *Hippocampus*. Die Untersuchungen zeigten eine erhöhte Rezeptorexpression der Autorezeptoren und eine reduzierte Expression der Heterorezeptoren. Darüber hinaus korrelierte das depressionsassoziierte Verhalten der Tiere als Komorbidität der Epilepsie mit der reduzierten Heterorezeptorexpression.

Auch *in vivo* konnte das Bindungsverhalten an den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor in PET-Studien mithilfe von Radioliganden dargestellt werden. Bei Humanpatienten mit TLE stellten dabei eine Vielzahl von Studien eine reduzierte Bindung mit verschiedenen Liganden wie [<sup>18</sup>F]MPPF, [<sup>11</sup>C]WAY-100635 und [<sup>18</sup>F]FCWAY fest (TOCZEK et al., 2003; MERLET et al., 2004; SAVIC et al., 2004; ITO et al., 2007; DIDELOT et al., 2008; GIOVACCHINI et al., 2009; LIEW et al., 2009; THEODORE et al., 2012).

Aus diesen Ergebnissen folgerten THEODORE et al. (2012), dass das serotonerge System, insbesondere der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, Einfluss auf die Entstehung psychiatrischer Komorbiditäten wie den Gedächtnisverlust hat. Darüber hinaus diskutierten die Autoren, dass Unterschiede in der Empfindlichkeit der Radioliganden bezüglich der kompetitiven Hemmung der Bindung durch den endogenen Liganden 5-HT bestehen könnten. Diese möglicherweise unterschiedliche Sensitivität könnte Unterschiede der Ergebnisse des PET-Scans zwischen den Radioliganden erklären (THEODORE et al., 2012). Auch LOTHE et al. (2008) beschrieben im Rahmen ihrer Untersuchungen, dass das Bindungspotential zum einen von der Expression des Rezeptors und zum anderen der extrazellulären Serotoninkonzentration abhängig ist. Allerdings zeigten LOTHE et al. (2008) ein erhöhtes Bindungsverhalten des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antagonisten [<sup>18</sup>F]MPPF bei Patienten mit TLE. Dieses wurde in verschiedenen Tiermodellen mit chronischer Epilepsie bestätigt. Unsere Arbeitsgruppe wies in einem Post-SE-Modell mit elektrischer Induktion des SE bei Ratten ein erhöhtes [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotential im *Septum* bei den Tieren mit spontanen Anfällen im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe nach (VAN DIJK et al., 2018). Darüber hinaus wurde in einem weiteren Post-SE-Modell der SE chemisch mithilfe von Pilocarpin induziert. Auch hier zeigten die Ratten nach dem SE ein erhöhtes [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotential im *Septum* im Vergleich zu den Kontrollgruppen (DI LIBERTO et al., 2018). In beiden Post-SE-Modellen zeigten die Autoren eine Korrelation der erhöhten Bindung des Radioliganden mit veränderten Verhaltensparametern, wie reduziertem

Buddelverhalten und reduzierter sozialer Interaktion. Diese sind Parameter, welche wie bereits erläutert zur Belastungseinschätzung in Nagermodellen genutzt werden können. In der Studie von DI LIBERTO et al. (2018) stellte sich keine Korrelation des erhöhten [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotentials zu der Anfallsdauer oder -frequenz dar. DI LIBERTO et al. (2018) diskutierten, dass viele Veränderungen den Schweregrad der Epilepsie beziehungsweise Anfallsfrequenz reflektieren können. Um die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als Biomarker-Kandidaten für die Bewertung der Belastung in Tiermodellen in Betracht zu ziehen, sollte eine Korrelation mit den Verhaltens- und nicht den Anfallsparametern nachgewiesen werden. Die Autoren beider Studien schlussfolgerten, dass der Nutzen der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als potentieller Biomarker für die Belastungseinschätzung in Nagermodellen sowie zur Evaluation psychiatrischer Komorbiditäten weiter untersucht werden sollte (DI LIBERTO et al., 2018; VAN DIJK et al., 2018).

Im Jahr darauf führten BASCUÑANA et al. (2019) eine ähnliche Studie in einem Kindling-Modell bei Ratten durch. Auch hier zeigten die stimulierten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe im *Septum*, im entorhinalen *Cortex* und im *Hippocampus* ein erhöhtes [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotential. Zusätzlich wurde im Rahmen der Studie eine *In-vitro*-Autoradiografie durchgeführt, mit welcher die erhöhte Rezeptorbindung aus dem  $\mu$ PET-Scan allerdings nicht bestätigt werden konnte. Ähnlich der oben beschriebenen Diskussion von BUCHECKER et al. (2020) vermuteten BASCUÑANA et al. (2019), dass die Erhöhung des Bindungspotentials im  $\mu$ PET-Scan eher durch reduzierte endogene Serotoninspiegel und somit den Wegfall der Konkurrenz um die Bindungsstelle verursacht sein könnte.

### 3. Stereologische Quantifizierung

Für die Quantifizierung von Parametern der Belastungseinschätzung sind verschiedene Methoden anwendbar. Eine davon ist die Quantifizierung der Proteinexpression in immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten. Dafür wird das Gewebe fixiert, geschnitten, gefärbt und auf einen Objektträger verbracht. Ein Teil der räumlichen Information geht dabei verloren. Objekte werden als Flächen dargestellt und das Ergebnis von Analysen enthält, selbst bei gleicher Schnittdicke und Schnittebene, einen systematischen Fehler (WANKE, 2002; HOWARD und REED, 2005; OCHS, 2015). Sowohl durch das Erkrankungsmodell, pharmakologische Substanzen als auch die

immunhistochemische Färbung kann es zu Veränderungen im extrazellulären Raum (Schrumpfung, Ödem) kommen. Diese Veränderungen können sowohl zwischen als auch innerhalb der experimentellen Gruppe unterschiedlich ausgeprägt sein. Werden die Ergebnisse unbeachtet dieser Veränderungen im extrazellulären Raum interpretiert, kann es zu einer Fehlinterpretation der Daten kommen. Es besteht ein Verzerrungspotential (engl. *bias*). Um exakte Werte zu erhalten, müsste das gesamte Organ analysiert werden. Der entstehende Arbeitsaufwand wäre dabei jedoch enorm. Ein quantitativ und qualitativ genaueres Ergebnis lässt sich mithilfe stereologischer Methoden ermitteln (OCHS, 2015). Stereologie von griechisch *στερεός* (*stereo*), bedeutet körperlich, räumlich oder starr und bezeichnet mathematische Methoden, welche eine Beziehung zwischen zweidimensionalen Messungen und dreidimensionalen Parametern herstellen (WEIBEL, 1979; HOWARD und REED, 2005). Vom Begriff Stereologie ist die Morphometrie abzugrenzen, welche zwar auch eine quantitative Messung morphologischer Strukturen ist, jedoch nicht zwingend einen dreidimensionalen Bezug herstellt (WANKE, 2002). Es gibt verschiedene stereologische Vorgehensweisen. Die modell-basierte Stereologie trifft im Vorfeld der Analyse einige Annahmen bezüglich des zu untersuchenden Objektes. Diese Methode enthält, insbesondere für die Analyse biologischer Strukturen mit unregelmäßiger Verteilung, einen systematischen Fehler. Die design-basierte Stereologie hingegen trifft keine Annahmen über Größe, Form oder Verteilung des zu untersuchenden Objektes. Durch eine Vielzahl von Methoden können somit realitätsnahe Schätzwerte ermittelt werden (STERIO, 1984; OCHS, 2015).

### 3.1. Prinzip von Delesse

DELESSE (1848), ein französischer Geologe, untersuchte den Zusammengang von Flächen- zu Volumenfraktionen. Mithilfe einfacher Methoden konnte er nachweisen, dass die Anschnittfläche eines Bohrkerns aus der Erde, Rückschlüsse auf das enthaltene Volumen an Öl in diesem zuließ. Dafür nutzte er zufällig ausgewählte Anschnittflächen und markierte mithilfe von Transparentpapier die Ölfächen. Er ermittelte so den Flächenanteil von Öl ( $A_{(x)}$ ) an der Gesamt- oder Bezugsfläche des Anschnitts ( $A_{(B)}$ ), die sogenannte Flächendichte ( $A_A$ ). Anschließend ermittelte er für den Bohrkern das Gesamtvolumen ( $V_{(B)}$ ) und den enthaltenen Anteil an Öl ( $V_{(x)}$ ) mithilfe von chemischen Methoden. Der Anteil an enthaltenem Öl im Bohrkern entsprach der Volumendichte ( $V_V$ ).

DELESSE (1848) konnte zeigen, dass bei zufällig ausgewählten Flächen, die Flächenfraktion  $A_{A(x/B)}$  proportional zu der enthaltenen Volumenfraktion  $V_{V(x/B)}$  in der Kernprobe ist (OBERHOLZER, 1983).

Die Richtigkeit dieses Prinzips wurde von WEIBEL (1979) bestätigt und lässt sich mathematisch wie folgt erläutern:

Die Flächendichte berechnet sich aus dem Verhältnis der Summe der Anschnittflächen des Objektes  $A_x$  zur Summe der Bezugsflächen  $A_B$ :

$$\text{Flächendichte: } A_{A(x/B)} = \frac{\sum A(x)}{\sum A(B)} = \frac{A_x}{A_B}$$

Die Volumendichte  $V_V$  entspricht dem Verhältnis des Objektvolumens  $V_x$  zum Schnittvolumen  $V_B$ :

$$\text{Volumendichte: } V_{V(x/B)} = \frac{\sum V(x)}{\sum V(B)} = \frac{V_x}{V_B}$$

Das Volumen des Schnittes  $V_B$  berechnet sich aus der Oberfläche  $A_B$  multipliziert mit der Schnittdicke  $dy$  und das Volumen eines Objektes  $V_x$  berechnet sich aus der Fläche oder den Profilen der Objekte  $A_x$  multipliziert mit der Schnittdicke  $dy$ :

$$\text{Schnittvolumen: } V_B = A_B * dy$$

$$\text{Objektvolumen: } V_x = A_x * dy$$

Die Formeln des Schnitt- und Objektvolumens lassen sich nach Bezugsfläche  $A_B$  und Profilfläche  $A_x$  umstellen:

$$A_B = \frac{V_B}{dy}$$

$$A_x = \frac{V_x}{dy}$$

Setzt man diese umgestellten Formeln in die Formel der Flächendichte ein, ergibt sich folgender Zusammenhang:

$$A_A = \frac{A_x}{A_B} = \frac{\frac{V_x}{dy}}{\frac{V_B}{dy}} = \frac{V_x}{dy} * \frac{dy}{V_B} = \frac{V_x}{V_B} = V_V$$

Der beschriebene Zusammenhang von Volumen- und Flächendichte ( $V_V \sim A_A$ ), wurde nachfolgend von anderen Forschern erweitert. ROSIWAL (1898) beschrieb die Verknüpfung von Volumen- und Längendichte  $V_V \sim L_L$ . THOMSON (1930) und GLAGOLEV

(1955) ermittelte die Beziehung von Volumen- und Punktedichte  $V_V \sim P_P$ . Der Zusammenhang von Punkte- und Volumendichte lässt sich einfach erklären, wenn man sich vorstellt, dass jeder Testpunkt einer Fläche entspricht und somit das Prinzip von DELESSE (1848) anwendet.

Zusammenfassend lässt sich somit folgende Aussage treffen (MOUTON, 2002; HOWARD und REED, 2005):

*Volumendichte ~ Flächendichte ~ Längendichte ~ Punktedichte*

$$V_V \sim A_A \sim L_L \sim P_P$$

Eine allgemeine Formulierung der Dichte  $R_R$  einer Komponente  $x$  in Bezug zum Referenzraum/der Bezugsgröße ist die folgende:

$$R_{R(x/B)} = \frac{\text{Menge von Komponente } x}{\text{Bezugsgröße}}$$

### 3.2. Volumenschätzung nach Cavalieri

Stress kann enorme Effekte auf das Volumen der Hirnregion haben. In einer kürzlich veröffentlichten Studie über ein Forscherteam in der Antarktis, konnte eine deutliche Reduktion des *Hippocampus*-Volumens der Expeditionsteilnehmer im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (STAHN et al., 2019). Auch während Versuchsdurchführungen sind die verwendeten Tiere oftmals Stress ausgesetzt, welcher zu Veränderungen des Volumens einzelner Regionen oder des gesamten Gehirns führen kann. Des Weiteren kann durch die Prozedur der Gewebeaufbereitung und der immunhistochemischen Färbung selbst eine Schrumpfung des Gewebes erfolgen, welche nicht zwangsläufig bei allen Proben gleichermaßen erfolgen muss (NAPPER, 2018). So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass älteres Hirngewebe bei der Fixierung weniger stark schrumpft als jüngeres (MOUTON, 2011).

Bei der im vorherigen Abschnitt ([Prinzip von Delesse](#)) beschriebenen Volumendichte handelt es sich um einen dimensionslosen, relativen Wert. Die Dichte an sich kann nicht verglichen werden, um daraus Schlussfolgerungen zu ziehen. Würde man die Werte zwischen experimentellen Gruppen vergleichen, kann von der sogenannten „Referenzfalle“ (engl. *reference trap*) gesprochen werden (BRAENDGAARD und GUNDERSEN, 1986). Um einen absoluten Wert auszudrücken, bedarf es der Bezugsgröße,

welche das Volumen der untersuchten Region  $V_{Ref}$  ist (WANKE et al., 1994; WANKE, 2002; MOUTON, 2011; NAPPER, 2018).

Eine Methode um das Referenzvolumen  $V_{Ref}$  zu ermitteln ist die Volumenschätzung nach CAVALIERI (1635), benannt nach einem italienischen Mathematiker. Die dreidimensionale Volumenbestimmung kann aus mehreren zweidimensionalen Schnitten durch einen Körper, im äquidistanten, bekannten Abstand ermittelt werden. Das Volumen des Referenzraumes berechnet sich wie folgt (GARCIA-FINANA et al., 2003; MOUTON, 2014; OCHS, 2015):

$$V_{Ref} = \bar{t} * \sum A_i$$

$V_{Ref}$  = Volumen des Referenzraumes

$\bar{t}$  = Abstand zwischenden Schnitten

$\sum A_i$  = Summe der analysierten Flächen

Wichtige Voraussetzungen für die Anwendung der Methode sind systematische Verfahren der Probennahme sowie die bekannte Schrittdicke (MOUTON, 2014).

Auch hier lässt sich das Punktezählverfahren anwenden, da jeder Punkt einem Flächenwert entspricht (GEINISMAN et al., 1996):

$$V_{Ref} = \bar{t} * \sum P_i * a(p)$$

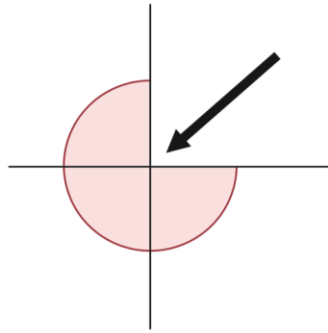
$V_{Ref}$  = Volumen des Referenzraumes

$\bar{t}$  = Abstand zwischen den Schnitten

$\sum P_i$  = Summe der Punkte, welche die Referenzstruktur treffen

$a(p)$  = Fläche, welche mit dem Punkt assoziiert wird

Wichtig ist es, im Vorfeld der Analyse zu definieren, welche Punkte als Treffer des Referenzraumes gezählt werden. WEIBEL (1979) definierte den „wahren Testpunkt“ mithilfe eines Kreuzes. In diesem wird nur die Ecke des rechten oberen Quadranten als Treffer der entsprechenden Struktur gezählt, wodurch die Entscheidungsfindung erleichtert wird (siehe Abb. 2).



**Abbildung 2: Definition des wahren Testpunktes, modifiziert nach WEIBEL 1979 (eigene Abbildung erstellt mit BioRender.com).**

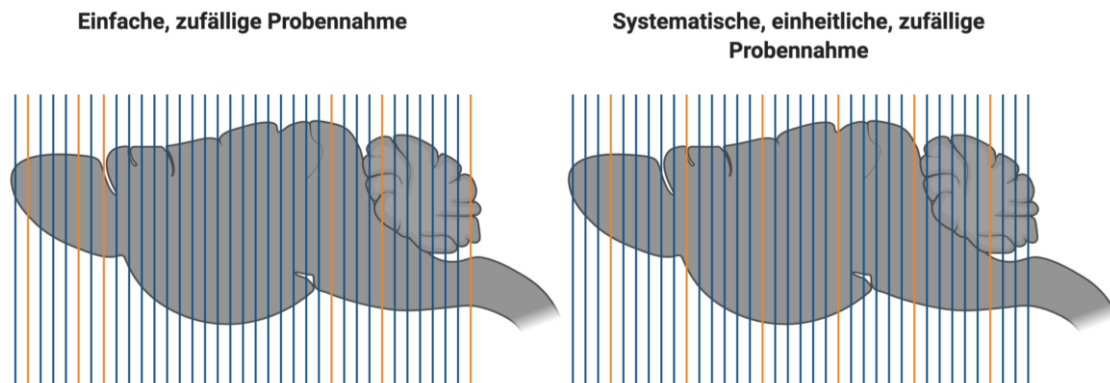
Mithilfe der Volumenschätzung nach CAVALIERI (1635) kann sowohl das Volumen eines gesamten Organs (zum Beispiel das Gehirn) als auch einer Region (zum Beispiel das *Septum*) ermittelt werden (OCHS, 2015).

### 3.3. Probennahmeverfahren

Sowohl die Werte der Flächen- und Volumendichte als auch die Volumenermittlung nach CAVALIERI (1635) sind Schätzungen. Es besteht ein Unterschied zwischen dem Verzerrungspotential (engl. *bias*) und der Präzision (engl. *precision*) des Ergebnisses. Das Verzerrungspotential bezieht sich dabei auf die Genauigkeit des ermittelten Schätzwertes. Eine Verzerrung kann bei der Probennahme, der Auswahl der mikroskopischen Felder und bei Missachtung der Referenzgröße entstehen (GEINISMAN et al., 1996; BROWN, 2017). Wie beschrieben, kann die Referenzgröße beispielsweise mithilfe der CAVALIERI (1635) Volumenschätzung ermittelt werden. Für die Anwendung design-basierter stereologischer Prinzipien ist die systematische, einheitliche und zufällige Probennahme (Abk. SURS, von engl. *systematic uniform random sampling*) eine Voraussetzung (HOWARD und REED, 2005; MULISCH et al., 2015; NAPPER, 2018). Somit wird der gesuchte Parameter mit gleicher Wahrscheinlichkeit ausgewählt und eine Verzerrung wird vermieden. Wichtige Voraussetzung ist zum einen die zufällige Verteilung des Parameters im Objekt und dass das gesamte Organ im gleichen Abstand geschnitten wird (*uniform*) (GUNDERSEN und JENSEN, 1987; MOUTON, 2014). Die Auswahl des Startpunktes erfolgt zufällig (*random*) und es wird jeder n-te Schnitt in einem definierten Intervall (*systematic*) ausgewählt (siehe Abb. 3). SURS unterscheidet sich von der einfachen, zufälligen Probennahme (engl. *simple independent random sampling*), bei der



die Proben ohne ein festgesetztes Intervall zufällig ausgewählt werden (STUART, 1984). Die mittels SURS gewonnenen Ergebnisse spiegeln die gesamte Region und nicht nur die beprobte Fläche wieder (NAPPER, 2018).



**Abbildung 3: Vergleichende Darstellung der Verfahren der Probennahme (eigene Abbildung erstellt mit BioRender.com).**

Die Präzision bezeichnet, wie groß die Varianz des Ergebnisses ist (BROWN, 2017). Die Ergebnisse, welche mithilfe von SURS ermittelt werden, haben eine geringere Varianz als die der einfachen, zufälligen Probennahme (WEST et al., 1991). Dadurch ist SURS deutlich effizienter als die zufällige Probennahme, da mit geringerem Aufwand genauere Ergebnisse ermittelt werden können (GUNDERSEN und JENSEN, 1987). Mithilfe der Präzision kann eine Aussage über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse getroffen werden. Dies kann anhand des Fehlerkoeffizienten (CE von engl. *coefficient of error*) beurteilt werden. Dabei ist neben der Genauigkeit des Ergebnisses auch der Aufwand und die damit assoziierten Kosten für eine Analyse relevant. Nach GUNDERSEN und OSTERBY (1981) gibt es zwei Möglichkeiten, die Varianz des Ergebnisses zu verringern: 1) die Erhöhung der Probengröße, das heißt mehr Tiere pro Gruppe oder 2) die Erhöhung der Präzision des Ergebnisses der Schätzung. Der Titel der Veröffentlichung von GUNDERSEN und OSTERBY (1981) enthielt auch die Worte: „do more less well“. Die Autoren beschrieben, dass eine Vielzahl von Proben ermöglichen, bei der Auswertung weniger detailliert sein zu müssen. Allerdings ist der Einfluss auf die Varianz des Gesamtergebnisses von der Hierarchieebene abhängig. Die höchste Hierarchieebene bei der Auswertung eines Tierversuch-Projektes ist die Anzahl der verwendeten Tiere. Darauf folgen die histologischen Schnittpräparate, die ausgewerteten Probenfelder und schlussendlich die gezählten Punkte. Die verwendeten Tiere haben die größte biologische

Varianz, währenddessen ein mikroskopisch sichtbares Detail eher unbedeutend für das Ergebnis ist. Dies bedeutet, dass sie die Varianz des Ergebnisses durch die Erhöhung der Anzahl der Tiere unter Umständen signifikant verringern lässt, währenddessen das Auswerten einer höherer Anzahl an Punkten einen geringeren Einfluss auf die Varianz des Ergebnisses hat (WEIBEL et al., 1966; GUNDERSEN und OSTERBY, 1981). Allerdings sollte bei der Planung eines Projektes, im Sinne der *Reduction* des 3R-Prinzips und der Präzision der Analyse, die Anzahl der verwendeten Tiere mit Bedacht gewählt werden.

### III. ARBEITSHYPOTHESEN UND ZIELSETZUNG

Im Rahmen der Arbeit unserer DFG-Forschungsgruppe wurden bereits zahlreiche Parameter zur Evaluierung der Belastung in Tiermodellen identifiziert. Diese Parameter stellen Kandidaten für eine sensitive und evidenz-basierte Belastungseinschätzung in Tiermodellen dar, welche anschließend in verschiedenen Tiermodellen validiert werden. Die Belastungseinschätzung dient der ethischen Abwägung von einem möglichen Zugewinn an wissenschaftlichen Erkenntnissen und der Belastung der Tiere. Darüber hinaus können mithilfe der Parameter der Belastungseinschätzung Modelle mit niedrigerer Belastung der Tiere priorisiert werden. Außerdem bieten die Parameter im Rahmen des *Refinements* des 3R-Prinzips auch innerhalb der drei Kategorien von Schweregraden die Möglichkeit differenzierte Einschätzungen zur Belastung der Tiere zu treffen.

Der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht, unter anderem auch im Kontext der Erforschung von Stress und Epilepsie in Veterinär- und Humanmedizin. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde nach vorliegendem Kenntnisstand, die Eignung als Parameter der Belastungseinschätzung nicht untersucht.

μPET-Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten bei Ratten ein erhöhtes Bindungspotential des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Liganden [<sup>18</sup>F]MPPF im *Hippocampus* in einem *Restraint*-Stressmodell (BUHECKER et al., 2020) und im *Septum* in zwei Post-SE-Modellen (DI LIBERTO et al., 2018; VAN DIJK et al., 2018). Basierend auf den Ergebnissen aus diesen Studien, diskutierten die Autoren der beiden Studien eine mögliche Nutzung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als Biomarker-Kandidat für die Belastungseinschätzung in Tiermodellen. Das erhöhte Bindungspotential des Radioliganden kann zum einen eine erhöhte Expression des Rezeptors widerspiegeln, aber auch durch eine reduzierte extrazelluläre Konzentration des endogenen Liganden Serotonin verursacht sein (ZIMMER et al., 2003). Das Hauptziel dieser Arbeit ist die weitere Überprüfung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als Biomarker-Kandidat für die Belastungseinschätzung in Tiermodellen. Dazu wird eine immunhistochemische Färbung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im Hirngewebe von Ratten aus einem *Restraint*-Stressmodell und zwei Post-SE-Modellen angefertigt. Im Anschluss erfolgt die Quantifizierung der Rezeptorexpression unter

Anwendung stereologischer Prinzipien. Die evaluierten Parameter sind 1) die optische Dichte und 2) das Gesamtvolumen des Rezeptors im Referenzraum.

Außerdem wird geprüft, ob eine Korrelation der ermittelten Parameter mit den Verhaltensparametern aus den vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe von KOSKA et al. (2019) und SEIFFERT et al. (2019) vorliegt. Die Ergebnisse könnten weitere Hinweise auf eine Nutzung als Parameter der Belastungseinschätzung geben.

Im *Restraint*-Stressmodell soll außerdem evaluiert werden, ob eine Korrelation zwischen der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression und dem [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotential besteht. Für dieses Modell wurden die gleichen Tiere für die  $\mu$ PET- und die IHC-Studie verwendet. Sollte es eine Korrelation zwischen den stereologisch quantifizierten Parametern und dem Bindungspotential des Radioliganden geben, wäre dies eine Bestätigung, dass dem erhöhten [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotential im  $\mu$ PET-Scan eine Veränderung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte zugrunde liegt.

Darüber hinaus können Veränderungen der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als Biomarker-Kandidat für die Bewertung von psychiatrischen Komorbiditäten neurologischer Erkrankungen wie Angststörungen, Depressionen, Epilepsie oder Autismus von Interesse sein. Verhaltensänderungen in Nagermodellen können psychiatrische Komorbiditäten widerspiegeln (GASTENS et al., 2008; MAZARATI et al., 2008; SEO et al., 2013; MINJAREZ et al., 2017). Demzufolge können Beobachtungen der Verhaltensänderungen in den Tiermodellen der Erforschung der Ätiologie von Komorbiditäten dienen. Die Überprüfung einer Korrelation der Parameter der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression mit den Verhaltensparametern aus den Studien von KOSKA et al. (2019) und SEIFFERT et al. (2019) kann einer weiterführenden Bestätigung für die Nutzung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als Biomarker zur Bewertung von Komorbiditäten bei humanen Patienten dienen.

Folgende Fragestellungen sollen im Rahmen dieser Dissertation beantwortet werden:

- Kann im *Restraint*-Stressmodell eine Veränderung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression in den limbischen Hirnarealen, *Septum* und Subregionen des *Hippocampus*, nachgewiesen werden?
- Liegt im *Restraint*-Stressmodell eine Korrelation zwischen dem [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotential aus dem  $\mu$ PET-Scan mit der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression vor?
- Kann in den chronischen Epilepsiemodellen eine Veränderung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression in den limbischen Hirnarealen, *Septum* und Subregionen des

*Hippocampus*, nachgewiesen werden?

- Besteht in den chronischen Epilepsiemodellen eine Korrelation zwischen der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression mit den bereits ermittelten Verhaltensparametern und biochemischen Parametern?

Übergeordnet soll somit evaluiert werden, ob mithilfe der immunhistochemischen Quantifizierung eine Nutzung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als Biomarker-Kandidat für die Belastungseinschätzung in Nagermodellen bestätigt werden kann. Außerdem soll abgeschätzt werden, ob auf Basis der immunhistochemischen Quantifizierung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression eine Einschätzung der Nutzung als Parameter zur Evaluation von psychiatrischen Komorbiditäten neurologischer Erkrankungen möglich ist.

## IV. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Versuchstiere

Das im Rahmen dieser Dissertation untersuchte Gehirngewebe entstammt Projekten, welche zuvor im Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der veterinärwissenschaftlichen Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt wurden. Für die retrospektive Quantifizierung wurde Gehirngewebe von Ratten aus einem *Restraint*-Stressmodell und zwei chronischen Epilepsiemodellen mit spontaner Anfallsaktivität untersucht. Bei Letzteren wurde der SE chemisch oder elektrisch induziert. Post-SE-Modelle sind chronische Modelle zur Erforschung der TLE, der häufigsten Epilepsieform des Menschen (KALYNCHUK, 2000; LÖSCHER, 2002; CURIA et al., 2008; ENGEL und SALAMON, 2015).

Modell	Tiere	Gewicht in Gramm (g)	Implantation der Elektrode	Anzahl der Tiere	Publikation
<i>Restraint</i> -Stress	Ratten	234 – 254 g	Nichtzutreffend	Naiv: 7 Transport: 6 Transport mit <i>Restraint</i> : 7	BUHECKER et al. (2020)
Post-SE, elektrisch	Ratten	200 – 224 g	Basolaterale <i>Amygdala</i> (BLA)	Naiv: 11 <i>Sham</i> : 13 SE: 12	SEIFFERT et al. (2019)
Post-SE, chemisch	Ratten	200 – 224 g	Hippocampaler <i>Gyrus dentatus</i>	Naiv: 12 <i>Sham</i> : 12 SE: 15	KOSKA et al. (2019)

**Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Studien und Tiere.**

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden im Einklang mit dem deutschen TierSchG und der RL 2010/63/EU des Europäischen Parlamentes und des Rates zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere durchgeführt. Die ermittelten Daten wurden nach Vorgaben der ARRIVE-Richtlinien dargestellt. Die Studien wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (ROB-55.2-2532.Vet\_02-16-105, ROB-55.2-2532.Vet\_02-17-86). Die Tiere waren weibliche Ratten der Zuchtlinie *Sprague-Dawley* (Envigo, Horst, Niederlande). Während der Versuche wurden die Tiere gewogen und mithilfe des *Grimace-Scale* (SOTOCINAL et al., 2011), zur Schmerzevaluation, und modifizierter *Irwin*-Skala (IRWIN, 1968), zur Detektion neurologischer Defizite, evaluiert. Die im nächsten Abschnitt erklärten *In-vivo*-Prozeduren beziehen sich auf die jeweiligen Studien von BUCHECKER et al. (2020) (*Restraint*-Stressmodell), SEIFFERT et al. (2019)

(elektrisches Post-SE-Modell) und KOSKA et al. (2019) (chemisches Post-SE-Modell). Weitere Details zu den jeweiligen Projekten können in den entsprechenden Publikationen nachgelesen werden (siehe Tabelle 2).

### 1.1. **Restraint-Stressmodell**

In diesem Modell wurde der Einfluss von Stress durch Transport und Zurückhaltung (engl. *restraint*) auf die Tiere untersucht (BUHECKER et al., 2020). Die Tiere wurden zufällig drei Gruppen zugeordnet: 1) Naiv, 2) Transport und 3) Transport mit *Restraint* ([www.randomizer.org](http://www.randomizer.org)). Die Transportgruppe wurde täglich für 12 konsekutive Tage in einem separaten Transportkäfig in ein Labor transportiert und dort für eine Stunde belassen. Die Tiere der Gruppe ‚Transport und *Restraint*‘ wurde ebenso dem täglichen Transport ausgesetzt und zusätzlich für eine Stunde in eine enge Plexiglasröhre (16 cm Länge und 9 cm Durchmesser) mit Luftlöchern verbracht. Die naive Kontrollgruppe wurde keinem der beiden Stressoren ausgesetzt. Am 13. Tag des Versuches wurden für alle drei Gruppen  $\mu$ PET-Untersuchungen mit [ $^{18}$ F]MPPF und 2-deoxy-2-[ $^{18}$ F]fluoro-D-glucose ([ $^{18}$ F]FDG) durchgeführt. Am Tag 16 nach Beginn der Versuche wurden die Tiere euthanasiert.

### 1.2. **Post-Status-Epilepticus-Modelle**

In den Epilepsiemodellen wurden drei experimentelle Gruppen untersucht, denen die Tiere zufällig zugeordnet wurden ([www.randomizer.org](http://www.randomizer.org)): 1) Naiv, 2) *Sham* und 3) SE. Die naiven Tiere stellen hier die Kontrollgruppe ohne Elektrode oder Stimulation dar. Die *Sham*-Gruppe bezeichnet dabei Tiere, welche eine Elektrode, aber keine elektrische oder chemische Stimulation erhalten haben. Mit dieser Gruppe soll erfasst werden, welchen Langzeiteinfluss die Implantation der Elektrode auf die Tiere hat. In der SE-Gruppe sind die Tiere, welche als Folge eines induzierten SE spontane Anfälle entwickelt haben. Der SE wurde chemisch oder elektrisch induziert und stellt den initialen, epileptogenen Hirninsult dar. Als Folge dessen entwickeln sich nach einer Latenzzeit von Tagen bis Wochen spontane Anfälle (BRANDT et al., 2003; CHEN und WASTERLAIN, 2006). Die Anfallsstärke wurde dabei mittels einer Bewertungsskala nach RACINE (1972) von 1 bis 5 eingestuft. Der Beginn des SE wurde definiert, sobald mindestens zwei Anfälle innerhalb von 30 Minuten Stadium 4 oder 5 der Skala erreichten (DI LIBERTO et al., 2018).

Im elektrischen Post-SE-Modell (SEIFFERT et al., 2019) erfolgte die Implantation der Elektrode in die rechte basolaterale *Amygdala* (BLA). Implantation und Induktion des SE erfolgten nach BRANDT et al. (2003). Sechs Wochen nach der Operation wurde der SE mittels einer 25-minütigen elektrischen Stimulation mit alternierenden positiven und negativen Rechteckimpulsen (Frequenz 50 Hz, Stromstärke von 700  $\mu$ A) induziert. Vier Stunden nach der elektrischen Induktion wurde der SE mittels intraperitonealen (i.p.) Diazepaminjektionen (10 mg/kg) beendet.

Im chemischen Post-SE-Modell (KOSKA et al., 2019) wurden Elektroden in den rechten *Gyrus dentatus* des *Hippocampus* nach DI LIBERTO et al. (2018) implantiert. Für die Induktion des SE wurde der cholinerge Agonist Pilocarpin verwendet. Nach einer postoperativen Erholungszeit von zwei Wochen, wurde den Tieren 14 bis 16 Stunden vorher Lithiumchlorid gelöst in Natriumchlorid (i.p. 127 mg/kg) und 30 min vor der Pilocarpinapplikation Methyloscopolamin (i.p. 1 mg/kg) injiziert. Pilocarpin (i.p. 10 mg/kg) wurde alle 30 Minuten bis zum Eintreten des SE injiziert (maximal 10 Injektionen). Der SE wurde nach 90 Minuten mittels einer einmaligen Injektion von Phenobarbital (i.p. 25 mg/kg) und drei Injektionen Diazepam (i.p. alle 15 Minuten, 10 mg/kg pro Injektion) beendet.

Für die Post-SE-Modelle wurden verschiedene Phasen in der Auswertung der Daten unterschieden: 1) Frühe Phase nach dem Insult: eine Woche nach dem SE, 2) Latenzphase: vor der chronischen Manifestation der Epilepsie, 3) Chronische Phase: nach Einsetzen der spontanen Anfälle. Die Tiere aller Gruppen wurden in beiden Post-SE-Modellen zum gleichen Zeitpunkt in der chronischen Phase, 12 Wochen nach Induktion des SE, euthanasiert.

## 2. Gewebeaufbereitung

Nach Euthanasie mit einer Überdosis Pentobarbital (i.p. 600 mg/kg, Narcoren®, Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland) wurden die Tiere transkardial, mit 0.01 M phosphatgepufferter Kochsalzlösung und anschließend 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) in 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7.4), perfundiert. Danach wurden die Gehirne mit 4%-igem PFA (pH 7.4) für 24 Stunden nachfixiert und darauffolgend in 30%-ige Zuckerlösung transferiert, bis die Gehirne zum Boden des Gefäßes abgesunken waren. Die Zuckerlösung verdrängt das PFA aus dem Gewebe und schützt gleichzeitig die Zellstrukturen. Die



Gehirne wurden dann zur Konservierung in Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Europa) mit flüssigem Stickstoff (Besamungsstation München/Grub, Deutschland) eingefroren und bei minus 80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Eine wichtige Voraussetzung der quantitativen Auswertung ist die Anwendung von SURS (siehe [Probennahme](#)). Mithilfe eines Kryostaten (Microm GmbH, Walldorf, Deutschland) wurde das Gehirn von *Bregma* +1.56 mm bis *Bregma* -7.92 mm in 40 µm dicke koronare Schnitte geschnitten (*uniform*) und Serien mit einem äquidistanten Abstand von 480 µm zugeordnet. Die Serien enthielten jeden zwölften Schnitt (*systematic*). Der Startpunkt der Serie war dabei zufällig (*random*). Die Schnitte wurden in einem Kryoprotektivum (Verhältnis 3:3:1:3; 98% Glycerin, Ethylenglykol, 0.2 M Phosphatpuffer und destilliertes Wasser) bei minus 20°C gelagert.

### 3. Immunhistochemische Färbungen

Die qualitative und quantitative Auswertung der angefertigten Färbungen erfolgte anhand einer Enzym-Substrat-Färbung und einer Immunfluoreszenzfärbung von freischwebenden Gewebeschnitten. Zur Etablierung der Färbungen wurden mehrfach Tests mit Probegewebe durchgeführt. Für die Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung wurden die Komponenten zuerst einzeln und anschließend zusammen getestet. Anpassungen waren sowohl für die Konzentration der Antikörper in der Trägerlösung als auch für die Auswahl der primären und sekundären Antikörper notwendig. Eine detaillierte Beschreibung der [Etablierung der Färbungen](#) befindet sich im Anhang.

#### Enzym-Substrat-Färbung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors

Um die Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors darzustellen, wurden die Hirnproben mittels einer Reaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) gefärbt. Die Enzym-Substrat-Färbung erfolgte über einen Zeitraum von drei Tagen (siehe Abb. 4 Tag 1 und Abb. 5 Tag 2 bis 3). Die immunhistochemische Färbung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors wurde an freischwebenden, gefrorenen Gewebeschnitten durchgeführt. Für diese Färbung wurde je eine Schnittserie von jedem Tier der drei untersuchten Modelle verwendet. Diese wurden im ersten Schritt dreimal fünf Minuten in phosphatgepufferter Salzlösung mit 0.1% Tween®-20 (Merck Millipore, Burlington, USA), kurz PBST, gewaschen. Anschließend wurden die Antigenveränderungen, welche durch die Fixierung des Gewebes in Formaldehyd

hervorgerufen wurden, mithilfe der hitzeinduzierten Demaskierung (Abk. HIER von engl. *heat induced epitope retrieval*) umgekehrt. Für die Epitopdemaskierung wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten bei 80°C in 10 mM Natriumcitratpuffer (pH 6.0) erhitzt. Welchem Mechanismus diese Demaskierung folgt, ist noch nicht vollends erforscht (JANARDHAN et al., 2018). Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte auf Eis für zehn Minuten heruntergekühlt. Nach drei weiteren fünfminütigen Waschschritten in PBST, wurden die Schnitte in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünntem 3%-igem Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 30 Minuten inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität zu inhibieren. Es folgten drei fünfminütige Waschschrritte in PBST. Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden mit einem Blockpuffer, bestehend aus PBS, 0.3% Triton™ X-100 (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland), 1% normalem Ziegenserum S-1000 (Vector Labs, Burlingame, Kalifornien USA) und 3% bovinem Serumalbumin (BSA) (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland), geblockt. Triton™ X-100 wirkt als Tensid und das Serum blockiert die endogenen Immunglobuline. Beide verhindern unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers. BSA verhindert hydrophobe Wechselwirkungen, wodurch die unspezifische Hintergrundmarkierung reduziert wird (MULISCH et al., 2015). Anschließend wurden die Gewebeschnitte in einem primären, polyklonalen Kaninchen Anti-5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antikörper (ab227165, Abcam, Cambridge, UK; Konzentration 1:1000) in Trägerlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Trägerlösung, welche im Rahmen dieser Dissertation für die genutzten Antikörper verwendet wurde, bestand für alle Antikörper aus denselben Bestandteilen (PBS, 0.3% Triton™ X-100, 1% normales Ziegenserum S-1000 und 1% BSA).

Polyklonale Antikörper bestehen im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern aus verschiedenen Immunglobulinen, wodurch das Binden an multiple Epitope des zu markierenden Proteins möglich ist. Vorteil der Verwendung von polyklonalen Antikörpern ist, dass diese die Proteine verlässlicher darstellen als monoklonale Antikörper. Nachteil der polyklonalen Antikörper ist, dass auch mehr Hintergrund, das heißt unspezifische Strukturen angefärbt werden (JANARDHAN et al., 2018).

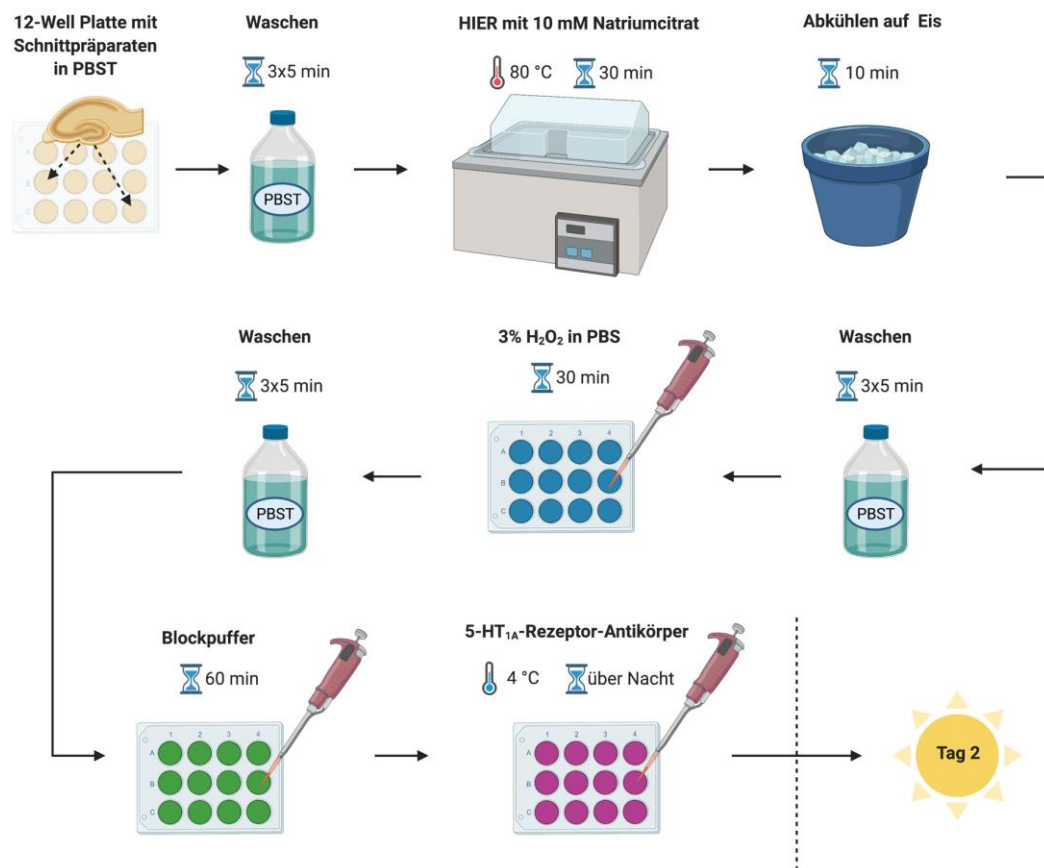
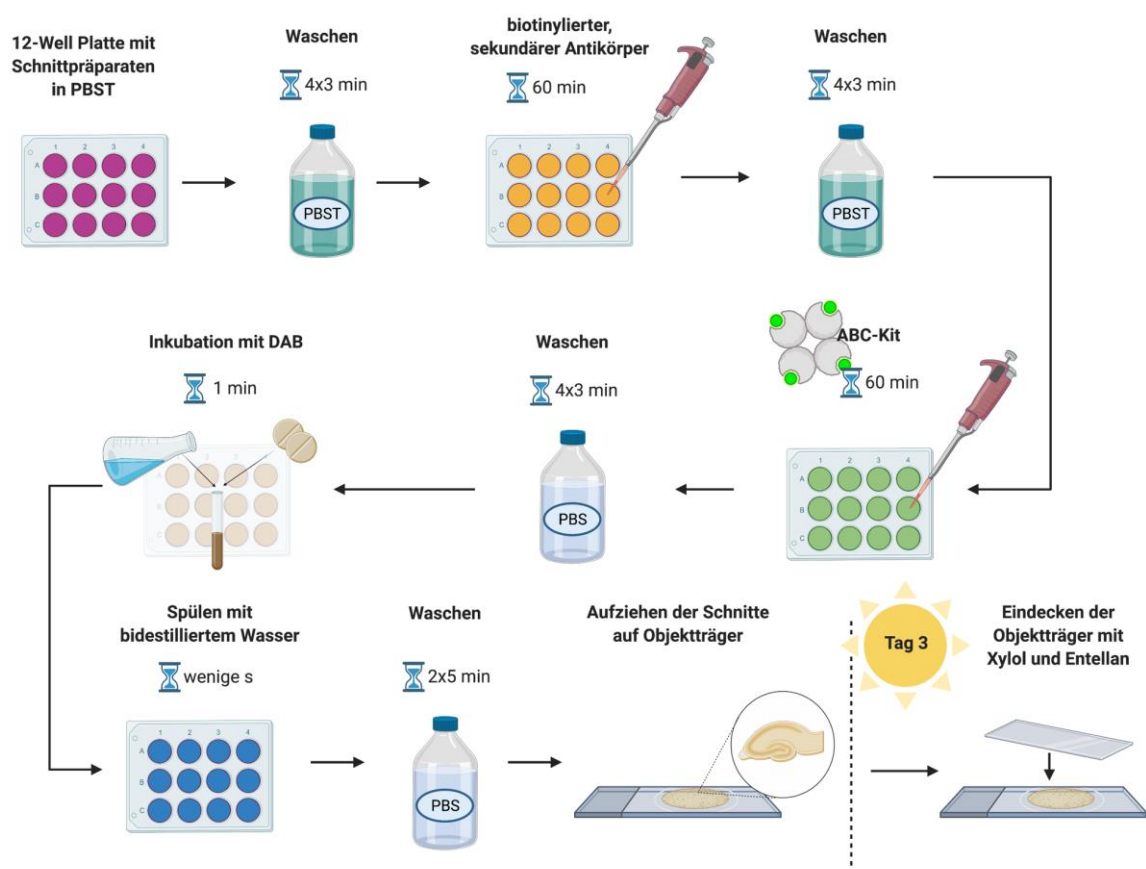


Abbildung 4: Enzym-Substrat-Färbung am Tag 1 (eigene Abbildung erstellt mit BioRender.com).

Am folgenden Tag wurden die Gewebeschnitte viermal drei Minuten in PBST gewaschen und dann in Biotin-markiertem sekundären Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper (BA-1000, Vector, Burlingame, USA; Konzentration 1:1000) in Trägerlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Vier dreiminütigen Waschschritten in PBST folgend, wurden die Schnitte für 60 Minuten in ein ABC-HRP-Kit (PK-4000, Vector, Burlingame, USA; Konzentration 1:100), gelöst in PBST bei Raumtemperatur, verbracht. ABC steht dabei für engl. *Avidin-Biotin-Complex*. Reagent A enthält Avidin, Reagent B enthält das biotinylierte Enzym Meerrettichperoxidase (Abk. HRP von engl. *horseradish peroxidase*). Durch das Zusammenführen der beiden Komponenten entsteht ein Komplex, welcher die starke Bindungsaffinität von Avidin und Biotin ausnutzt. Dabei können aus räumlichen Gründen nur drei Biotinmoleküle an das Avidin binden. Eine Bindungsstelle bleibt frei. Diese Biotinbindungsstelle verknüpft sich bei Zugabe des ABC-Kits mit dem biotinylierten, sekundären Antikörper. Durch die Verknüpfung der Komplexe mit dem sekundären Antikörper, kann im folgenden Schritt eine erhebliche Signalverstärkung erfolgen. Nach vier weiteren dreiminütigen Waschschritten in PBS, wurden die Schnitte für eine Minute

in einer DAB-Lösung inkubiert. Die Lösung bestand aus in bidestilliertem Wasser gelösten DAB-Tabletten (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 3%-igem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), welches kurz vor Verwendung zu der DAB-Lösung pipettiert wurde (20 ml bidestilliertes Wasser pro DAB-Tablette mit 40  $\mu$ l 3%-igem  $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  agiert als Substrat und bildet mit dem Enzym HRP einen Enzym-Substrat-Komplex. Die somit aktivierte HRP oxidiert anschließend das DAB, welches als Elektronendonator fungiert. Dadurch bilden sich unlösliche braune Präzipitate, welche die gewünschten Proteine sichtbar machen (siehe Abb. 6). Die DAB-Reaktion wurde nach einer Minute durch das Spülen mit bidestilliertem Wasser beendet.

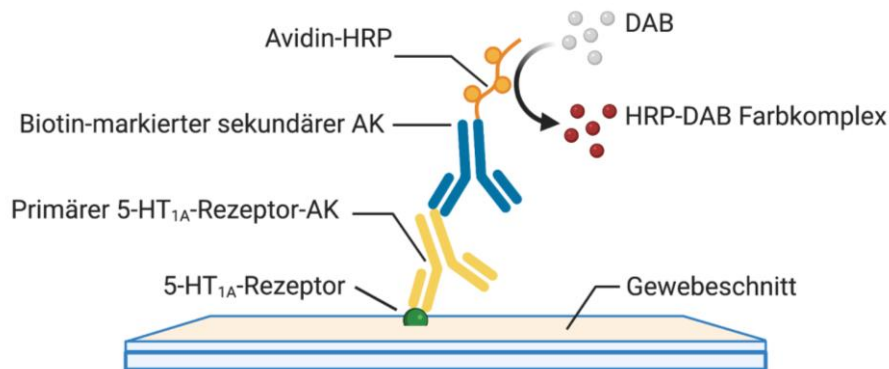


**Abbildung 5: Enzym-Substrat-Färbung am Tag 2 und 3 (eigene Abbildung erstellt mit BioRender.com).**

Die Gewebeschnitte wurden dann zweimal fünf Minuten in PBS gewaschen und mit PBS auf vorbehandelte, positiv geladene Superfrost™ Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) aufgezogen. Nach dem Trocknen an der Luft über Nacht wurden die Objektträger für eine Minute in Xylol verbracht und anschließend mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Menzel Deckgläsern Stärke 1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eingedeckt. Dabei dient Xylol als Intermedium dazu, die Verbindung von

Deckglas und Objektträger über das Kunststoffmedium Entellan zu ermöglichen (MULISCH et al., 2015).

Negativkontrollen ohne den primären Antikörper, wurden für jede Gruppe zeitgleich mit angefertigt. Ein detailliertes Protokoll der Enzym-Substrat-Färbung befindet sich im Anhang unter [Protokolle](#).



**Abbildung 6: Enzym-Substrat-Reaktion (eigene Abbildung erstellt mit BioRender.com).**

**AK: Antikörper, DAB: 3,3'-Diaminobenzidin, HRP: Meerrettichperoxidase.**

### Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung

Die Sichtbarkeit von Fluoreszenzfarbstoffen basiert auf der Anregung von Molekülen mit Licht bestimmter Wellenlänge beispielsweise mithilfe eines Lasers. Dieser Laser regt die Elektronen in den Fluorochromen an. Diese emittieren Licht mit einer größeren Wellenlänge als die Wellenlänge, mit welcher sie angeregt wurden. Mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops kann der Hintergrund der Färbung mithilfe von Lochblenden reduziert werden. Durch die Fokussierung einer bestimmten Ebene wird es auch bei verhältnismäßig dicken (> 10 µm) Gewebeschnitten möglich, scharfe und kontrastreiche Aufnahmen zu machen (MULISCH et al., 2015).

Zur Darstellung der Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in den Zellstrukturen, welche bei der Genese von Epilepsie und Stress involviert sind, wurde eine Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung mit folgenden Antikörpern durchgeführt:

- 1) Darstellung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors mit Anti-5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antikörper
- 2) Darstellung der Astrozyten mit Anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) -Antikörper
- 3) Darstellung der neuronalen Zellkerne mit Anti-NeuN (*neuronal nuclei*) -Antikörper

Parallel erfolgte die Gegenfärbung der Desoxyribonukleinsäure (DNA), also des Zellkerns, aller Zellen mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol). DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich spezifisch mit Doppelstrang-DNA verbindet und dann als Komplex sein Signal emittiert.

Hintergrund dieser Färbung war es, eine Kolokalisationsanalyse durchzuführen. Mit dieser sollte dargestellt werden, welche Zellen (Neurone oder Astroglia) den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor exprimieren. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, ob es mögliche Verschiebungen zugunsten eines Zelltyps durch die Epileptogenese oder durch die Stressbelastung gibt (siehe unten [Kolokalisationsanalyse](#)).

Bei der Auswahl der primären und sekundären Antikörper wurde Folgendes beachtet:

- 1) Damit zwei primäre Antikörper gleichzeitig verwendet werden konnten, wurde eine unterschiedliche Trägerspezies für diese ausgewählt. Bei der Auswahl der Trägerspezies wurde darüber hinaus darauf geachtet, dass sich diese zwischen Gewebe und primärem Antikörper unterscheidet. So wird vermieden, dass der Sekundäantikörper an die endogenen Immunglobuline des Gewebes bindet. Beide Maßnahmen reduzieren die nötigen Schritte im Prozess der immunhistochemischen Färbung (MULISCH et al., 2015).
- 2) Es wurde die gleiche Trägerspezies für die sekundären Antikörper ausgewählt, um die gleiche Trägerlösung mit dem Serum einer Spezies verwenden zu können.
- 3) Bei der Auswahl der sekundären Antikörper wurde außerdem darauf geachtet, dass sie mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen kombiniert sind. So wird sichergestellt, dass sich die emittierten Farbspektren nicht überlappen und gut voneinander differenziert werden können. Die Firma MoBiTec (MoBiTec GmbH, Göttingen) stellt hierfür die Informationen der sekundären Antikörper und den dazugehörigen Emissionsspektren zur Verfügung. In der folgenden Übersicht ist zu erkennen, dass die drei ausgewählten sekundären Antikörper unterschiedliche Farben beziehungsweise Farbspektren emittieren.

Primärer Antikörper (Trägerspezies)	Sekundärer Antikörper	Emissionsmaxima in Nanometer	Emittierte Farbe
Monoklonaler Anti-GFAP-Antikörper (Maus)	Polyklonaler Ziege-anti-Maus-Antikörper markiert mit Farbstoff Cyanine Dye 3 (Cy3)	570 nm	Grün-gelb
Polyklonaler Anti-5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor-Antikörper (Kaninchen)	Polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper markiert mit Farbstoff Alexa Fluor® 647 (AF 647)	668 nm	rot
Monoklonaler Anti-NeuN-Antikörper (Maus)	Polyklonaler Ziege-anti-Maus-Antikörper markiert mit Farbstoff Alexa Fluor® 488 (AF 488)	520 nm	grün

**Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Antikörper, Emissionsspektren und -farben.**

nm: Nanometer, AF: Alexa Fluor®.

Insgesamt wurden für die qualitative Betrachtung der Kollokalisierung jeweils sechs Tiere, zwei aus jeder Gruppe (Naiv, Sham, SE), für die beiden Post-SE-Modelle zufällig aus den Versuchsgruppen ausgewählt (<https://www.randomizer.org>). Die Färbung von Präparaten aus dem *Restraint*-Stressmodell, konnte aufgrund von Lieferschwierigkeiten des Antikörper-Herstellers nicht durchgeführt werden.

Die ersten Schritte der Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung (Waschen, HIER, Abkühlen, Waschen) wurden analog zur Enzym-Substrat-Färbung (siehe oben) durchgeführt. Darauffolgend wurden die Gewebeschnitte in dem gleichen Blockpuffer wie bei der Enzym-Substrat-Färbung für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurden die freischwebenden Gewebeschnitte gleichzeitig in den ersten primären Antikörpern (monoklonaler Maus-anti-GFAP-Antikörper, ab4648; Konzentration 1:1500 und polyklonaler Kaninchen-anti-5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antikörper, ab227165; Konzentration 1:500; beide Antikörper Firma Abcam, Cambridge, UK) in Trägerlösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag folgten vier dreiminütige Waschschrte in PBST. Danach wurden alle Schritte im Dunkeln durchgeführt, um die lichtempfindlichen, sekundären Antikörper vor der Lichteinwirkung zu schützen. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte in den sekundären Antikörpern (polyklonaler Ziege-anti-Maus-Antikörper markiert mit Cy3, ab97035, Abcam, Cambridge, UK; Konzentration 1:1000 und polyklonaler Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper markiert mit Farbstoff Alexa Fluor® 647, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; Konzentration 1:500) in Trägerlösung für eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem vierfachem dreiminütigem Waschen in PBST, wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C in dem dritten, primären Antikörper (monoklonaler Maus-anti-NeuN-Antikörper, MAB377, Merck Millipore, Burlington, USA; Konzentration: 1:500) in Trägerlösung inkubiert. Der dritte Tag begann mit vier dreiminütigen Waschschritten in PBST. Dann wurden die Schnitte in dem letzten sekundären Antikörper (polyklonaler Ziege-anti-Maus-Antikörper markiert mit Farbstoff Alexa Fluor® 488, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA; Konzentration 1:1000) in Trägerlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur verbracht. Es folgten zwei dreiminütige Waschschrritte in PBST und anschließend zwei dreiminütige Waschschrritte in PBS. Die DNA der Zellkerne wurde innerhalb von 30 Sekunden (s) mithilfe von DAPI-Arbeitslösung (Hoechst® 33342, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Farbstoff; Konzentration 0.2 µl/ml) gefärbt. Es folgten erneut drei dreiminütige Waschschrritte in PBS, um anschließend die Schnitte mit Chromgelatine auf die unbehandelten Objektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) aufzuziehen. Sobald die Schnitte nach etwa 15 Minuten auf der Heizplatte bei 45°C getrocknet waren, wurden sie mit einem Immunfluoreszenz-Eindeckmedium (DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland) und Menzel Deckgläsern Stärke 1,5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), abgedeckt. Diese wurden mit handelsüblichem Nagellack zum Luftausschluss an den Rändern fixiert. Bis zur Bildauswertung wurden die immunhistologischen Präparate im Kühlschrank gelagert. Eine Negativkontrolle ohne den primären Antikörper, wurde parallel zur Färbung angefertigt. Ein detailliertes Protokoll der Immunfluoreszenzfärbung befindet sich im Anhang unter [Protokolle](#).

#### **4. Kolokalisationsanalyse**

Bei der Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung wurden der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, die neuronalen Zellkerne (NeuN) und die Astrozyten (GFAP) sichtbar gemacht sowie die DNA der Zellen (DAPI) gegengefärbt (siehe [Immunhistochemische Färbungen](#)). Mit der Mehrfachfärbung kann optisch ein erster Eindruck über die Lokalisation der zu untersuchenden Struktur gewonnen werden. Von einer Kolokalisation zweier Strukturen kann gesprochen werden, wenn diese sich in der gleichen zellulären Struktur, beispielsweise der Plasmamembran, befinden (DUNN et al., 2011).



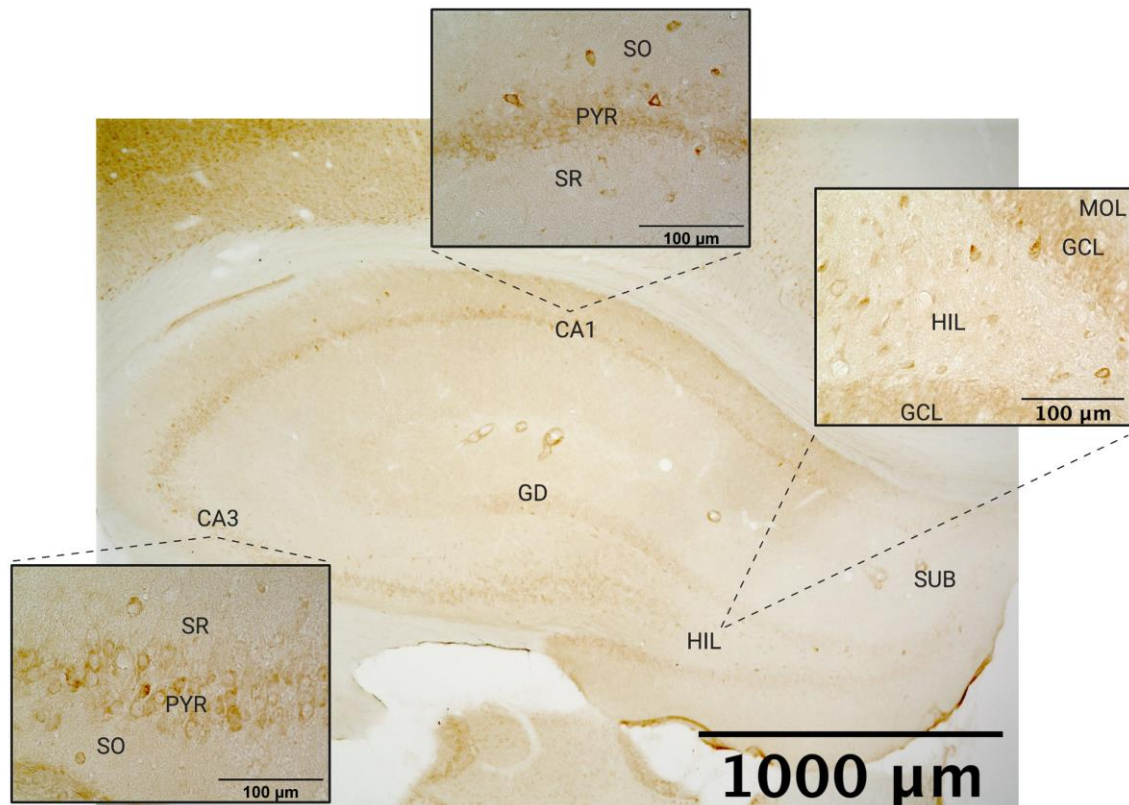
Die qualitative Auswertung der Kollokalisierung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors mit den neuronalen und astrozytären Zellmarkern (NeuN und GFAP) erfolgte mithilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops Typ LSM 880 mit Airyscan (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) und der dazugehörigen Software ZEN (ZEN Digital Imaging for Light Microscopy – Black edition Version 2.3). Das verwendete Objektiv war das C-Apochromat-Objektiv 40x/1.20 W und die Rahmengröße der Bildaufnahme betrug 1024x1024 Pixel. Aus dieser Aufnahme wurde ein einzelnes Neuron ausgeschnitten und eine Z-Bildstapel-Aufnahme getätigt. Diese Aufnahme ermöglicht eine dreidimensionale Darstellung der Strukturen. So kann eine qualitative Aussage über die Kollokalisierung getroffen werden.

## 5. Bildanalyse

Für die Aufnahmen im Rahmen der Bildanalyse wurden die Enzym-Substrat-gefärbten Präparate verwendet. In bestimmten Grenzen der Proteinkonzentration kann von einer linearen Beziehung der Intensität der Enzym-Substrat-Färbung und der Proteinkonzentration ausgegangen werden. Im Gegensatz zu Immunfluoreszenz-gefärbten Präparaten, deren Haltbarkeit sehr limitiert ist, bietet die Enzym-Substrat-Färbung eine stabile Markierung der Zielstruktur.

Die Auswahl der anatomischen Regionen für die Bildanalyse erfolgte aufgrund der Ergebnisse der  $\mu$ PET-Studien unserer Arbeitsgruppe von BUCHECKER et al. (2020), DI LIBERTO et al. (2018) und VAN DIJK et al. (2018). Dabei zeigte sich im *Restraint-Stress*modell in der Transportgruppe gegenüber den naiven Tieren ein erhöhtes Bindungspotential des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antagonisten [<sup>18</sup>F]MPPF im *Hippocampus* (BUCHECKER et al., 2020). In den Post-SE-Modellen wurde ein erhöhtes [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotential im *Septum* der SE-Tiere im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt (DI LIBERTO et al., 2018; VAN DIJK et al., 2018).

Aufgrund der Elektrodenimplantation in verschiedenen Lokalisationen der rechten Hirnhemisphäre (*Amygdala*, *Gyrus dentatus*) in den Post-SE-Modellen, wurde zur Vergleichbarkeit der erhobenen Daten jeweils die linke Seite des *Hippocampus* ausgewertet. Die rechte Seite wurde aufgrund des potentiellen Einflusses und einer möglichen Verzerrung der Ergebnisse durch die Elektrodenimplantation nicht ausgewertet.



**Abbildung 7:** Exemplarische Darstellung des *Hippocampus* (4-fache Vergrößerung) mit dazugehörigen Subregionen (40-fache Vergrößerung) (eigene Abbildung erstellt mit BioRender.com).

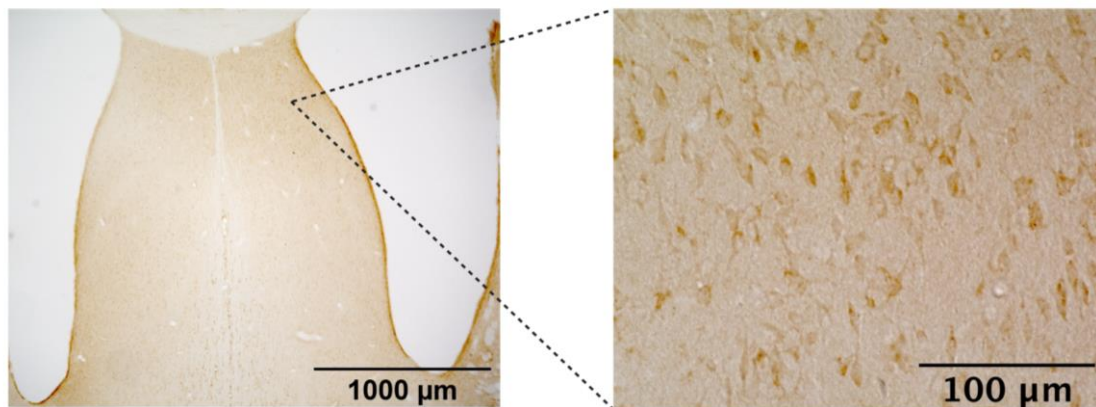
**CA:** *Cornu ammonis*, **GD:** *Gyrus dentatus*, **HIL:** *Hilus*, **SUB:** *Subiculum*, **SR:** *Stratum radiatum*, **SO:** *Stratum oriens*, **PYR:** *Stratum pyramidale*, **MOL:** *Stratum moleculare*, **GCL:** *Stratum granulare*.

Zusammenfassend wurde die Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in den folgenden Hirnregionen analysiert:

- linke Seite des *Hippocampus*
  - *Stratum pyramidale* der CA1
  - *Stratum pyramidale* der CA3
  - *Stratum granulare* des GD
  - *Hilus* des GD
- beide Seiten des lateralen *Septums*

Die Bildaufnahmen erfolgten im *Septum* von *Bregma* +1.56 mm bis +0.12 mm und im *Hippocampus* von *Bregma* -2.46 mm bis -4.5 mm nach den Angaben aus dem Atlas von PAXINOS und WATSON (2007). Die Bilder wurden in jeder dieser Regionen mit einem Mikroskop mit dem Kamera-Modell BZ-X710 und der korrespondierenden Software BZ-X-

Viewer aufgenommen (KEYENCE GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland). Die Einstellungen (1/3000 s Belichtungszeit, durchfallendes Licht 75%, Schatten 71, Highlight 126, Gammawert 1.8, 24-bit Bild) wurden gespeichert und für alle Bildaufnahmen in das Programm geladen und verwendet. Übersichtsaufnahmen wurden in 4-facher Vergrößerung aufgenommen, um die gleichmäßige Intensität der Färbung zu bewerten. Die Bildaufnahmen für die weitere Analyse wurden in 40-facher Vergrößerung aufgenommen (siehe Abb. 7 und 8). Dabei wurden anatomisch wiedererkennbare Strukturen verwendet, um in jedem Schnitt systematisch die gleichen Stellen für die Bildaufnahme zu verwenden. Im lateralen *Septum* wurden jeweils vier Aufnahmen, in der hippocampalen CA1-Region drei, in der hippocampalen CA3-Region zwei, im GD fünf und im *Hilus* zwei Bildaufnahmen getätigt.

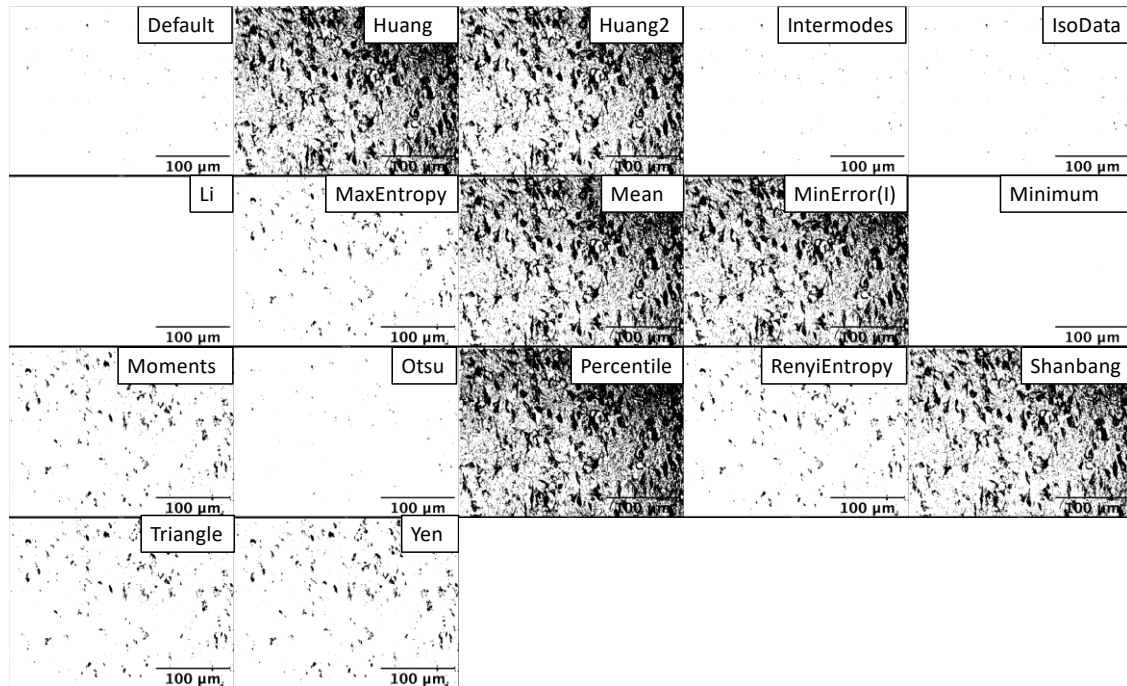


**Abbildung 8:** Exemplarische Darstellung des *Septums* (4-fache Vergrößerung) mit Aufnahme im lateralen Bereich des Schnittpräparates (40-fache Vergrößerung) (eigene Abbildung erstellt mit BioRender.com).

Die frei verfügbare Software Fiji Version 2.0.0-rc-69/1.52p (SCHINDELIN et al., 2012) wurde für die Bildanalyse verwendet. Vor Beginn der Analyse wurde das Programm kalibriert. Dazu wurde mithilfe eines Referenzrasters die Größenangabe in µm definiert. Darüber hinaus wurde das Programm mithilfe von Messungen in einer Grauwertskala auf die Ermittlung von Graustufenwerten kalibriert. Dieses war für die Auswertung der optischen Dichte (siehe unten) notwendig.

Für die eigentliche Analyse wurden die Bilder in 8-bit Graustufenbilder digitalisiert. Durch das Setzen eines Schwellenwertes entsteht ein segmentiertes, binäres Bild (gefärbte Struktur und Hintergrund), anhand dessen anschließend Messungen durchgeführt werden können (HOWARD und REED, 2005). Es stehen mehrere Schwellenwert-Methoden zur Verfügung. Die manuelle Methode setzt den Schwellenwert für jedes Bild

individuell und subtrahiert die Standardabweichung vom Mittelwert der Graustufen. Der errechnete Wert, wird dann als individueller Schwellenwert für das jeweilige Bild verwendet. Des Weiteren existieren zahlreiche automatisierte Methoden. Das Programm Fiji bietet die Möglichkeit, sich mithilfe der *Auto Threshold*-Funktion einen Überblick über die verfügbaren Methoden zu verschaffen (siehe Abb. 9).



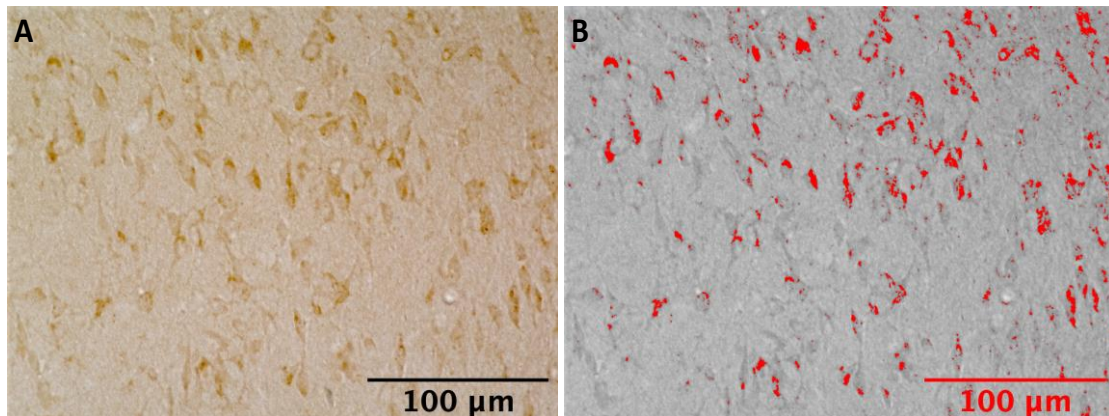
**Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der automatischen Schwellenwert-Methoden in Fiji (eigene Abbildung).**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die automatische Methode für das Setzen des Schwellenwertes genutzt. Mithilfe der Übersicht aus dem *Auto Threshold* wurden drei Methoden ausgewählt und anhand einiger Beispielbilder für die untersuchten Modelle getestet. Auf Basis dieser Pilot-Auswertung wurde die *Triangle*-Methode ausgewählt, da diese sich am besten eignete, um zuverlässig die gefärbte Struktur zu markieren (siehe Abb. 10).

Für die hier durchgeführte Analyse waren folgende Werte von Interesse:

- 1) Optische Dichte (OD): Der Wert „*Mean*“ in der Software Fiji entspricht dem mittleren Wert der Graustufen in der markierten Region. Er berechnet sich als Summe der Graustufen aller hervorgehobenen Pixel durch die Gesamtanzahl der Pixel.
- 2) Flächendichte ( $A_A$ ): Dieser Wert entspricht der spezifisch markierten Fläche in der zu untersuchenden Region im Verhältnis zu der gesamten analysierten Fläche.

Einige Schnitte mussten aufgrund von Artefakten exkludiert werden (siehe Tabelle 4 im Abschnitt [Qualitative Auswertung der angefertigten Färbungen](#)).



**Abbildung 10:** Exemplarische Darstellung der Bildanalyse (40-fache Vergrößerung). (A) Originalaufnahme im lateralen *Septum*. (B) Graustufenbild mit automatischem Schwellenwert - *Triangle*-Methode (eigene Abbildung).

## 6. Stereologische Volumenbestimmung

Wie bereits in der Literaturübersicht erläutert, können Dichtemessungen nicht in direkten Bezug zueinander gesetzt werden, da sie dimensionslose Werte sind und die Größe des Referenzraumes missachtet wird. Demzufolge ist die Ermittlung des Referenzvolumens notwendig, um die ermittelten Flächendichtewerte vergleichen zu können. Im Gegensatz dazu steht der Begriff „*Region of interest*“, der oft in der Bildanalyse verwendet wird und sich auf jegliche Regionen beziehen kann. Bei der stereologischen Volumenbestimmung wird vom „Referenzraum“ gesprochen. Dieser bezeichnet eine anatomisch und funktionell definierte Struktur (MOUTON, 2011).

Für die stereologische Volumenschätzung wurde die Software Stereo Investigator® Version 2017.03.3 (MBF Bioscience, Williston, VT, USA) und ein Mikroskop Typ DMLB (Leica, Wetzlar, Deutschland) mit einer Kamera (MBF CX9000, MBF Bioscience, Williston, VT, USA) verwendet. Das Prinzip von CAVALIERI (1635) besagt, dass das Volumen einer Region oder eines Organs mithilfe von parallelen Schnitten mit einem bekannten Abstand zueinander bestimmt werden kann (GUNDERSEN und JENSEN, 1987; MOUTON, 2014; OCHS, 2015). Mithilfe der Software konnten drei bis fünf konsekutive Schnitte der Serie ausgewertet werden. Dazu wurde der anatomische Referenzraum in der 5-fachen Vergrößerung umrandet, um dann in der 40-fachen Vergrößerung mithilfe eines Punkterasters die entsprechende Region zu markieren.

Im Vorfeld der Analyse wurde in Anlehnung an die Beschreibung von WEIBEL (1979) definiert, dass ein Trefferpunkt die Ecke des oberen rechten Quadranten des Kreuzes ist. Die Software ermittelte mit den Informationen, Schnittdicke  $\bar{t}$ , Summe der gemessenen Punkte  $\sum P_i$  und deren Fläche  $a(p)$ , das Gesamtvolumen der Region mithilfe der Formel  $V_{Ref} = \bar{t} * \sum P_i * a(p)$  (GEINISMAN et al., 1996). Durch die Verwendung von verschiedenen Markern für die jeweiligen Regionen, konnte die Analyse parallel für mehrere anatomische Regionen durchgeführt werden. Das Volumen des Referenzraumes wurde in Kubikmikrometer ( $\mu\text{m}^3$ ) ermittelt.

Alle erhobenen Werte (OD,  $A_A$ ,  $V_{Ref}$ ) wurden für die weiteren statistischen Analysen in Microsoft Excel® für Mac (Version 16.40) exportiert. Die Daten wurden verblindet erhoben, das heißt ohne dass Kenntnis über die Gruppenzugehörigkeit bestand. Erst nach dem Datentransfer in Excel® wurde die Gruppenzugehörigkeit für die nachfolgenden statistischen Analysen erfasst.

## 7. Rezeptorvolumen

In einem immunhistologisch gefärbten Präparat ist das gefärbte Objekt als Fläche auf dem Hintergrund erkennbar. Dies ist die sogenannte Flächendichte  $A_A$ . Nach dem [Prinzip von Delesse](#) ist die Flächendichte  $A_A$  proportional zur Volumendichte  $V_V$ . Werte für  $A_A$  wurden mithilfe der [Bildanalyse](#) ermittelt. Die Werte für das Volumen des Referenzraumes wurde stereologisch bestimmt (siehe vorheriger Abschnitt).

Um das Gesamtvolumen des Rezeptors im Referenzraum zu ermitteln wurde die Volumendichte mit dem Volumen des Referenzraumes in Microsoft Excel® multipliziert (PAKKENBERG und GUNDERSEN, 1997; HOWARD und REED, 2005; WEST, 2012):

$$V_{\text{Total}} = V_V * V_{\text{Ref}}$$

## 8. Statistik

Für die Volumenschätzung mithilfe der CAVALIERI (1635) Methode kann der Fehlerkoeffizient (CE) ermittelt werden. Dieser berechnet sich anhand der Summe der ausgezählten Punkte, welche die Referenzstruktur getroffen haben und 3 weiteren Summenwerten:

$$\sum P = \sum_{i=1}^m P_i$$

$$a = \sum_{i=1}^m P * P_i$$

$$b = \sum_{i=1}^{m-1} P * P_{i+1}$$

$$c = \sum_{i=1}^{m-2} P_i * P_{i+2}$$

Mithilfe dieser Werte kann nach GUNDERSEN und JENSEN (1987) anhand der folgenden Formeln die Varianz des Ergebnisses und der CE der Volumenschätzung ermittelt werden:

$$Var_{SRS} = \frac{1}{12} * (3a + c - 4b)$$

$${}_{est}CE^2(\hat{V})_{GJ} = \frac{1}{\sum P} * \left( \frac{1}{12} * (3a + c - 4b) \right)^{1/2}$$

Ein Korrekturfaktor  $m$  kann verwendet werden, um eine genauere Schätzung für sphärische Körper zu erhalten ( $m = 1$ ) (BASLER et al., 2017). Die originale Formel nach GUNDERSEN und JENSEN (1987) geht von dem Korrekturfaktor  $m = 0$  aus, welcher auch für die hier durchgeführte Analyse verwendet wurde. Die Entscheidung  $m = 0$  auszuwählen, basierte auf den Erkenntnissen von SLOMIANKA und WEST (2005) und BASLER et al. (2017). Diese Autoren beschrieben für die CA1-Region und in Subregionen des GD, dass sich  $m = 0$  besser für die Schätzung des Volumens dieser Regionen eignet. Der Fehlerkoeffizient kann genutzt werden, um mithilfe einer Pilotstudie zu ermitteln, wie viele Punkte ausgezählt werden müssen. Umso mehr Punkte gezählt werden, desto kleiner wird die Varianz und der CE (HOWARD und REED, 2005; BASLER et al., 2017; LIU et al., 2020). Der CE wurde mithilfe der Software Stereo Investigator® berechnet und für alle untersuchten Gruppen im Mittel dargestellt (siehe Anhang [Fehlerkoeffizienten der Volumenbestimmung des Referenzraumes nach Cavalieri](#)).

Statistische Ausreißer für OD, A<sub>A</sub>, V<sub>Ref</sub> und V<sub>Total</sub> wurden für jede Gruppe mithilfe des Grubbs' Test für Ausreißer identifiziert

(<https://www.graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). Dieser Test berechnet über den Mittelwert und die Standardabweichung die Entfernung des untersuchten Wertes zu den restlichen Werten. War einer der Parameter innerhalb der Gruppe ein Ausreißer wurde dieser von der Datenanalyse exkludiert.

Für die statistische Datenanalyse wurde RStudio Version 1.2.1335 (R CORE TEAM, 2020) verwendet. Die Nullhypothese  $H_0$  der statistischen Auswertung besagt, dass kein Unterschied zwischen den drei experimentellen Gruppen besteht. Die Alternativhypothese  $H_A$  widerlegt diese Aussage (PUHANI, 2020). Um die Nullhypothese zu bestätigen oder abzulehnen wurde in der jeweiligen Hirnregion eine einfaktorische Varianzanalyse (Abk. ANOVA von *engl. one-way analysis of variance*) mit anschließender Bonferroni-Korrektur durchgeführt. P-Werte  $< .05$  wurden als statistisch signifikant erachtet. Zusätzlich wurden die Ergebnisse mithilfe der Analyse in GraphPad Prism (Version 5.04; GraphPad, San Diego, CA, USA) bestätigt. Die grafische Darstellung der Daten erfolgte als Kastengrafik (*engl. Box-Plot*) unter Verwendung des R-Paketes ggplot (WICKHAM, 2016).

In den vorangegangenen Projekten wurden für die Post-SE-Modelle verschiedene biochemische Parameter und Verhaltensparameter analysiert (siehe auch [Parameter der Belastungseinschätzung](#)). Für die Ermittlung der Korrelation der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression mit diesen Parametern wurde RStudio Version 1.2.1335 (R CORE TEAM, 2020) verwendet. Das Gewebe für die Auswertung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression im *Restraint*-Stressmodell stammt von Tieren, die in der  $\mu$ PET-Studie von BUCHECKER et al. (2020) verwendet wurden. Daher konnte für dieses Modell geprüft werden, ob eine Korrelation der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression mit den  $\mu$ PET-Daten vorliegt. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten  $r$  erfolgte mit der Methode nach *Spearman*. Der Korrelationskoeffizient reicht von +1 (positive Korrelation) bis -1 (negative Korrelation). Eine Korrelation lag bei einem Koeffizienten  $r$  größer als +0.5 oder kleiner als -0.5 vor. Zur Visualisierung wurde das R-Paket *corrplot* verwendet (WEI und SIMKO, 2017). Die entsprechenden [R-Skripte](#) befinden sich im Anhang.



## V. ERGEBNISSE

### 1. Qualitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Zunächst wurde sowohl makroskopisch als auch in der 4-fachen Vergrößerung überprüft, ob die Anfärbung der Schnittpräparate homogen war und ob eine spezifische Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in der Plasmamembran der Zellen zu lokalisieren war (siehe Abb. 7 und 8). Einige Gehirne und Subregionen der Gehirne konnten aufgrund von Artefakten oder inhomogener Färbung nicht analysiert werden (siehe Tabelle 4).

Modell	Anzahl Gehirne	Exkludierte Gehirne	Exkludierte Gehirn-Subregionen
<i>Restraint-Stressmodell</i>	20	0	0
<i>Post-SE-Modell (elektrisch)</i>	36	2	2x <i>Septum</i> 1x GD 1x <i>Hilus</i>
<i>Post-SE-Modell (chemisch)</i>	39	6	2x <i>Septum</i> 1x CA3

**Tabelle 4: Übersicht der verwendeten und analysierten Gehirne und Gehirn-Subregionen.**

**SE: Status Epilepticus, GD: Gyrus dentatus CA3: Cornu ammonis 3.**

Die Auswertung der Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung erfolgte für alle gefärbten Gehirne der jeweiligen Versuchsgruppen der beiden Post-SE-Modelle. Dabei lag der Fokus der Auswertung, wie auch bei der Bildanalyse der Enzym-Substrat-Färbung, auf den hippocampalen Subregionen und dem *Septum*. Ein immunpositives Signal konnte in der Plasmamembran der Zellen im *Septum* dargestellt werden. In den hippocampalen Subregionen war ein immunpositives Signal vor allem im *Stratum pyramidale* von CA1 und 3, dem *Stratum granulare* des *Gyrus dentatus* sowie in einzelnen Neuronen im *Hilus* zu detektieren. Die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression war in ihrer Ausprägung zwischen den Gruppen in den untersuchten Tiermodellen vergleichbar. Auf subzellulärer Ebene wurde der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor vor allem in der Plasmamembran der Neurone exprimiert. Eine Kolo-kalisation von NeuN und dem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor konnte mit Z-Stapel-Aufnahmen bestätigt werden (siehe Abb. 11). Diese ermöglichen die dreidimensionale Darstellung der verschiedenen Strukturen (x-, y- und z-Ebene). Zusammenfassend konnte mit diesen

Ergebnissen die spezifische Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in der Plasmamembran der Neurone bestätigt werden. Für den Astroglia-Marker GFAP konnte in der Doppelmarkierung nur ein sehr schwaches Signal detektiert werden, sodass keine qualitative Auswertung durchgeführt werden konnte. Aufgrund von Lieferschwierigkeiten des Anti-5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antikörpers seitens des Herstellers, konnte diese Färbung nicht wiederholt und die Konzentration des Anti-GFAP-Antikörpers für die Doppelmarkierung nicht angepasst werden.

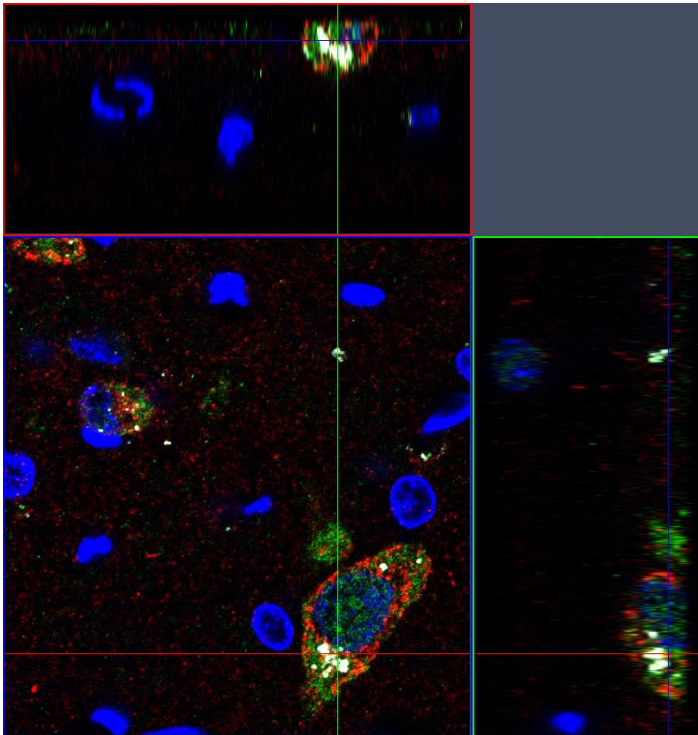


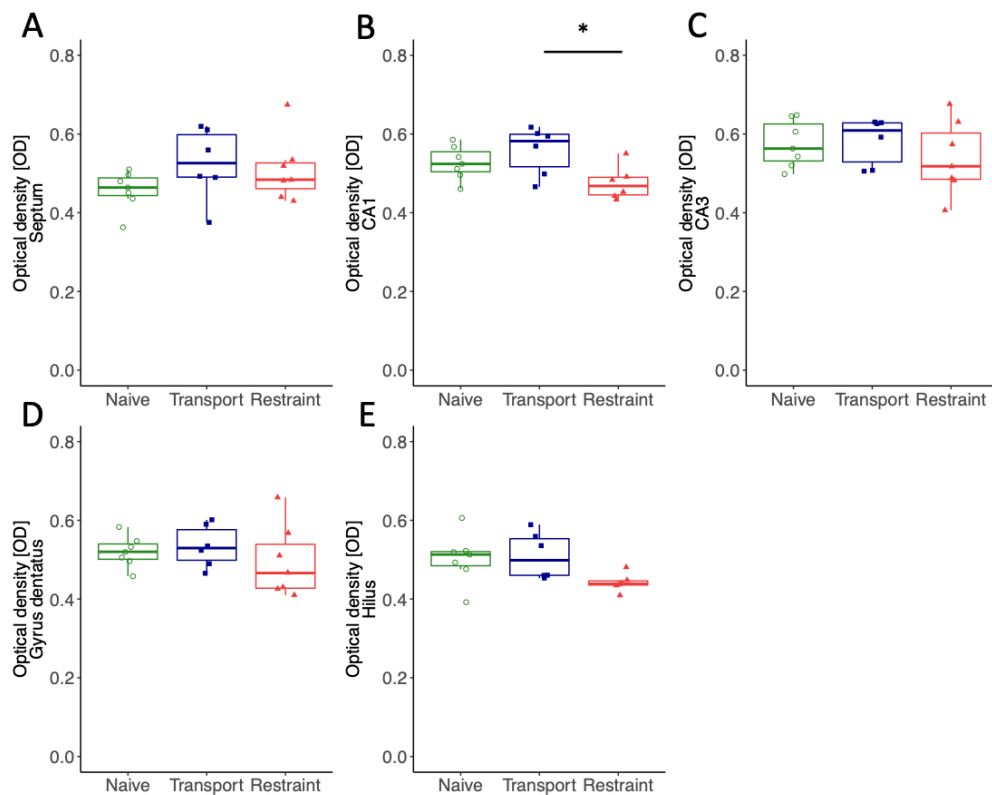
Abbildung 11: Exemplarische Z-Stapel-Aufnahme eines Neurons im *Hilus* (chemisches Post-SE-Modell), welche die Kollaboration des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in den neuronalen Zellen bestätigt (Ausschnitt aus einer Aufnahme in 40-facher Vergrößerung). Rot – 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, Grün – NeuN, Weiß – GFAP, Blau – DAPI.

## 2. 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression im *Restraint*-Stressmodell

Die Enzym-Substrat-Färbung stellte die Basis für die Quantifizierung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors dar. Als Erstes wurde die optische Dichte (OD) des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors ermittelt, um Auskunft über eine potentielle Hoch- oder Herunterregulierung des Rezeptors in den Zellen zu erhalten.

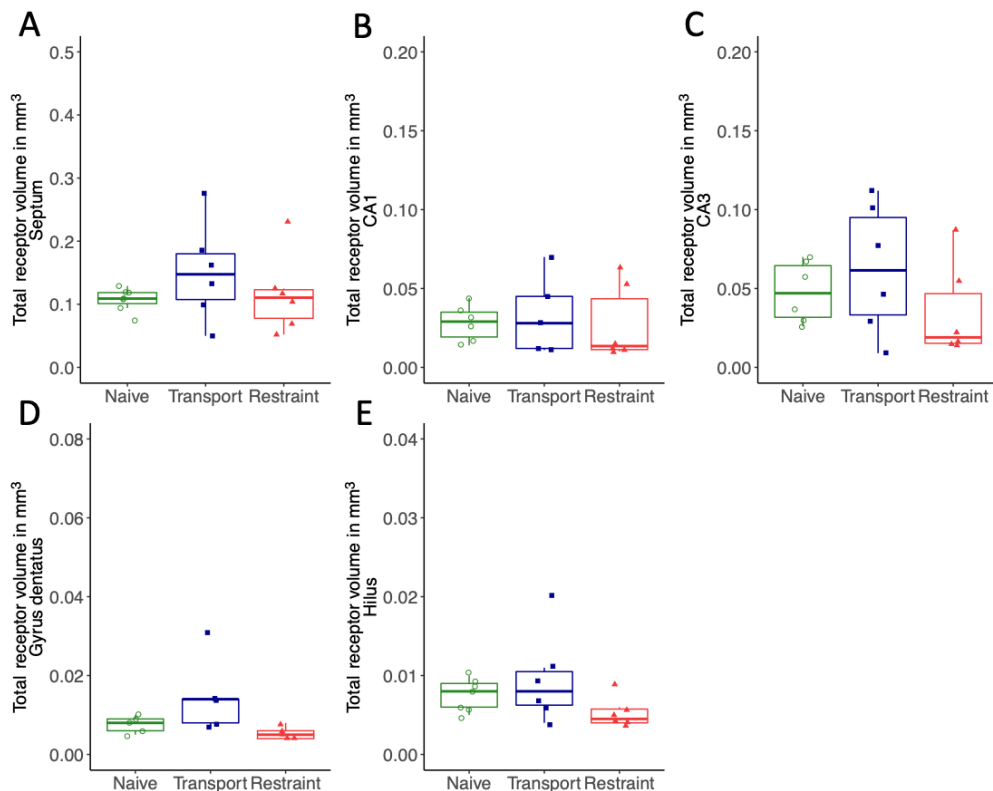
Im *Restraint*-Stressmodell zeigten die Tiere, welche den beiden Stressoren Transport und *Restraint* ausgesetzt wurden in der hippocampalen CA1-Region eine reduzierte optische Dichte im Vergleich zur Kontrollgruppe, die lediglich den Transport als Stressor erfahren hatte ( $F(2, 16) = 4.20, p = .0343$ ; siehe Abb. 12B). In den anderen untersuchten

Hirnregionen konnte kein Unterschied der optischen Dichte der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression zwischen den experimentellen Gruppen festgestellt werden (siehe Abb. 12A, C, D, E).



**Abbildung 12: Optische Dichte (OD) der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression im *Restraint*-Stressmodell in verschiedenen Hirnregionen. (A) *Septum* ( $F(2, 17) = 1.46, p = .26$ ). (B) *CA1* ( $F(2, 16) = 4.20, p = .0343$ ). (C) *CA3* ( $F(2, 17) = 0.65, p = .535$ ). (D) *Gyrus dentatus* ( $F(2, 17) = 0.60, p = .56$ ). (E) *Hilus* ( $F(2, 16) = 3.08, p = .0741$ ). Verwendung der einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur für jede Paarkombination zum Vergleich experimenteller Gruppen. Signifikante Unterschiede werden durch einen Asteriskus (\*) dargestellt.**

Um eine absolute Angabe des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorvorkommens in den untersuchten Regionen machen zu können, wurde das absolute Rezeptorvolumen ( $V_{\text{Total}}$ ) bestimmt. Im *Restraint*-Stressmodell waren die Werte für  $V_{\text{Total}}$  zwischen den Gruppen in den ausgewerteten Hirnregionen vergleichbar (siehe Abb. 13A-E).

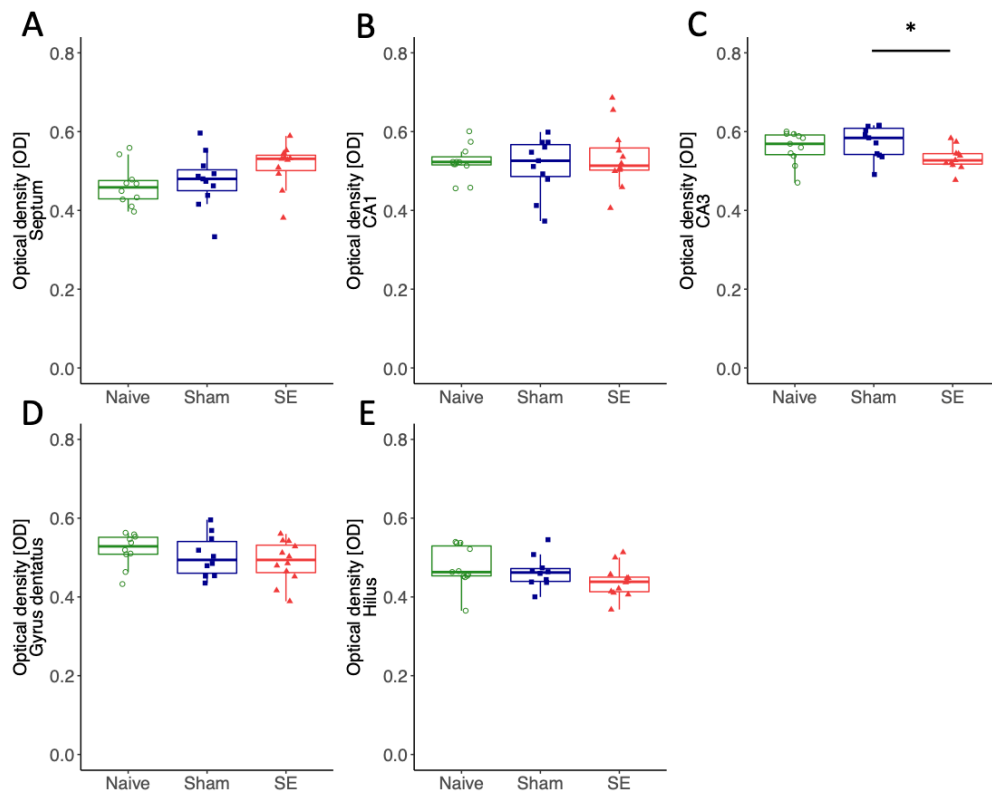


**Abbildung 13: Absolutes 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorvolumen ( $V_{Total}$ ) im *Restraint*-Stressmodell in verschiedenen Hirnregionen. (A) *Septum* ( $F(2, 16) = 1.03, p = .38$ ). (B) *CA1* ( $F(2, 14) = 0.13, p = .884$ ). (C) *CA3* ( $F(2, 15) = 1.16, p = .341$ ). (D) *Gyrus dentatus* ( $F(2, 12) = 3.63, p = .0584$ ). (E) *Hilus* ( $F(2, 16) = 2.06, p = .16$ ).**

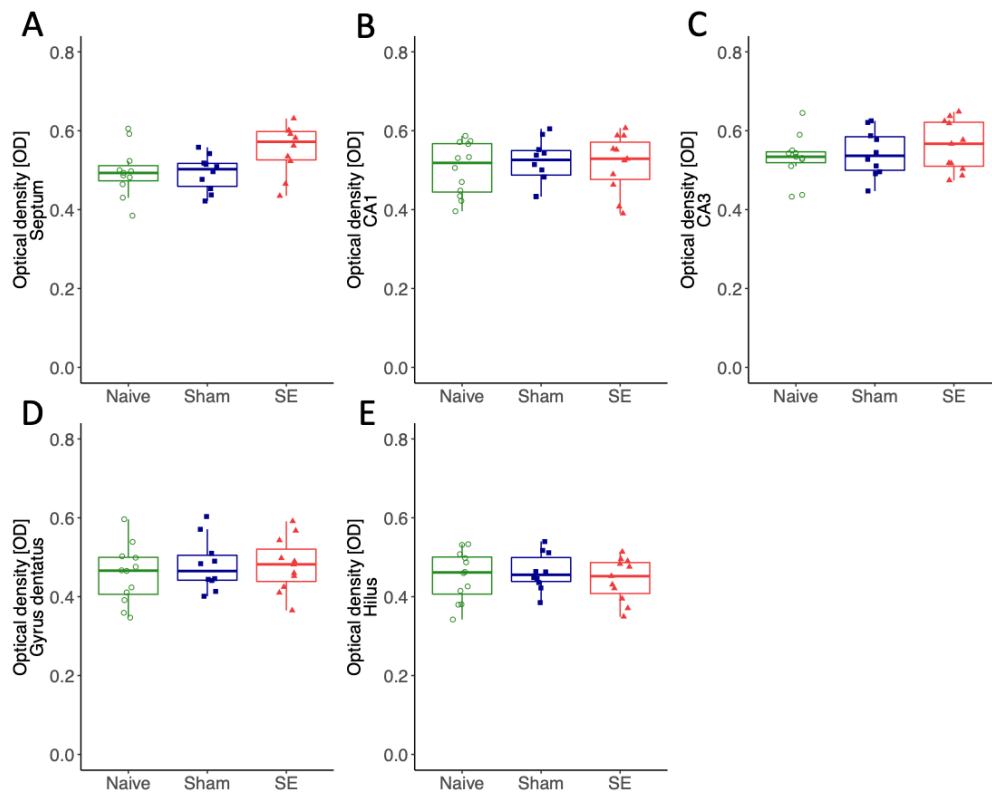
Verwendung der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur für jede Paarkombination zum Vergleich experimenteller Gruppen. Signifikante Unterschiede werden durch einen Asterisk (\*) dargestellt.

### 3. 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression in den Epilepsiemodellen

Im elektrischen Post-SE-Modell war die optische Dichte in der CA3-Subregion des *Hippocampus* bei den SE-Tieren im Vergleich zur *Sham*-Gruppe verringert ( $F(2, 30) = 3.45, p = .0449$ ; siehe Abb. 14C). In den anderen Regionen, welche ausgewertet wurden, konnte im elektrischen Post-SE-Modell kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (siehe Abb. 14A, B, D, E). Im chemischen Post-SE-Modell wurden keine Unterschiede der optischen Dichte zwischen den Gruppen in den evaluierten Hirnregionen detektiert (siehe Abb. 15A-E).

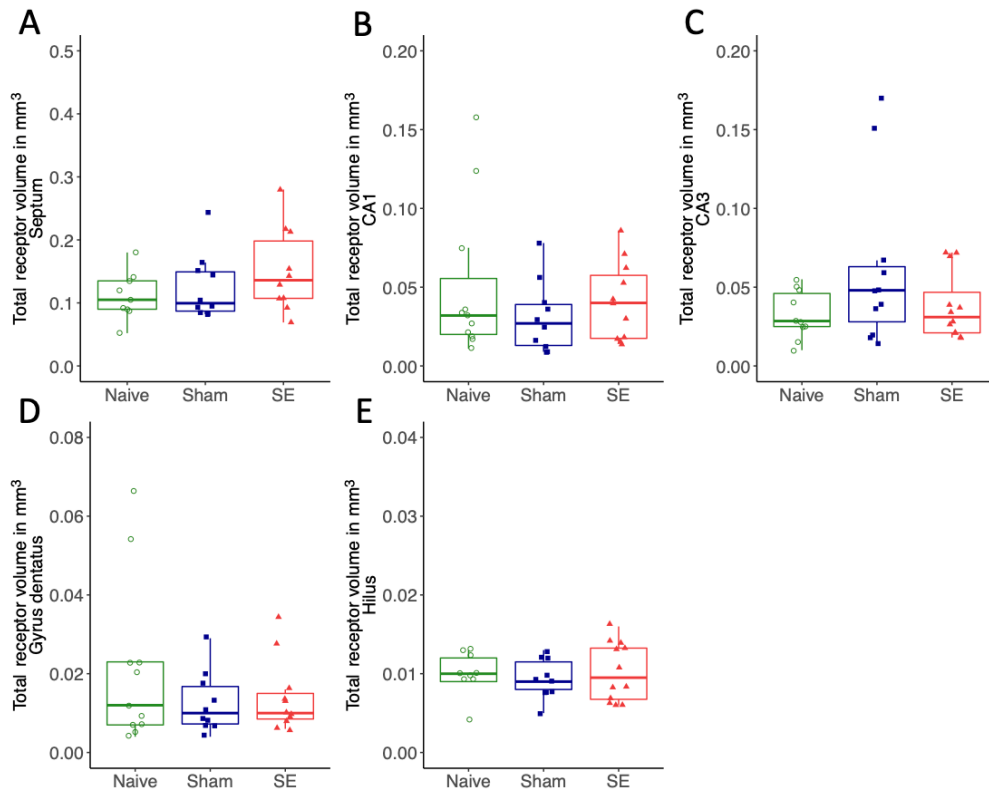


**Abbildung 14: Optische Dichte (OD) der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression im elektrischen Post-SE-Modell in verschiedenen Hirnregionen. (A) *Septum* ( $F(2, 29) = 1.97, p = .157$ ). (B) *CA1* ( $F(2, 31) = 0.28, p = .76$ ). (C) *CA3* ( $F(2, 30) = 3.45, p = .0449$ ). (D) *Gyrus dentatus* ( $F(2, 29) = 0.96, p = .395$ ). (E) *Hilus* ( $F(2, 30) = 2.16, p = .134$ ). Verwendung der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur für jede Paarkombination zum Vergleich experimenteller Gruppen. Signifikante Unterschiede werden durch einen Asteriskus (\*) dargestellt.**

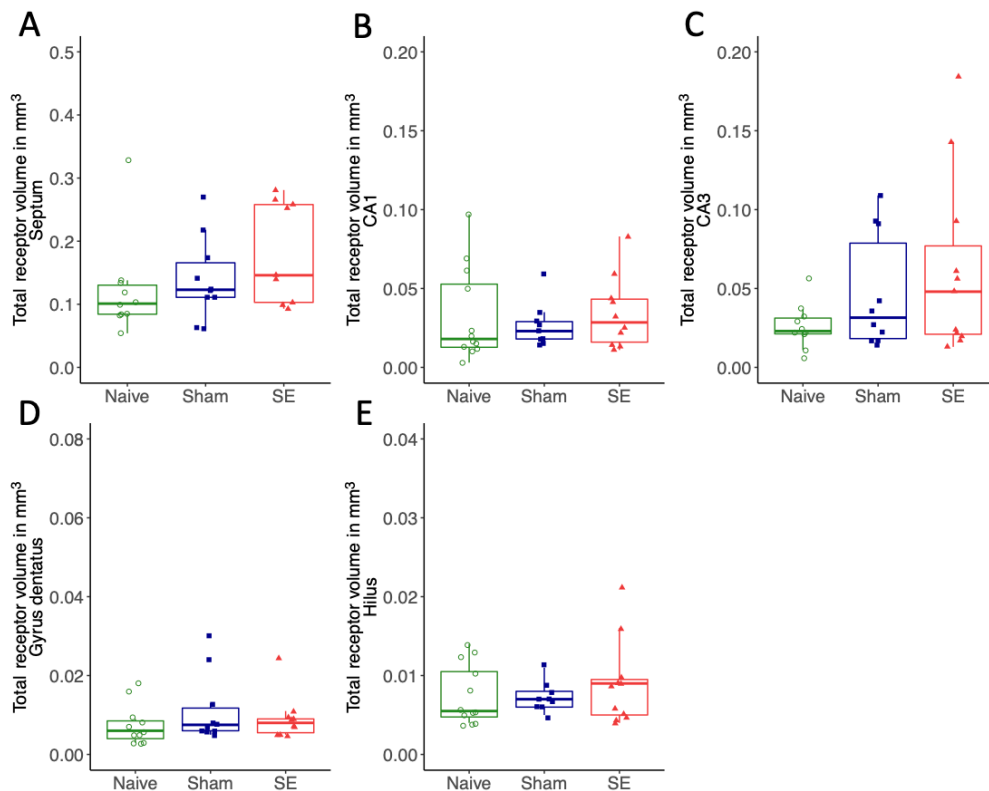


**Abbildung 15: Optische Dichte (OD) der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression im chemischen Post-SE-Modell in verschiedenen Hirnregionen. (A) *Septum* ( $F(2, 28) = 3.42, p = .0469$ ). (B) *CA1* ( $F(2, 30) = 0.20, p = .817$ ). (C) *CA3* ( $F(2, 29) = 0.65, p = .528$ ). (D) *Gyrus dentatus* ( $F(2, 30) = 0.46, p = .639$ ). (E) *Hilus* ( $F(2, 30) = 0.33, p = .721$ ). Verwendung der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur für jede Paarkombination zum Vergleich experimenteller Gruppen. Signifikante Unterschiede werden durch einen Asteriskus (\*) dargestellt.**

Für das absolute 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorvolumen  $V_{\text{Total}}$  konnten weder im elektrischen (siehe Abb. 16A-E) noch im chemischen (siehe Abb. 17A-E) Post-SE-Modell Unterschiede zwischen den evaluierten Gruppen in den untersuchten Hirnregionen festgestellt werden.



**Abbildung 16: Absolutes 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorvolumen ( $V_{\text{Total}}$ ) im elektrischen Post-SE-Modell in verschiedenen Hirnregionen. (A) *Septum* ( $F(2, 26) = 1.38, p = .027$ ). (B) *CA1* ( $F(2, 29) = 0.83, p = .444$ ). (C) *CA3* ( $F(2, 30) = 2.15, p = .135$ ). (D) *Gyrus dentatus* ( $F(2, 29) = 1.09, p = .349$ ). (E) *Hilus* ( $F(2, 28) = 0.18, p = .835$ ). Verwendung der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur für jede Paarkombination zum Vergleich experimenteller Gruppen. Signifikante Unterschiede werden durch einen Asterisk (\*) dargestellt.**



**Abbildung 17: Absolutes 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorvolumen ( $V_{Total}$ ) im chemischen Post-SE-Modell in verschiedenen Hirnregionen. (A) *Septum* ( $F(2, 26) = 1.60, p = .0222$ ). (B) *CA1* ( $F(2, 28) = 0.28, p = .755$ ). (C) *CA3* ( $F(2, 28) = 2.08, p = .143$ ). (D) *Gyrus dentatus* ( $F(2, 28) = 0.85, p = .439$ ). (E) *Hilus* ( $F(2, 29) = 0.50, p = .615$ ).**

Verwendung der einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni-Korrektur für jede Paarkombination zum Vergleich experimenteller Gruppen. Signifikante Unterschiede werden durch einen Asteriskus (\*) dargestellt.

#### 4. Vergleich der ermittelten Parameter mit den Ergebnissen der $\mu$ PET-Studien

In der  $\mu$ PET-Studien unserer Arbeitsgruppe war im *Restraint*-Stressmodell das [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotential im *Hippocampus* in der Transport-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (BUHECKER et al., 2020). In den Post-SE-Modellen war das [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotential der SE-Gruppe im *Septum* im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe (VAN DIJK et al., 2018) beziehungsweise zu beiden Kontrollgruppen (DI LIBERTO et al., 2018) erhöht. Die  $\mu$ PET-Studienergebnisse und die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit werden in Tabelle 5 vergleichend dargestellt.



		$\mu$ PET	IHC	
		$[^{18}\text{F}]\text{MPPF-BP}_{\text{nd}}$	5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor OD	5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor $V_{\text{Total}}$
<i>Restraint</i> - Stressmodell	<i>Septum</i>	-	-	-
	<i>Hippocampus</i>	↑ Transport vs. Naiv	↓ CA1 <i>Restraint</i> vs. Transport	-
Elektrisches Post-SE-Modell	<i>Septum</i>	↑ SE vs. Naiv	-	-
	<i>Hippocampus</i>	-	↓ CA3 SE vs. <i>Sham</i>	-
Chemisches Post-SE-Modell	<i>Septum</i>	↑ SE vs. <i>Sham</i> und Naiv	-	-
	<i>Hippocampus</i>	-	-	-

Einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur:  
 ↑ signifikante Erhöhung  
 ↓ signifikante Erniedrigung

**Tabelle 5: Vergleich der Studienergebnisse von  $\mu$ PET-Scan und IHC.**

**PET: Positronen-Emissions-Tomografie, IHC: Immunhistochemische Färbung,  $Bp_{\text{nd}}$ : Bindungspotential, SE: Status Epilepticus, OD: Optische Dichte,  $V_{\text{Total}}$ : Absolutes 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorvolumen, CA1: *Cornu ammonis 1*, CA3: *Cornu ammonis 3*, vs.: *versus*.**

## 5. Korrelation der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression mit den Resultaten der $\mu$ PET-Studie im *Restraint*-Stressmodell

Für die Korrelationsanalyse der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression des *Restraint*-Stressmodells wurden die analysierten Parameter der  $\mu$ PET-Studie von BUCHECKER et al. (2020) verwendet. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 6 erläutert.

Im *Restraint*-Stressmodell (siehe Abb. 18) konnte eine Korrelation nach *Spearman* zwischen den folgenden Parametern dargestellt werden (Korrelationskoeffizient  $r$  in Klammern):

Eine positive Korrelation bestand zwischen dem Körpergewicht am 12. Tag des Versuches und der OD des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in CA1 (0.57). Die Saccharin-Präferenz war ebenfalls

positiv mit der OD des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in CA3 (0.52) und GD (0.52) und außerdem mit V<sub>Total</sub> des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im *Hilus* (0.55) korreliert. Die OD des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im GD zeigte eine positive Korrelation mit dem [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotential im *Hippocampus* (0.52) und medialen präfrontalen *Cortex* (0.55). V<sub>Total</sub> des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im GD korrelierte ebenfalls positiv mit dem [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotential im medialen präfrontalen *Cortex* (0.63). In dieser Region korrelierte die [<sup>18</sup>F]FDG-Aufnahme negativ mit V<sub>Total</sub> des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in der hippocampalen CA3-Region (-0.51). Darüber hinaus war V<sub>Total</sub> des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im GD negativ mit der [<sup>18</sup>F]FDG-Aufnahme im medialen präfrontalen *Cortex* (-0.7), *Septum* (-0.66), *Amygdala* (-0.73), *Striatum* (-0.67), *Thalamus* (-0.59) und parietalem *Cortex* (-0.75) korreliert.

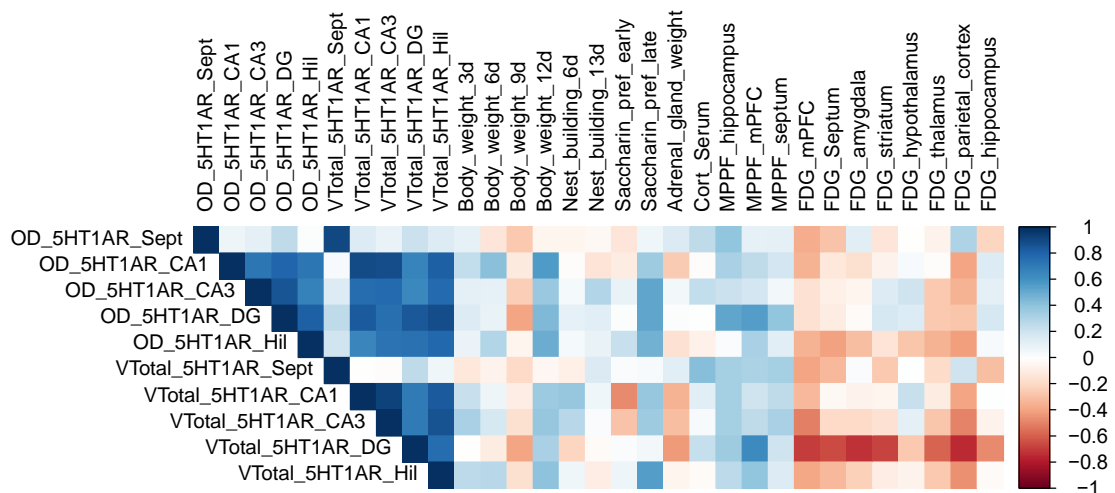


Abbildung 18: Korrelation von OD und V<sub>Total</sub> des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors mit Parametern der Studie von BUCHECKER et al. (2020).

## 6. Korrelation der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression mit biochemischen Parametern und Verhaltensparametern in den Epilepsiemodellen

Die biochemischen- und Verhaltensparameter für die Korrelationsanalyse von der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression der Post-SE-Modelle wurden den Studien von KOSKA et al. (2019) und SEIFFERT et al. (2019) entnommen. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 6 erläutert.

Im elektrischen Post-SE-Modell (siehe Abb. 19A) konnte eine Korrelation nach *Spearman*

zwischen den folgenden Parametern dargestellt werden (Korrelationskoeffizient  $r$  in Klammern):

Im *Septum* war die OD des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors positiv mit der Anzahl (0.55) und der Dauer (0.67) der Anfälle korreliert und ebenso  $V_{\text{Total}}$  des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im *Septum* mit der Anzahl (0.52) und der Dauer der Anfälle (0.71). Darüber hinaus war die Anzahl der Anfälle positiv mit  $V_{\text{Total}}$  des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in der CA1-Region des *Hippocampus* korreliert (0.51). Für die Verhaltensparameter wurde eine positive Korrelation zwischen der OD des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im *Septum* und der zurückgelegten Laufstrecke im *Open-Field-Tests* (0.53) sowie eine negative Korrelation zwischen der OD des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im *Gyrus dentatus* und dem Nestbauverhalten in der 11. Woche nach Induktion des SE (-0.56) ermittelt.

Im chemischen Post-SE-Modell konnte keine Korrelation zwischen den biochemischen Parametern und Verhaltensparametern und der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression festgestellt werden (siehe Abb. 19B).

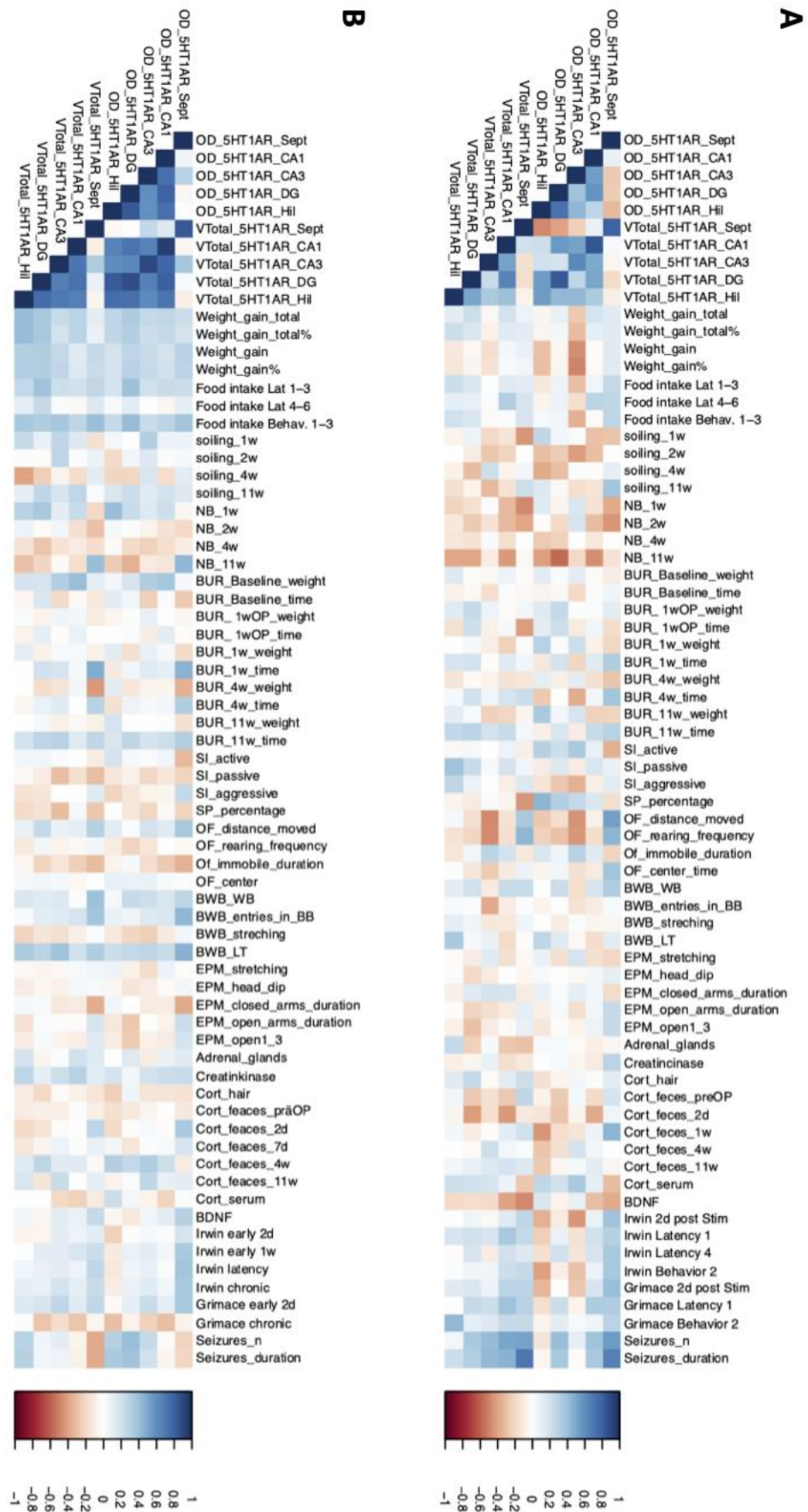


Abbildung 19: Korrelation von OD und Vtotal mit Parametern der Studien von SELFERT et al. (2019) und KOSKA et al. (2019). (A) Korrelation der Daten des elektrischen Post-SE-Modells. (B) Korrelation der Daten des chemischen Post-SE-Modells.

<b>Abkürzung</b>	<b>Einheit</b>	<b>Parameter</b>	<b>Erklärung</b>
<b>Adrenal_glands</b>	Gramm	Nebennierengewicht	Gewicht der Nebennieren
<b>BDNF</b>	pg/ml	BDNF Messung	Serumkonzentration des BDNFs am Versuchsende
<b>BUR_1wOP_time</b>	Sekunden	Wühlverhalten	Zeit bis zum Einsetzen des Wühlverhaltens 1 Woche nach dem operativen Eingriff
<b>BUR_1wOP_weight</b>	Gramm	Wühlverhalten	aus der Röhre gewühlter Kies 1 Woche nach dem operativen Eingriff
<b>BUR_11w_time</b>	Sekunden	Wühlverhalten	Zeit bis zum Einsetzen des Wühlverhaltens 11 Wochen nach dem SE
<b>BUR_11w_weight</b>	Gramm	Wühlverhalten	aus der Röhre gewühlter Kies 11 Wochen nach dem SE
<b>BUR_1w_time</b>	Sekunden	Wühlverhalten	Zeit bis zum Einsetzen des Wühlverhaltens 1 Woche nach dem SE
<b>BUR_1w_weight</b>	Gramm	Wühlverhalten	aus der Röhre gewühlter Kies 1 Woche nach dem SE
<b>BUR_4w_time</b>	Sekunden	Wühlverhalten	Zeit bis zum Einsetzen des Wühlverhaltens 4 Wochen nach dem SE
<b>BUR_4w_weight</b>	Gramm	Wühlverhalten	aus der Röhre gewühlter Kies 4 Wochen nach dem SE
<b>BUR_Baseline_time</b>	Sekunden	Wühlverhalten	Zeit bis zum Einsetzen des Wühlverhaltens während des Trainings
<b>BUR_Baseline_weight</b>	Gramm	Wühlverhalten	aus der Röhre gewühlter Kies während des Trainings
<b>BW_12d</b>	Gramm	Körpergewicht	Gewicht der Tiere am Tag 12 des Experiments
<b>BW_3d</b>	Gramm	Körpergewicht	Gewicht der Tiere am Tag 3 des Experiments
<b>BW_6d</b>	Gramm	Körpergewicht	Gewicht der Tiere am Tag 6 des Experiments
<b>BW_9d</b>	Gramm	Körpergewicht	Gewicht der Tiere am Tag 9 des Experiments
<b>BWB_entries_in_BB</b>	Anzahl	<i>Black-White-Box-Test</i>	Anzahl der Eintritte in den schwarzen Abschnitt
<b>BWB_LT</b>	Sekunden	<i>Black-White-Box-Test</i>	Zeit bis zum Eintritt in den schwarzen Abschnitt
<b>BWB_streching</b>	Anzahl	<i>Black-White-Box-Test</i>	Anzahl der gestreckten Haltungen im Test
<b>BWB_WB</b>	Sekunden	<i>Black-White-Box-Test</i>	Dauer des Aufenthalts im weißen Abschnitt
<b>Cort_feces_11w</b>	ng/g	Messung fäkaler Corticosteron-Metabolite	Corticosteron-Konzentration im Kot 11 Wochen Post-SE
<b>Cort_feces_1w</b>	ng/g	Messung fäkaler Corticosteron-Metabolite	Corticosteron-Konzentration im Kot 1 Woche Post-SE
<b>Cort_feces_2d</b>	ng/g	Messung fäkaler Corticosteron-Metabolite	Corticosteron-Konzentration im Kot 2 Tage Post-SE

<b>Cort_feces_4w</b>	ng/g	Messung fäkaler Corticosteron-Metabolite	Corticosteron-Konzentration im Kot 4 Wochen Post-SE
<b>Cort_feces_preOP</b>	ng/g	Messung fäkaler Corticosteron-Metabolite	Corticosteron-Konzentration im Kot vor dem operativen Eingriff
<b>Cort_hair</b>	pg/mg	Konzentration im Haar	Corticosteron-Konzentration in den Haaren am Versuchsende
<b>Cort_serum</b>	ng/g	Messung des Serum-Corticosterons	Serumkonzentration des Corticosterons am Versuchsende
<b>Creatinkinase</b>	U/L	Serumkonzentration	Konzentration der Kreatinkinase im Serum
<b>EPM_closed_arms_duration</b>	Sekunden	<i>Elevated-Plus-Maze-Test</i>	Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen
<b>EPM_head_dip</b>	Anzahl	<i>Elevated-Plus-Maze-Test</i>	Anzahl des Herunterschauens vom offenen Arm der Apparatur
<b>EPM_open_arms_duration</b>	Sekunden	<i>Elevated-Plus-Maze-Test</i>	Aufenthaltsdauer in den offenen Armen
<b>EPM_open1_3</b>	Sekunden	<i>Elevated-Plus-Maze-Test</i>	Aufenthaltsdauer im äußeren Drittel der offenen Arme
<b>EPM_stretching</b>	Anzahl	<i>Elevated-Plus-Maze-Test</i>	Anzahl der gestreckten Haltungen im Test
<b>FDG_amygdala</b>	Standardisierte Aufnahme rate (SUVR)	μPET-Scan	[ <sup>18</sup> F]FDG-Aufnahme in der <i>Amygdala</i>
<b>FDG_hippocampus</b>	SUVR	μPET-Scan	[ <sup>18</sup> F]FDG-Aufnahme im <i>Hippocampus</i>
<b>FDG_hypothalamus</b>	SUVR	μPET-Scan	[ <sup>18</sup> F]FDG-Aufnahme im <i>Hypothalamus</i>
<b>FDG_mPFC</b>	SUVR	μPET-Scan	[ <sup>18</sup> F]FDG-Aufnahme im medialen präfrontalen <i>Cortex</i>
<b>FDG_parietal_cortex</b>	SUVR	μPET-Scan	[ <sup>18</sup> F]FDG-Aufnahme im parietalen <i>Cortex</i>
<b>FDG_Septum</b>	SUVR	μPET-Scan	[ <sup>18</sup> F]FDG-Aufnahme im <i>Septum</i>
<b>FDG_striatum</b>	SUVR	μPET-Scan	[ <sup>18</sup> F]FDG-Aufnahme im <i>Striatum</i>
<b>FDG_thalamus</b>	SUVR	μPET-Scan	[ <sup>18</sup> F]FDG-Aufnahme im <i>Thalamus</i>
<b>Food intake Behav. 1-3</b>	Gramm	Futteraufnahme	durchschnittliche Futteraufnahme in der chronischen Phase
<b>Food intake Lat 1-3</b>	Gramm	Futteraufnahme	durchschnittliche Futteraufnahme während Latenzwoche 1-3
<b>Food intake Lat 4-6</b>	Gramm	Futteraufnahme	durchschnittliche Futteraufnahme während Latenzwoche 4-6
<b>MPPF_hippocampus</b>	Bindungspotential	μPET-Scan	[ <sup>18</sup> F]MPPF-Bindungspotential im <i>Hippocampus</i> , Berechnung des Bindungspotentials in der Region mithilfe der

			linearen, grafischen Methode nach Logan
<b>MPPF_mPFC</b>	Bindungspotential	$\mu$ PET-Scan	[ <sup>18</sup> F]MPPF-Bindungspotential im medialen präfrontalen <i>Cortex</i>
<b>MPPF_septum</b>	Bindungspotential	$\mu$ PET-Scan	[ <sup>18</sup> F]MPPF-Bindungspotential im <i>Septum</i>
<b>NB_11w</b>	Score 0-3	Nestbauverhalten	Nestbauverhalten 11 Wochen nach dem SE
<b>NB_13d</b>	Score 0-3	Nestbauverhalten	Nestbauverhalten am Tag 13 des Experiments
<b>NB_1w</b>	Score 0-3	Nestbauverhalten	Nestbauverhalten 1 Woche nach dem SE
<b>NB_2w</b>	Score 0-3	Nestbauverhalten	Nestbauverhalten 2 Wochen nach dem SE
<b>NB_4w</b>	Score 0-3	Nestbauverhalten	Nestbauverhalten 4 Wochen nach dem SE
<b>NB_6d</b>	Score 0-3	Nestbauverhalten	Nestbauverhalten am Tag 6 des Experiments
<b>OD_5HT1AR_CA1</b>	mittlerer Graustufenwert	Bildanalyse	mittlere gemessene Graustufenintensität in CA1
<b>OD_5HT1AR_CA3</b>	mittlerer Graustufenwert	Bildanalyse	mittlere gemessene Graustufenintensität in CA3
<b>OD_5HT1AR_DG</b>	mittlerer Graustufenwert	Bildanalyse	mittlere gemessene Graustufenintensität im <i>Gyrus dentatus</i>
<b>OD_5HT1AR_Hil</b>	mittlerer Graustufenwert	Bildanalyse	mittlere gemessene Graustufenintensität im <i>Hilus</i>
<b>OD_5HT1AR_Sept</b>	mittlerer Graustufenwert	Bildanalyse	mittlere gemessene Graustufenintensität im <i>Septum</i>
<b>OF_center_time</b>	Sekunden	<i>Open-Field-Test</i>	Dauer des Aufenthalts im Zentrum
<b>OF_distance_moved</b>	cm	<i>Open-Field-Test</i>	zurückgelegte Strecke
<b>Of_immobile_duration</b>	Sekunden	<i>Open-Field-Test</i>	Dauer der Immobilität der Tiere
<b>OF_rearing_frequency</b>	Anzahl	<i>Open-Field-Test</i>	Anzahl des Aufrichtens um mehr als 45°
<b>Seizures_duration</b>	Sekunden	Anfallsdauer	Dauer der Anfälle während des Video- und EEG-Monitorings
<b>Seizures_n</b>	Anzahl	Anfallsfrequenz	Anzahl der Anfälle während des Video- und EEG-Monitorings
<b>SI_active</b>	Sekunden	Soziale-Interaktionen-Test	Zeit aktiver, sozialer Interaktion der Tiere
<b>SI_aggressive</b>	Sekunden	Soziale-Interaktionen-Test	Zeit aggressiver Interaktion der Tiere
<b>SI_passive</b>	Sekunden	Soziale-Interaktionen-Test	Zeit passiver, sozialer Interaktion der Tiere
<b>soiling_11w</b>	Score 1-3	Verschmutzungsgrad	Nestverschmutzung 11 Wochen Post-SE
<b>soiling_1w</b>	Score 1-3	Verschmutzungsgrad	Nestverschmutzung 1 Woche Post-SE

<b>soiling_2w</b>	Score 1-3	Verschmutzungsgrad	Nestverschmutzung 2 Wochen Post-SE
<b>soiling_4w</b>	Score 1-3	Verschmutzungsgrad	Nestverschmutzung 4 Wochen Post-SE
<b>SP_percentage</b>	Prozent	Saccharin-Präferenz-Test	prozentualer Anteil des Saccharin-Konsums am Flüssigkeitskonsum
<b>SP_percentage_early</b>	Prozent	Saccharin-Präferenz-Test	prozentualer Anteil des Saccharin-Konsums am Flüssigkeitskonsum am 2. Tag der Versuchsdurchführung
<b>SP_percentage_late</b>	Prozent	Saccharin-Präferenz-Test	prozentualer Anteil des Saccharin-Konsums am Flüssigkeitskonsum am 4. Tag der Versuchsdurchführung
<b>VTotals_5HT1AR_CA1</b>	Kubikmillimeter	Berechnung	Absolutes, geschätztes 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptorvolumen in CA1
<b>VTotals_5HT1AR_CA3</b>	Kubikmillimeter	Berechnung	Absolutes, geschätztes 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptorvolumen in CA3
<b>VTotals_5HT1AR_DG</b>	Kubikmillimeter	Berechnung	Absolutes, geschätztes 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptorvolumen im <i>Gyrus dentatus</i>
<b>VTotals_5HT1AR_Hil</b>	Kubikmillimeter	Berechnung	Absolutes, geschätztes 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptorvolumen im <i>Hilus</i>
<b>VTotals_5HT1AR_Sept</b>	Kubikmillimeter	Berechnung	Absolutes, geschätztes 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptorvolumen im <i>Septum</i>
<b>Weight_gain_total</b>	Gramm	Körpergewicht	Gewichtszunahme von Ankunft der Tiere bis Versuchsende

Tabelle 6: Verwendete Parameter für die Korrelationsmatrices.



## VI. DISKUSSION

Fokus dieser Arbeit ist die Überprüfung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als potentieller Biomarker für die Belastungseinschätzung in Tiermodellen. Eine evidenzbasierte Einschätzung der Belastung ist wichtig, um ethische Abwägungen zwischen dem möglichen Erkenntnisgewinn und der Belastung der Tiere treffen zu können. Die evidenzbasierte Belastungseinschätzung stellt die Basis für die Priorisierung von Tiermodellen aus tierschutzrechtlicher Sicht dar. Modelle mit gleichem Nutzen für die Forschung, aber vergleichsweise geringerer Belastung der Tiere, können somit priorisiert werden. Darüber hinaus ist es für Maßnahmen im Rahmen des *Refinements* des 3R-Prinzips von Relevanz auch innerhalb der Kategorien der Schweregrade von Tiermodellen eine Belastungseinschätzung treffen zu können.

Die vorliegende retrospektive Studie ist eine Möglichkeit im Sinne der *Reduction* des 3R-Prinzips bereits erhobene Daten effizient zu nutzen und damit zusätzliche Tierversuche zu vermeiden. In diesem Abschnitt soll zuerst die im Rahmen dieser Arbeit angewendete Methodik diskutiert werden. Anschließend wird auf die inhaltlichen Aspekte eingegangen.

### 1. Diskussion der Methodik

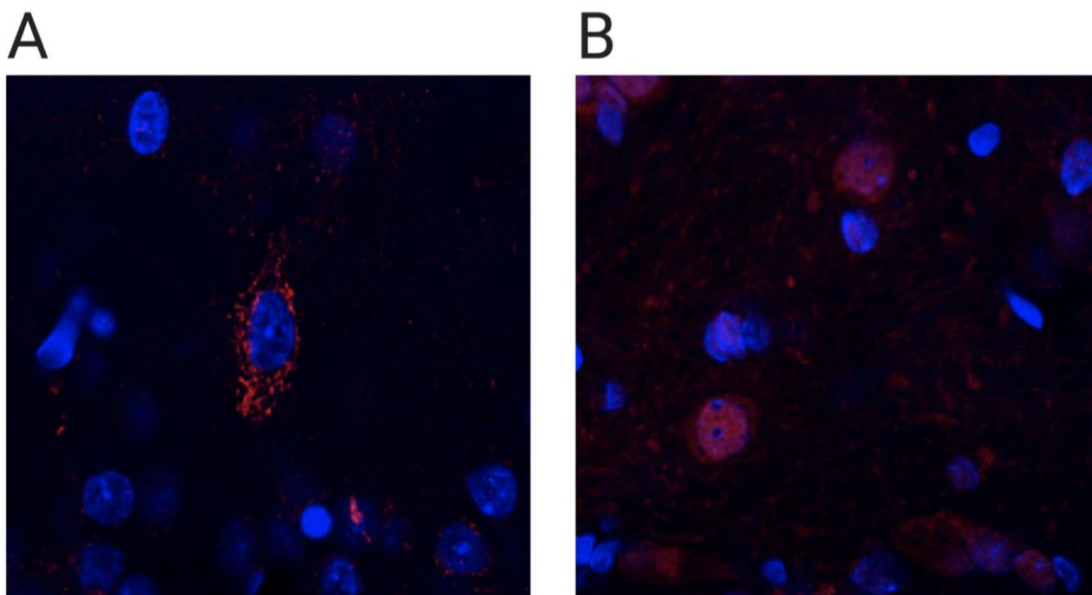
In der Stereologie wird zwischen einem dünnen Schnitt (engl. *slice*) 1-10 µm und einem dicken Schnitt (engl. *slab*) > 10 µm unterschieden (HOWARD und REED, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit einer Schnittdicke von 40 µm demzufolge *slabs* verwendet.

Analysiert man diese in nur einer Ebene, kann eine sogenannte Überprojektion entstehen. Demnach wird mehr analysiert, als in der Struktur in der Realität vorhanden ist. Dieser sogenannte „Holmes-Effekt“ führt zu einem systematischen Fehler (HOLMES, 1921; WEIBEL, 1979). Besteht der Verdacht der Überprojektion lassen sich mithilfe von Korrekturfaktoren die Daten rechnerisch angleichen. Allerdings ist nicht die physikalische Schnittdicke zu beurteilen, sondern vielmehr die Schnittdicke des optischen Schnittes. Durch die Analyse in 40-facher Vergrößerung wird die z-Ebene so weit reduziert, dass die entstandene Überprojektion zu vernachlässigen ist. Dies ist abhängig von der Größe, Orientierung und Form des zu untersuchenden Objektes (WEIBEL et al., 1966; BROWN, 2017). Nichtsdestotrotz wäre eine Analyse von *slices* eine Möglichkeit der Optimierung der vorliegenden Methode.

In der vorliegenden Arbeit wurde der immunhistochemische Färbeprozess anhand von verschiedenen Probefärbungen etabliert. Immunhistochemische Färbungen zeigen zum Teil eine große Variabilität, was sich auf Ergebnis und auch dessen Reproduzierbarkeit auswirkt. Einen Einfluss darauf haben verwendete Substanzen und die Wahl der Antikörper, um nur einige Beispiele zu nennen. In den hier durchgeführten Färbungen eignete sich Chromgelatine zum Aufziehen der Schnitte vergleichsweise besser als PBS, da weniger optische Artefakte entstanden. Zwar konnten die Artefakte bei der Bildanalyse weitestgehend exkludiert werden, bedeuteten aber zusätzlichen Zeit- und Arbeitsaufwand.

Darüber hinaus ist es wichtig zu kontrollieren, ob der Antikörper die korrekte Zielstruktur, wie sie in der Literatur und dem Datenblatt beschrieben wird, anfärbt. Ein Fall, in dem nicht die Zielstruktur erfasst wurde, wurde von JANARDHAN et al. (2018) am Beispiel von Becherzellen im Darm von Mäusen beschrieben, bei denen der Anti-5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antikörper zahlreiche Strukturen, nicht aber die Zielstruktur, färbte. Im Rahmen dieser Arbeit entstand ein solches Problem bei dem Verwenden einer neuen Chargennummer des gleichen primären Anti-5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antikörpers. Während der Antikörper der zuerst verwendeten Chargennummer eine spezifische Färbung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in der Plasmamembran darstellte, zeigte die neue Charge des gleichen primären Antikörpers eine unspezifische Hintergrundfärbung (siehe Abb. 20A-B). Laut Beschreibung des Herstellers und Literatur sollte der primäre Anti-5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antikörper die Zellmembran des Neurons anfärben. Obwohl die Färbung in verschiedenen Konzentrationen und mit dem Antikörper der zuvor verwendeten Charge als Kontrolle durchgeführt wurde, ließ sich keine spezifische Färbung erzielen. Bei einem erneuten Versuch mit einer weiteren Charge des Anti-5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antikörpers konnte ebenso keine spezifische Färbung dargestellt werden. Da polyklonale Antikörper mehrere Epitope des Antigens erkennen, ist das Signal zwar stärker, aber auch unspezifischer, als bei monoklonalen Antikörpern (MULISCH et al., 2015). Bei der Etablierung einer immunhistochemischen Färbung sollte dieser Aspekt berücksichtigt werden und anhand von Probefärbungen sichergestellt werden, dass die korrekte Zielstruktur angefärbt wird. Mithilfe von ergänzenden Immunoblot-Methoden lässt sich die Spezifität des Antikörpers noch genauer charakterisieren (HEO und LUBEC, 2010). Darüber hinaus stellt die Verwendung von rekombinanten Antikörpern eine weitere Alternative dar. Diese Antikörper werden gentechnisch mithilfe von Plasmiden hergestellt und haben zahlreiche

Vorteile gegenüber mono- oder polyklonalen Antikörpern. Die Herstellung ist nicht mehr von der individuellen und zum Teil sehr unterschiedlichen Immunantwort des Wirttieres abhängig. Die Ergebnisse von immunhistochemischen Färbungen mit rekombinanten Antikörpern sind demzufolge vergleichbarer (TRIMMER, 2020). Die Experimente lassen sich zu einem späteren Zeitpunkt zuverlässiger reproduzieren, da keine Unterschiede zwischen den Chargen bestehen sollten. In einem Kommentar des *Nature Journals* rieten BRADBURY und PLÜCKTHUN (2015) zur ausschließlichen Verwendung von rekombinanten Antikörpern, um so die Reproduzierbarkeit zu verbessern und anderenfalls entstehende, erhebliche Kosten in Form von Zeit, Geld und Ressourcen zu reduzieren. Bei der Verwendung von Gewebe von Tieren aus Tiermodellen, kann so möglicherweise eine *Reduction* im Sinne des 3R-Prinzips erreicht werden, da bestimmte Tiermodelle nicht wiederholt durchgeführt werden müssen. Darüber hinaus sind für die Herstellung der rekombinanten Antikörper keine Tiere mehr notwendig, was wiederum ein *Replacement* im Sinne des 3R-Prinzips ist.



**Abbildung 20: Vergleich des Anti-5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antikörpers verschiedener Chargen; A: spezifische Darstellung des Rezeptors (rot) in der Plasmamembran um den Zellkern (blau); B: unspezifische Hintergrundfärbung (eigene Abbildung).**

Verschiedene frei verfügbare und käufliche Computeranwendungen stellen Hilfsmittel bei der Durchführung stereologischer Analysen dar. TSCHANZ et al. (2011) beschreiben mit dem *STEPanizer* eine kostenlose Software, mit welcher digitale Bilder einfach analysiert werden können. Eine weitere Option zur Auswertung der histologischen Schnittpräparate,

ist die Verwendung einer stereologischen Software und des Punktezählverfahrens. Verwendet werden kann beispielsweise die Software Stereo Investigator® (MBF Bioscience, Williston, VT, USA), welche im Rahmen dieser Arbeit für die Volumenbestimmung des Referenzraumes nach CAVALIERI (1635) verwendet wurde. Das Punktezählverfahren kann laut ZACHAROVÁ und KUBÍNOVÁ (1995) mit wenig Zeit- und Materialaufwand durchgeführt werden. Nachteil der Methode ist, dass der Anwender entscheiden muss, welche Strukturen als zu evaluierender Parameter gezählt werden und welche als Hintergrund. Dabei beeinflussen beispielsweise Farbe des Hintergrunds, Kontrast und Weißabgleich als technische Aspekte die Darstellung. Das menschliche Auge erkennt nicht unbedingt Unterschiede und wird, insbesondere bei Kontrastunterschieden, einfach getäuscht (BROWN, 2017).

Die Bildanalyse mithilfe der frei verfügbaren Software Fiji, bietet hier eine einfach durchzuführende und objektive Herangehensweise. Alle Bilder werden zuerst in Graustufen transformiert. Der automatisch gesetzte Schwellenwert markiert in jedem Bild gleichermaßen den gesuchten Parameter und den Hintergrund. Erkennbare Artefakte können von der Auswertung manuell ausgeschlossen werden. Die Auswertung zahlreicher Bilder ist zwar zeit- und somit kostenintensiv, stellt sich aber im Vergleich zu der Etablierung eines geeigneten Punktezählrasters innerhalb der stereologischen Software als eher moderat dar. Neben Fiji gibt es zahlreiche weitere Anwendungen der Bildanalyse. Die verwendete Software für die Aufnahme der Bilder, BZ-X-Viewer (KEYENCE GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland), bietet die Möglichkeit den Schwellenwert automatisiert in ganzen Bildordnern auf dem Computer anzuwenden. So können zahlreiche Bilder innerhalb kürzester Zeit ausgewertet werden. Auch innerhalb von Fiji kann ein automatisierter Algorithmus zu diesem Zweck verwendet werden (siehe LAW et al. (2017)). Nachteil der Methoden ist, dass mögliche Artefakte nicht immer zuverlässig erkannt und exkludiert werden. Darüber hinaus bieten die beiden Methoden nur die Möglichkeit, die Flächenfraktion, nicht aber die optische Dichte zu ermitteln. Ein Kritikpunkt der Bildanalyse ist die nicht objektivierbare und standardisierbare Festlegung des Schwellenwertes. Um robuste Ergebnisse zu erhalten, ist die Entwicklung einer zuverlässigen Methode der Bildsegmentierung in das zu untersuchende Objekt und Hintergrund notwendig. Durch den Transfer des Bildes in Graustufen, ist bei ausreichendem Kontrast eine Differenzierung der Strukturen möglich (ZACHAROVÁ und KUBÍNOVÁ, 1995; HOWARD und REED, 2005). Voraussetzung ist aber, dass die Bilder in

ihrer Intensität ähnlich sind, da sonst eine Verzerrung in der Graustufenintensität entsteht (HOWARD und REED, 2005).

*APEER Machine learning* ist eine Online-Plattform, auf welcher gemeinsam an Arbeitsprozessen zur Bildbearbeitung und -segmentierung gearbeitet werden kann (siehe [www.appeer.com](http://www.appeer.com)). Zukünftig werden automatisierte Algorithmen genauere und weniger arbeitsintensive Methoden für die Ermittlung stereologischer Parameter bieten. *Deep learning* bezeichnet dabei computer-basierte Technik, welche vielfältige Prozesse automatisieren kann (LECUN et al., 2015; ALAHMARI et al., 2019).

## 2. Diskussion der Ergebnisse

Es besteht ein besonderes Interesse an der Erforschung des serotonergen Systems, da die serotonerge Neurotransmission unter anderem einen Einfluss auf die Stressantwort, den Schwellenwert von Anfällen und die Entwicklung von psychiatrischen Komorbiditäten hat (STATNICK et al., 1996; SALGADO-COMMISSARIAT und ALKADHI, 1997; SCHENKEL et al., 2012; SVOB STRAC et al., 2016). In Stressmodellen konnte gezeigt werden, dass stressassoziierte Erkrankungen über eine selektive Aktivierung des 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptors therapiert werden können (ZHOU et al., 2014).

Die  $\mu$ PET-Daten der vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten in einem 1) *Restraint*-Stressmodell (BUCHECKER et al., 2020) und 2) zwei Modellen mit spontanen, wiederkehrenden Anfällen (DI LIBERTO et al., 2018; VAN DIJK et al., 2018) ein erhöhtes *In-vivo*-Bindungspotential eines 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Liganden im 1) *Hippocampus* und 2) im *Septum*. Die Autoren diskutieren in ihren Veröffentlichungen, dass die erhöhte Bindung des Radioliganden möglicherweise auf eine erhöhte 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression hinweisen könnte. Basierend auf den Ergebnissen der  $\mu$ PET-Studien von DI LIBERTO et al. (2018) und VAN DIJK et al. (2018) in den Epilepsiemodellen sowie von BUCHECKER et al. (2020) im *Restraint*-Stressmodell wurde die Arbeitshypothese dieser Dissertationsschrift formuliert. Die Hypothese war, dass mithilfe der immunhistochemischen Quantifizierung die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als Biomarker-Kandidat für die Belastungseinschätzung in Tiermodellen bestätigt werden kann. Diese Arbeitshypothese konnte anhand der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Im *Restraint*-Stressmodell zeigte die vorliegende Analyse der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression in der Gruppe, welche beiden Stressoren (Transport und *Restraint*) ausgesetzt wurde im

Vergleich zu der Gruppe mit dem alleinigen Stressor des Transports, verringerte Expressionswerte in der CA1-Region des *Hippocampus*. Chronischer Stress und die Verabreichung von Corticosteron können zur Desensibilisierung oder reduzierten Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im *Hippocampus* führen (FLÜGGE, 1995; LEONARD, 2006). Eine mögliche Schlussfolgerung des Unterschieds der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression zwischen den experimentellen Gruppen ist der Einfluss von Art und Dauer des Stressors. Dies wurde bereits zuvor von anderen Autoren diskutiert (LAARIS et al., 1997; RAGHUPATHI und MCGONIGLE, 1997). Da die Reduktion der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression in der Gruppe mit beiden Stressoren (Transport und *Restraint*) nicht im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe gezeigt werden konnte, sollte dies in zukünftigen Studien, auch unter Verwendung anderer Stressmodelle, weiter untersucht werden.

Die Überprüfung auf das Vorliegen einer Korrelation der Daten des *Restraint*-Stressmodells aus der  $\mu$ PET-Studie von BUCHECKER et al. (2020) erfolgte mit den Parametern, welche im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation des [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotentials im *Hippocampus* und im medialen präfrontalen *Cortex* mit den Parametern OD und  $V_{\text{Total}}$  im GD. Die  $\mu$ PET-Studienergebnisse von BUCHECKER et al. (2020) zeigten ein erhöhtes [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotential im *Hippocampus* der Tiere der Transportgruppe im Vergleich zur naiven Kontrollgruppe. Die Korrelation der Ergebnisse weist möglicherweise auf eine erhöhte Rezeptorexpression in dieser Subregion des *Hippocampus* hin. Interessanterweise konnten VAN DER HART et al. (2002) in einem chronischen Stressmodell bei Spitzmäusen, eine unterdrückte Zellproliferation im GD der gestressten Tiere zeigen. Der 5-HT<sub>1A</sub>-Heterorezeptor beeinflusst wiederum die Neurogenese (WHITAKER-AZMITIA et al., 1993; ALBERT und VAHID-ANSARI, 2019).

Darüber hinaus wurde eine negative Korrelation des absoluten Rezeptorvolumens in der CA3-Region und der Aufnahme des Radioliganden [<sup>18</sup>F]FDG im medialen präfrontalen *Cortex* gezeigt. Das  $V_{\text{Total}}$  des GD korrelierte negativ mit der [<sup>18</sup>F]FDG-Aufnahme in nahezu allen im  $\mu$ PET-Scan evaluierten Subregionen. SU et al. (2014) stellten in ihrer Studie Veränderungen des Glucose-Metabolismus bei Patienten mit Depressionen dar. Ein reduzierter Glucose-Stoffwechsel zeigte sich vor allem im limbischen System und den Basalganglien. ONO et al. (2012) konnten bei Ratten eine Suppression des Glucose-Metabolismus bei gestressten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigen. VAN LAEKEN et al. (2018) beschrieben in einem Tiermodell eine reduzierte Aufnahme von

[<sup>18</sup>F]FDG unter Einfluss von chronischem Stress. Die Autoren verglichen dabei einen milden Stressor mit einer chronischen Corticosteron-Applikation. Dabei zeigte der milde Stressor keinen Einfluss auf die [<sup>18</sup>F]FDG-Aufnahme, die chronische Corticosteron-Applikation hingegen schon.

Im *Restraint*-Stressmodell zeigte sich darüber hinaus in der CA3-Region eine positive Korrelation der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression mit der Saccharin-Präferenz. Dieses Ergebnis ist aufgrund der Assoziation von Anhedonie und Stress eher überraschend (PŁAŻNIK et al., 1989; WILLNER et al., 1992; HARKIN et al., 2002). Allerdings konnten verschiedene Autoren in der Vergangenheit zeigen, dass die Saccharin-Präferenz sich nicht immer zuverlässig als Parameter zum Messen der Anhedonie eignete, da teilweise kontroverse Ergebnisse ermittelt wurden (HOWELL et al., 1999; PIJLMAN et al., 2003). Zur Validierung dieses Parameters sollten zukünftig weitere Studien unter Verwendung von größeren Fallzahlen und von verschiedenen Stressmodellen durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der Korrelation der Parameter sind insgesamt vorsichtig zu interpretieren. Während Korrelationskoeffizienten nahe  $\pm 1$  einen deutlichen (inversen) Zusammenhang vermuten lassen, ist die Evaluation anderer Werte des Korrelationskoeffizienten schwieriger. Einige Autoren beschreiben die Abstufungen der Bewertung des Korrelationskoeffizienten von schwach =  $\pm 0.1$  bis  $\pm 0.39$ , moderat =  $\pm 0.4$  bis  $\pm 0.69$ , stark =  $\pm 0.7$  bis  $\pm 0.89$  bis sehr stark =  $\pm 0.9$  bis  $\pm 1.0$ . Allerdings sind auch diese Abstufungen uneinheitlich und werden kontrovers diskutiert (SCHOBER et al., 2018).

Ein Einfluss des Epilepsiemodells auf die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression konnte im Rahmen der vorliegenden Analyse lediglich in der hippocampalen CA3-Region in Tieren aus dem elektrischen Post-SE-Modell erkannt werden. Der Großteil der vorangegangenen Studien, die sich mit Epilepsiemodellen und dem Einfluss von Anfällen und der Epileptogenese auf die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpressionsraten beschäftigt haben, verwendeten Autoradiografie oder evaluierten mRNA-Expressionsraten (CLARK et al., 1993; CAGNOTTO et al., 1998; KALYNCHUK et al., 2006; PERNHORST et al., 2013; BASCUÑANA et al., 2019). Unterschiede zwischen mRNA- und Proteindaten in verschiedenen experimentellen Studien lassen vermuten, dass posttranskriptionale Mechanismen einen Einfluss auf die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression auf Proteinebene haben (RAGHUPATHI und MCGONIGLE, 1997; IYO et al., 2009; LEWIS et al., 2020). Aus diesem Grund sind die mRNA-Datensätze nicht direkt mit denen aus der quantitativen Immunhistochemie vergleichbar, da hier die Expression auf Proteinebene analysiert wird.

In zwei weiteren experimentellen Autoradiografie-Studien wurde außerdem eine erhöhte Bindung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Agonisten [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT im *Gyrus dentatus* und in der *Amygdala* in Kindling-Modellen bei Ratten nachgewiesen (CLARK et al., 1993; KALYNCHUK et al., 2006). Im Gegensatz zu den hier verwendeten Epilepsiemodellen, entstehen beim Kindling-Modell bei der Verwendung von Routineprotokollen mit kurzen Phasen der Stimulation keine spontanen Anfälle. Die verhältnismäßig kurzen Anfälle werden durch wiederholte elektrische Stimulation induziert. Mit wiederholter Stimulation nehmen die Anfälle dabei an Schwere und Dauer zu (LÖSCHER, 2002). Zwar sind beides (Post-SE und Kindling) Epilepsie-Modelle der TLE, zeigen aber unterschiedliche Ausprägungsgrade pathophysiologischer Veränderungen auf molekularer, zellulärer und Netzwerkebene. Dies könnte eine Erklärung für Unterschiede in der Rezeptorexpression zwischen den Epilepsie-Modellen sein.

In  $\mu$ PET-Studien in Epilepsiemodellen konnte in einem elektrischen Kindling-Modell sowie einem chemischen und elektrischen Post-SE-Modell nachgewiesen werden, dass sowohl das wiederholte Induzieren von einzelnen Anfällen als auch spontane, wiederkehrende Krampfanfälle ein erhöhtes Bindungspotential des Radioliganden hervorrufen kann (DI LIBERTO et al., 2018; VAN DIJK et al., 2018; BASCUÑANA et al., 2019). Die Autoren diskutierten eine mögliche Induktion der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression im Zuge der Epileptogenese und von epileptischen Anfällen. Im Gegensatz dazu zeigte eine frühere Studie in einem Pilocarpin-Modell in Ratten mithilfe von *Ex-vivo*-Autoradiografie eine verringerte Bindung eines Radioliganden (PINEDA et al., 2011). In diesem Kontext sollte bedacht werden, dass die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression nicht nur durch die Expressionsrate, sondern auch durch weitere Faktoren, wie den Aktivierungsstatus des Rezeptors, beeinflusst sein kann. Der Aktivierungsstatus des Rezeptors kann das Bindungsverhalten an den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor beeinflussen. Weitere Autoradiografie-Studien könnten zukünftig mehr Informationen über potentielle Änderungen des Bindungsverhaltens und der Affinitäten von verschiedenen Rezeptor-Liganden geben.

Zusätzlich zu diesem technischen Aspekt können Unterschiede in Alter, Geschlecht und Zuchtlinie der Tiere das Ergebnis beeinflussen. In der Studie von PINEDA et al. (2011) wurden männliche Tiere verwendet. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Tiere waren ausschließlich weibliche Ratten. GOEL et al. (2014) zeigten in einem *Restraint*-Stressmodell bei Ratten einen geschlechtsspezifischen Einfluss des 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptors auf die Stressantwort. Auch das vorwiegend in weiblichen Körpern gebildete Hormon



Östrogen kann die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression beeinflussen. So konnten WADA et al. (2018) bei ovariectomierten Mäusen eine erhöhte Expression der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-mRNA darstellen.

Im elektrischen Post-SE-Modell zeigte die Analyse der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression der SE-Gruppe verringerte Werte in der CA3-Region des *Hippocampus* im Vergleich zur *Sham*-Gruppe. Eine solche Veränderung bezüglich des [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotentials, war in den vorangegangenen  $\mu$ PET-Scans nicht erkennbar (DI LIBERTO et al., 2018; VAN DIJK et al., 2018). In diesem Zusammenhang sollte bedacht werden, dass aufgrund der limitierten Auflösung des  $\mu$ PETs in den Studien von DI LIBERTO et al. (2018) und VAN DIJK et al. (2018) das Bindungspotential innerhalb des gesamten *Hippocampus* als definiertem Referenzraum ermittelt werden konnte. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Rezeptorexpressionen in den einzelnen Subregionen des *Hippocampus* somit durch einen ‚Verdünnungseffekt‘ verloren gehen. Eine weitere  $\mu$ PET-Studie in einem chemischen Kainat-induzierten Post-SE-Modell in Ratten zeigte ein erhöhtes [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungspotential des Radioliganden im *Hippocampus* der Tiere, welche die Kainat-Injektion erhielten. Die Autoren vermuteten eine durch Epilepsie induzierte Erhöhung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression (VAN BOGAERT et al., 2001). Da es zu dieser Studie keine immunhistochemischen Daten gibt, kann kein direkter Vergleich mit den Analysen dieser Arbeit erstellt werden.

Im chemischen Post-SE-Modell konnte die quantitative, immunhistochemische Analyse keine relevante Veränderung der Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors in der SE-Gruppe im Vergleich zu den Kontrollgruppen im *Septum* und im *Hippocampus* bestätigen. Auf den ersten Blick erscheint dies im direkten Widerspruch zu den zuvor von DI LIBERTO et al. (2018) erhobenen  $\mu$ PET-Daten für dieses Modell der TLE zu stehen. In diesem Zusammenhang sollte beachtet werden, dass das Bindungsverhalten des Radioliganden nicht allein mit der Dichte des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors zusammenhängt, sondern auch durch die Konzentration des endogenen Liganden Serotonin beeinflusst wird. Durch eine geringere Konzentration des endogenen Liganden Serotonins kommt es zu einer reduzierten kompetitiven Hemmung an der Bindungsstelle am 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor. Bei einem reduzierten endogenen Serotoninspiegel sind demzufolge mehr Bindungsstellen frei, an welche der Radioligand binden kann (ZIMMER et al., 2003). Veränderungen der endogenen Serotoninkonzentration wurden bereits als Ursache einer vermehrten Bindung eines 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptortracers in einem elektrischen Kindling-Modell von

BASCUÑANA et al. (2019) diskutiert, welches bereits weiter oben erwähnt wurde. In dieser Studie wurde zunächst die Bindung eines Radioliganden an den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor im  $\mu$ PET-Scan analysiert. Die Autoren diskutierten, ob das Ergebnis ein Hinweis auf eine erhöhte 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression sein könnte. Diese Hypothese konnte mithilfe anschließender Autoradiografie *in vitro* nicht bestätigt werden (BASCUÑANA et al., 2019). Die Daten aus vorherigen  $\mu$ PET-Studien und der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten immunhistochemischen Quantifizierung könnten auf eine mögliche verringerte, endogene Serotoninkonzentration in den untersuchten Modellen hinweisen. Zur Bestätigung dieser Schlussfolgerung wären daher zukünftige Mikrodialysestudien mit Hochleistungsflüssigkeitschromatografie-Analysen von Serotonin von besonderem Interesse. Mit diesen *In-vivo*-Techniken bestünde die Möglichkeit der vergleichenden Messung der extrazellulären Konzentration des Neurotransmitters Serotonin in verschiedenen Gehirnarealen (DARVESH et al., 2011).

Darüber hinaus hat unsere Arbeitsgruppe in früheren Studien gezeigt, dass es durch die krankheitsassoziierte Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit der Blut-Hirn-Schranke zu Konzentrationsänderungen des Radioliganden [<sup>18</sup>F]MPPF kommen kann (LA FOUGÈRE et al., 2010). Die Blut-Hirn-Schranke kann als pathophysiologische Folge von Anfällen oder der Einwirkung von Stress gestört sein. Basierend auf der Annahme, dass eine veränderte [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindung durch eine Veränderung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression bedingt wäre, könnten Einschätzungen der Bindung des Radioliganden die eigentliche 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression bei Tieren mit gestörter Blut-Hirn-Schranke fehlinterpretieren. Dieser Aspekt sollte bei der Bewertung von  $\mu$ PET-Expressionsdaten beachtet werden. Serotonerge Neurotransmission, vermittelt über den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, wurde mit Veränderungen von Verhaltensmustern in Verbindung gebracht (POPOVA und NAUMENKO, 2013; CARHART-HARRIS und NUTT, 2017). Demzufolge wurde in den Tiermodellen untersucht, ob es eine Korrelation zwischen der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression und Verhaltensänderungen gibt. Die Ergebnisse zeigten in den Post-SE-Modellen eine Assoziation mit der zurückgelegten Strecke im *Open-Field*-Test, welcher Hyperlokomotion und Hyperaktivitätsmuster anzeigt. Letzteres könnte ein erhöhtes Auftreten der Aufmerksamkeitsdefizits-Hyperaktivitätsstörung bei Patienten mit Epilepsie reflektieren (HUDSON et al., 2014). Eine inverse Korrelation wurde zu dem Nestbauverhalten ermittelt, welches in der Vergangenheit als Indikator des Wohlbefindens diskutiert wurde (GASKILL et al., 2013; JIRKOF, 2014; SCHWABE et al., 2020). Bezüglich der

Schlussfolgerungen sollte beachtet werden, dass diese Ergebnisse nicht konsistent in allen Projekten vorzufinden waren. Demzufolge wäre es für die Validierung dieser Ergebnisse notwendig nachfolgende Studien mit anderen Modellen und Spezies durchzuführen. Wie bereits weiter oben beschrieben, sind die vorliegenden Korrelationen der Parameter vorsichtig zu interpretieren, insbesondere weil eine Vielzahl der Korrelationskoeffizienten kleiner als 0.7 war. Diese können nach der Publikation von SCHOBER et al. (2018) als eine eher ‚moderate‘ Korrelation der Parameter betrachtet werden.

Auch wenn bisher keine Kreuzkorrelationsanalyse durchgeführt wurde, konnte bei einem Vergleich von Subgruppen eines *Amygdala*-Kindling-Modells in Ratten Hinweise für eine Assoziation zwischen dem hippocampalem 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorbindungsverhalten und hyperaktiven Verhaltensmustern im *Open-Field*-Test festgestellt werden (KALYNCHUK, 2000). Interessanterweise zeigte ein ähnlicher Vergleich zwischen Ratten mit moderatem und starkem depressionsassoziiertem Verhalten einen Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen in den Raphe-Kernen, nicht aber in den Heterorezeptoren des *Hippocampus* (PINEDA et al., 2011).

Bei Humanpatienten mit TLE wurden im Zusammenhang mit depressiven Erkrankungen verstärkte Veränderungen des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorbindungsverhalten in den limbischen Hirnregionen festgestellt (HASLER et al., 2007; THEODORE et al., 2007). Kenntnisse über die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression bei Patienten mit therapieresistenter TLE sind nach vorliegendem Wissensstand auf eine Western-Blot-Analyse chirurgisch gewonnener Proben limitiert (FONSECA et al., 2017). In der Studie wurde eine positive Korrelation zwischen erhöhter 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte im *Hippocampus* und längerer Krankheitsdauer der Epilepsie gezeigt. LOTHE et al. (2008) beschrieben in einer weiteren Studie eine positive Korrelation zwischen dem [<sup>18</sup>F]MPPF-Bindungsverhalten in den hippo- und parahippocampalen Regionen und somatischen Symptomen bei Patienten mit TLE und Depressionen. Schließlich deuten sowohl experimentelle als auch klinische Studien auf eine mögliche funktionelle Verbindung zwischen psychiatrischen Komorbiditäten und der über den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor vermittelten Neurotransmission hin. In diesem Kontext sollte in Betracht gezogen werden, dass sowohl das veränderte 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Bindungsverhalten, die Expression und die Funktion, als auch der Grad der Komorbiditäten und Verhaltensänderungen den Schweregrad der Epilepsie widerspiegeln können. Im hier vorliegenden Datensatz wurde eine Korrelation zwischen der Anfallsaktivität der Tiere und der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression im *Septum* und der CA1-

Region im elektrischen Post-SE-Modell festgestellt. Die Korrelation zwischen den Werten der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression und der Anfallsdauer könnte darauf hindeuten, dass die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorfunktion einen negativen Einfluss auf endogene Mechanismen zur Terminierung von Anfällen hat. Mit Hinblick auf die Tatsache, dass der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor eher als hemmender Serotoninrezeptor betrachtet wird, ist eine Korrelation zwischen der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression und der Anfallsaktivität eher überraschend. Basierend auf dem aktuellen Stand der Wissenschaft lässt sich demzufolge eher auf eine Hochregulation des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors als kompensatorischer Mechanismus schließen. Dies ist jedoch aufgrund des Ergebnisses der hier vorliegenden Korrelationsanalyse in Frage gestellt. In einer anderen Studie wurde zudem der Faktor Zeit im Verlauf der Entwicklung der Epilepsie und der Rezeptorexpression diskutiert (FONSECA et al., 2017). Es scheint also notwendig zu sein, weitere, detaillierte Analysen zu den funktionellen Konsequenzen der Regulation des postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors anzustellen.

Bezugnehmend auf die Arbeitshypothesen lässt sich sagen, dass die Manifestation von Stress durch den Transport oder Transport mit *Restraint* sowie die der chronischen Epilepsie in den beschriebenen Modellen nicht mit einer ausgeprägten und weit verbreiteten, veränderten 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression in Verbindung zu bringen ist. Ein modellspezifischer Einfluss auf die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression ist lediglich in der CA1- und der CA3-Region des *Hippocampus* erkennbar. In Hinblick auf die vorherigen  $\mu$ PET-Studienergebnisse, welche ein erhöhtes Bindungspotential des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorradioliganden zeigten, weisen die aktuellen Ergebnisse eher auf reduzierte Spiegel von endogenem, extrazellulärem Serotonin hin. Dies erscheint anhand der diskutierten Aspekte naheliegender als eigentliche Veränderungen der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptordichte. Die Korrelationsanalyse deutet auf eine mögliche Assoziation von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression mit  $\mu$ PET-Daten, Anfallsgenerierung, Anfallsterminierung und einzelnen Verhaltensparametern hin. Da diese Ergebnisse jedoch nur für einzelne Modelle nachgewiesen werden konnten, sollten in der Zukunft weitere Studien zu anderen Modellen und Tierarten durchgeführt werden.

## VII. ZUSAMMENFASSUNG

Experimentelle und klinische Daten suggerieren einen Einfluss von serotonerger Neurotransmission auf die Stressantwort sowie die Anfallsschwelle bei Patienten mit Epilepsie und Epilepsie-assoziierten psychiatrischen Komorbiditäten. Möglicherweise eignet sich die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als Biomarker für die Belastungseinschätzung in Tiermodellen. In  $\mu$ PET-Studien unserer Arbeitsgruppe konnte in Stress- und Epilepsiemodellen ein erhöhtes Bindungspotential des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Liganden [<sup>18</sup>F]MPPF bei Ratten nachgewiesen werden. Ursächlich dafür kann die Erhöhung der Rezeptorexpression oder eine Reduktion der extrazellulären Serotoninkonzentration, und dadurch Reduktion der kompetitiven Hemmung durch den endogenen Liganden, sein. Auf Basis dieser Ergebnisse sollte untersucht werden, ob die potentielle Nutzung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression als Biomarker zur Belastungseinschätzung in Nagermodellen bestätigt werden kann. Unter Anwendung stereologischer Prinzipien wurde die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression in immunhistochemisch gefärbten Gehirngewebschnitten von Ratten aus einem *Restraint*-Stressmodell sowie zwei Post-Status-Epilepticus-Modellen quantifiziert. Die Auswahl der untersuchten Gehirnregionen erfolgte auf Grundlage der  $\mu$ PET-Studienergebnisse. Es wurden das *Septum* und verschiedene Subregionen des *Hippocampus* untersucht. Die Quantifizierung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression zeigte eine reduzierte optische Dichte in der CA3-Region im elektrischen Post-Status-Epilepticus-Modell und in der CA1-Region im *Restraint*-Stressmodell. In dem chemischen Post-Status-Epilepticus-Modell zeigte die Analyse keine Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen. Modellspezifisch wies eine Korrelationsanalyse auf eine Verbindung zwischen der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression und einigen der  $\mu$ PET-Daten sowie Anfalls- und Verhaltensparametern hin. Zusammenfassend sprechen die vorliegenden Ergebnisse gegen eine ausgeprägte Veränderung der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression in den untersuchten Gehirnregionen. Die erhobenen Daten legen nahe, dass die zuvor gezeigten Veränderungen der Bindung des  $\mu$ PET-Tracers auf eine Reduktion des endogenen Serotonins zurückzuführen ist. Die Korrelationsanalyse deutet auf eine mögliche Verbindung zwischen der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorexpression und der Anfallsgenerierung, Anfallsterminierung und Verhaltensänderungen hin. Da es sich dabei um modellspezifische Ergebnisse handelt, sollte die Generalisierbarkeit in zukünftigen Untersuchungen mit anderen Modellen und Spezies überprüft werden.

## VIII. SUMMARY

Experimental and clinical data suggest an impact of serotonergic neurotransmission on stress response and seizure susceptibility in patients with epilepsy, as well as on epilepsy-associated comorbidities. 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression is a potential biomarker candidate for severity assessment in animal models. In  $\mu$ PET studies, previously completed by our group, an increased binding potential of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligand [<sup>18</sup>F]MPPF was shown in stress and epilepsy models in rats. The reason for an increased binding potential could be an enhanced 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression or reduced endogenous serotonin levels and therefore a reduction of the competitive inhibition by the endogenous ligand. Based on these results, the potential use of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression as a biomarker candidate for severity assessment in animal models was evaluated. Applying stereologic principles, the 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression was quantified in immunohistochemically stained rat brain sections. These were derived from two post-status epilepticus models and one restraint stress model. Selection of the regions of interest was based on  $\mu$ PET results. *Septum* and subregions of the hippocampus were analysed.

Immunohistochemically based quantification showed a reduced optical density in the hippocampal CA3 subregion in the electrical post-status epilepticus model and in the hippocampal CA1 subregion in the restraint stress model. In the chemical post-SE model, expression rates were comparable in all brain regions of interest. Model specific correlations indicated a potential link of 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression with  $\mu$ PET data, as well as ictogenesis, seizure and behavioural parameters.

In conclusion, the results obtained in this study do not indicate widespread alterations of the receptor expression in the examined brain regions. In regard of previously assessed  $\mu$ PET data, the results indicate reduced serotonin levels rather than enhanced receptor density as an explanation for changes in [<sup>18</sup>F]MPPF binding. The correlation analysis points to a potential connection between 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression and ictogenesis, seizure termination and behavioural patterns. Since these findings are model-specific, the generalizability should be further evaluated in future studies using other models and species.

## IX. LITERATURVERZEICHNIS

Aghajanian GK, Lakoski JM. Hyperpolarization of serotonergic neurons by serotonin and LSD: studies in brain slices showing increased K<sup>+</sup> conductance. *Brain Res* 1984; 305: 181-5.

Ahlenius S, Larsson K, Svensson L, Hjorth S, Carlsson A, Lindberg P, Wikström H, Sanchez D, Arvidsson LE, Hacksell U, Nilsson JL. Effects of a new type of 5-HT receptor agonist on male rat sexual behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 1981; 15: 785-92.

Akhondzadeh S. The 5-HT hypothesis of schizophrenia. *IDrugs* 2001; 4: 295-300.

Alahmari SS, Goldgof D, Hall L, Phoulady HA, Patel RH, Mouton PR. Automated Cell Counts on Tissue Sections by Deep Learning and Unbiased Stereology. *J Chem Neuroanat* 2019; 96: 94-101.

Albert PR, Sajedi N, Lemonde S, Ghahremani MH. Constitutive G(i2)-dependent activation of adenylyl cyclase type II by the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. Inhibition by anxiolytic partial agonists. *J Biol Chem* 1999; 274: 35469-74.

Albert PR, Tiberi M. Receptor signaling and structure: insights from serotonin-1 receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12: 453-60.

Albert PR, Lemonde S. 5-HT<sub>1A</sub> receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *Neuroscientist* 2004; 10: 575-93.

Albert PR. Transcriptional regulation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor: implications for mental illness. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2012; 367: 2402-15.

Albert PR, Vahid-Ansari F, Luckhart C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression. *Front Behav Neurosci* 2014; 8: 199.

Albert PR, Vahid-Ansari F. The 5-HT<sub>1A</sub> receptor: Signaling to behavior. *Biochimie* 2019; 161: 34-45.

Andero R, Daviu N, Escorihuela RM, Nadal R, Armario A. 7,8-dihydroxyflavone, a TrkB receptor agonist, blocks long-term spatial memory impairment caused by immobilization stress in rats. *Hippocampus* 2012; 22: 399-408.

Andrews N, Legg E, Lisak D, Issop Y, Richardson D, Harper S, Pheby T, Huang W, Burgess G, Machin I, Rice AS. Spontaneous burrowing behaviour in the rat is reduced by peripheral nerve injury or inflammation associated pain. *Eur J Pain* 2012; 16: 485-95.

- Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim Behav* 1973; 21: 205-35.
- Argyropoulos SV, Hood SD, Adrover M, Bell CJ, Rich AS, Nash JR, Rich NC, Witchel HJ, Nutt DJ. Tryptophan depletion reverses the therapeutic effect of selective serotonin reuptake inhibitors in social anxiety disorder. *Biol Psychiatry* 2004; 56: 503-9.
- Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers-A General Review. *Curr Protoc Pharmacol* 2017; 76: 9.23.1-9..17.
- Artigas F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther* 2013; 137: 119-31.
- Arvidsson LE, Hacksell U, Nilsson JL, Hjorth S, Carlsson A, Lindberg P, Sanchez D, Wikstrom H. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a new centrally acting 5-hydroxytryptamine receptor agonist. *J Med Chem* 1981; 24: 921-3.
- Ashall V, Millar K. Endpoint matrix: a conceptual tool to promote consideration of the multiple dimensions of humane endpoints. *Altex* 2014; 31: 209-13.
- Assié MB, Bardin L, Auclair AL, Carilla-Durand E, Depoortère R, Koek W, Kleven MS, Colpaert F, Vacher B, Newman-Tancredi A. F15599, a highly selective post-synaptic 5-HT(1A) receptor agonist: in-vivo profile in behavioural models of antidepressant and serotonergic activity. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010; 13: 1285-98.
- Azmitia EC, Gannon PJ, Kheck NM, Whitaker-Azmitia PM. Cellular localization of the 5-HT1A receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology* 1996; 14: 35-46.
- Bagdy G, Kecskemeti V, Riba P, Jakus R. Serotonin and epilepsy. *Journal of Neurochemistry* 2007; 100: 857-73.
- Balcells-Olivero M, Cousins MS, Seiden LS. Holtzman and Harlan Sprague-Dawley rats: differences in DRL 72-sec performance and 8-hydroxy-di-propylamino tetralin-induced hypothermia. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 742-52.
- Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 1996; 17: 245-61.
- Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1083-152.
- Barnes NM, Ahern GP, Becamel C, Bockaert J, Camilleri M, Chaumont-Dubel S, Claeysen S, Cunningham KA, Fone KC, Gershon M, Di Giovanni G, Goodfellow NM, Halberstadt AL, Hartley RM, Hassaine G, Herrick-Davis K, Hovius R, Lacivita E, Lambe EK, Leopoldo M, Levy FO, Lummis SCR, Marin P, Maroteaux L, McCreary AC, Nelson DL, Neumaier JF, Newman-Tancredi A, Nury H, Roberts A, Roth BL, Roumier A, Sanger GJ, Teitler M, Sharp T, Villalón



CM, Vogel H, Watts SW, Hoyer D. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine; Pharmacology and Function. *Pharmacol Rev* 2021; 73: 310-520.

Barré-Sinoussi F, Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Future Sci OA* 2015; 1: Fso63.

Bascuñana P, García-García L, Javela J, Fernández de la Rosa R, Shiha AA, Kelly J, Delgado M, Pozo M. PET Neuroimaging Reveals Serotonergic and Metabolic Dysfunctions in the Hippocampal Electrical Kindling Model of Epileptogenesis. *Neuroscience* 2019; 409: 101-10.

Basler L, Gerdes S, Wolfer DP, Slomianka L. Sampling the Mouse Hippocampal Dentate Gyrus. *Front Neuroanat* 2017; 11: 123.

Baumans V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Ther* 2004; 11 Suppl 1: S64-6.

Baumans V. Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Rev Sci Tech* 2005; 24: 503-13.

Bech P. Acute therapy of depression. *The Journal of clinical psychiatry* 1993;

Beery AK, Kaufer D. Stress, social behavior, and resilience: insights from rodents. *Neurobiol Stress* 2015; 1: 116-27.

Bekinschtein P, Cammarota M, Medina JH. BDNF and memory processing. *Neuropharmacology* 2014; 76 Pt C: 677-83.

Belzung C, Agmo A. Naloxone potentiates the effects of subeffective doses of anxiolytic agents in mice. *Eur J Pharmacol* 1997; 323: 133-6.

Belzung C, Griebel G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res* 2001; 125: 141-9.

Belzung C, Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biol Mood Anxiety Disord* 2011; 1: 9.

Berton O, McClung CA, Dileone RJ, Krishnan V, Renthal W, Russo SJ, Graham D, Tsankova NM, Bolanos CA, Rios M, Monteggia LM, Self DW, Nestler EJ. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science* 2006; 311: 864-8.

Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 2004; 22: 123-31.

Björkholm C, Monteggia LM. BDNF - a key transducer of antidepressant effects.

Neuropharmacology 2016; 102: 72-9.

Blakemore C, MaCarthur Clark J, Nevalainen T, Oberdorfer M, Sussman A. Implementing the 3Rs in neuroscience research: a reasoned approach. *Neuron* 2012; 75: 948-50.

Blier P, Bergeron R, de Montigny C. Selective activation of postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors induces rapid antidepressant response. *Neuropsychopharmacology* 1997; 16: 333-8.

Blier P, de Montigny C. Serotonin and drug-induced therapeutic responses in major depression, obsessive-compulsive and panic disorders. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21: 91s-8s.

Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF. Factors influencing behavior in the forced swim test. *Physiol Behav* 2013; 118: 227-39.

Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ, Arango V. Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res* 2008; 42: 433-42.

Boldt L, Koska I, Maarten van Dijk R, Talbot SR, Miljanovic N, Palme R, Bleich A, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in mouse models with repeated seizures: I. Electrical kindling. *Epilepsy Behav* 2021; 115: 107689.

Bonfils S, Lambling A, Skoryna S. Pathophysiology of peptic ulcer. McGill University 1963: 153-71.

Bourin M, Hascoët M. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 55-65.

Boyer EW, Shannon M. The serotonin syndrome. *N Engl J Med* 2005; 352: 1112-20.

Bradbury A, Plückthun A. Reproducibility: Standardize antibodies used in research. *Nature* 2015; 518: 27-9.

Bradley PB, Engel G, Feniuk W, Fozard JR, Humphrey PP, Middlemiss DN, Mylecharane EJ, Richardson BP, Saxena PR. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* 1986; 25: 563-76.

Braendgaard H, Gundersen HJ. The impact of recent stereological advances on quantitative studies of the nervous system. *J Neurosci Methods* 1986; 18: 39-78.

Brandt C, Glien M, Potschka H, Volk H, Löscher W. Epileptogenesis and neuropathology after different types of status epilepticus induced by prolonged electrical stimulation of the basolateral amygdala in rats. *Epilepsy Res* 2003; 55: 83-103.

Brooks-Kayal AR, Bath KG, Berg AT, Galanopoulou AS, Holmes GL, Jensen FE, Kanner AM, O'Brien TJ, Whittemore VH, Winawer MR, Patel M, Scharfman HE. Issues related to symptomatic and disease-modifying treatments affecting cognitive and neuropsychiatric

comorbidities of epilepsy. *Epilepsia* 2013; 54 Suppl 4: 44-60.

Brown DL. Bias in image analysis and its solution: unbiased stereology. *J Toxicol Pathol* 2017; 30: 183-91.

Bryda EC. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Mo Med* 2013; 110: 207-11.

Buchecker V, Waldron AM, van Dijk RM, Koska I, Brendel M, von Ungern-Sternberg B, Lindner S, Gildehaus FJ, Ziegler S, Bartenstein P, Potschka H. [(18)F]MPPF and [(18)F]FDG  $\mu$ PET imaging in rats: impact of transport and restraint stress. *EJNMMI Res* 2020; 10: 112.

Burnet PW, Eastwood SL, Lacey K, Harrison PJ. The distribution of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA in human brain. *Brain Res* 1995; 676: 157-68.

Cadogan AK, Kendall DA, Marsden CA. Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation increases cyclic AMP formation in the rat hippocampus in vivo. *J Neurochem* 1994; 62: 1816-21.

Cagnotto A, Crespi D, Mancini L, Manzoni C, Presti ML, Gariboldi M, Vezzani A, Mennini T. Lasting increase in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> but not 5-HT<sub>4</sub> receptor subtypes in the kindled rat dentate gyrus: dissociation from local presynaptic effects. *J Neurochem* 1998; 70: 850-7.

Carey RJ, Huston JP, Müller CP. Pharmacological inhibition of dopamine and serotonin activity blocks spontaneous and cocaine-activated behaviour. *Prog Brain Res* 2008; 172: 347-60.

Carhart-Harris RL, Nutt DJ. Serotonin and brain function: a tale of two receptors. *J Psychopharmacol* 2017; 31: 1091-120.

Cavalieri B (1635) *Geometria Indivisibilibus Continvorum Noua quadam ratione promota*. Typographia de Duciis, Bononiae

Ceglia I, Acconcia S, Fracasso C, Colovic M, Caccia S, Invernizzi RW. Effects of chronic treatment with escitalopram or citalopram on extracellular 5-HT in the prefrontal cortex of rats: role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 469-78.

Chan JF, Zhang AJ, Yuan S, Poon VK, Chan CC, Lee AC, Chan WM, Fan Z, Tsoi HW, Wen L, Liang R, Cao J, Chen Y, Tang K, Luo C, Cai JP, Kok KH, Chu H, Chan KH, Sridhar S, Chen Z, Chen H, To KK, Yuen KY. Simulation of the Clinical and Pathological Manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in a Golden Syrian Hamster Model: Implications for Disease Pathogenesis and Transmissibility. *Clin Infect Dis* 2020; 71: 2428-46.

Chaouloff F, Berton O, Mormède P. Serotonin and Stress. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21: 28-32.

Charest A, Wainer BH, Albert PR. Cloning and differentiation-induced expression of a

murine serotonin<sub>1A</sub> receptor in a septal cell line. *J Neurosci* 1993; 13: 5164-71.

Chen JW, Wasterlain CG. Status epilepticus: pathophysiology and management in adults. *Lancet Neurol* 2006; 5: 246-56.

Chen ZY, Jing D, Bath KG, Ieraci A, Khan T, Siao CJ, Herrera DG, Toth M, Yang C, McEwen BS, Hempstead BL, Lee FS. Genetic variant BDNF (Val66Met) polymorphism alters anxiety-related behavior. *Science* 2006; 314: 140-3.

Choi JY, Shin S, Lee M, Jeon TJ, Seo Y, Kim CH, Kim DG, Yi CH, Lee K, Choi TH, Kang JH, Ryu YH. Acute physical stress induces the alteration of the serotonin 1A receptor density in the hippocampus. *Synapse* 2014; 68: 363-8.

Choleris E, Thomas AW, Kavaliers M, Prato FS. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25: 235-60.

Clark M, Weiss SR, Post RM. Autoradiographic analysis of serotonin receptors and transporter in kindled rat brain. *Neurosci Lett* 1993; 161: 21-6.

Clarke HF, Dalley JW, Crofts HS, Robbins TW, Roberts AC. Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion. *Science* 2004; 304: 878-80.

Clarke WP, Yocca FD, Maayani S. Lack of 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub>-mediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 1259-66.

Cohen J. From mice to monkeys, animals studied for coronavirus answers. *Science* 2020; 368: 221-2.

Coppen A. The Biochemistry of Affective Disorders. *British Journal of Psychiatry* 1967; 113: 1237-64.

Crawley J, Goodwin FK. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 1980; 13: 167-70.

Crawley JN. Designing mouse behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2004; 10: 248-58.

Cryan JF, Leonard BE. 5-HT<sub>1A</sub> and beyond: the role of serotonin and its receptors in depression and the antidepressant response. *Hum Psychopharmacol* 2000; 15: 113-35.

Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RSG, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neuroscience Methods* 2008; 172: 143-57.

Dahlström A, Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia* 1964;

20: 398-9.

Darvesh AS, Carroll RT, Geldenhuys WJ, Gudelsky GA, Klein J, Meshul CK, Van der Schyf CJ. In vivo brain microdialysis: advances in neuropsychopharmacology and drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2011; 6: 109-27.

Dayan P, Huys QJ. Serotonin in affective control. *Annu Rev Neurosci* 2009; 32: 95-126.

de Angelis L, File SE. Acute and chronic effects of three benzodiazepines in the social interaction anxiety test in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 1979; 64: 127-9.

De la Torre JC, Kawanaga HM, Mullan S. Seizure susceptibility after manipulation of brain serotonin. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1970; 188: 298-304.

De Vivo M, Maayani S. Characterization of the 5-hydroxytryptamine<sub>1a</sub> receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 238: 248-53.

Deacon RM. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc* 2006a; 1: 1117-9.

Deacon RM. Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction. *Nat Protoc* 2006b; 1: 118-21.

Deacon RM. The successive alleys test of anxiety in mice and rats. *J Vis Exp* 2013: e2705.

Delesse MA. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *Annales des mines* 1848; 13: 379-88.

Deogracias R, Yazdani M, Dekkers MP, Guy J, Ionescu MC, Vogt KE, Barde YA. Fingolimod, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, increases BDNF levels and improves symptoms of a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 14230-5.

Der-Avakian A, Markou A. The neurobiology of anhedonia and other reward-related deficits. *Trends Neurosci* 2012; 35: 68-77.

Deshmukh PP, Yamamura HI, Woods L, Nelson DL. Computer-assisted autoradiographic localization of subtypes of serotonin<sub>1</sub> receptors in rat brain. *Brain Res* 1983; 288: 338-43.

Dhir A. Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Curr Protoc Neurosci* 2012; Chapter 9: Unit9.37.

Di Liberto V, van Dijk RM, Brendel M, Waldron AM, Möller C, Koska I, Seiffert I, Gualtieri F, Gildehaus FJ, von Ungern-Sternberg B, Lindner M, Ziegler S, Palme R, Hellweg R, Gass P, Bartenstein P, Potschka H. Imaging correlates of behavioral impairments: An experimental PET study in the rat pilocarpine epilepsy model. *Neurobiol Dis* 2018; 118: 9-21.

Didelot A, Ryvlin P, Lothe A, Merlet I, Hammers A, Mauguière F. PET imaging of brain 5-HT1A receptors in the preoperative evaluation of temporal lobe epilepsy. *Brain* 2008; 131: 2751-64.

Doherty MD, Pickel VM. Targeting of serotonin 1A receptors to dopaminergic neurons within the parabrachial subdivision of the ventral tegmental area in rat brain. *J Comp Neurol* 2001; 433: 390-400.

Dourish CT, Hutson PH, Curzon G. Low doses of the putative serotonin agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicit feeding in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 1985; 86: 197-204.

Dunn KW, Kamocka MM, McDonald JH. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300: C723-42.

Eison AS, Temple DL, Jr. Buspirone: review of its pharmacology and current perspectives on its mechanism of action. *Am J Med* 1986; 80: 1-9.

el Mestikawy S, Riad M, Laporte AM, Vergé D, Daval G, Gozlan H, Hamon M. Production of specific anti-rat 5-HT1A receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide. *Neurosci Lett* 1990; 118: 189-92.

Engel J, Salamon N. Temporal Lobe Epilepsy. In: *Brain Mapping*. Toga AW, ed. Waltham: Academic Press 2015: 853-60.

Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 1990; 5: 511-26.

Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Persson H, Lindvall O. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. *Neuron* 1991; 7: 165-76.

Europäisches Parlament. NOTICE TO MEMBERS - Petition No 1125/2019 by Julia Baines (British), on behalf of PETA UK, PETA France, PETA Germany and PETA Netherlands, on a moratorium on animal experimentation. 1125/2019 European Parliament 2019: [https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/PETI-CM-653736\\_EN.pdf](https://www.europarl.europa.eu/doceo/document/PETI-CM-653736_EN.pdf). 3rd January 2021.

European Animal Research Association. Research sector welcomes the publication of EU-wide figures on the number of animals used in science. EARA 2020: <https://www.eara.eu/post/research-sector-welcomes-the-publication-of-eu-wide-figures-on-the-number-of-animals-used-in-science>. 3rd January 2021.

Ferdowsian HR, Gluck JP. The ethical challenges of animal research. *Camb Q Healthc Ethics* 2015; 24: 391-406.

Fernández Espejo E. Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. *Behav Brain Res* 1997; 86: 105-12.

Festing S, Wilkinson R. The ethics of animal research. Talking Point on the use of animals in scientific research. *EMBO Rep* 2007; 8: 526-30.

Feuerstein TJ, Diener HC. Kapitel 5 - Pharmakologie des Serotonins – Pharmakotherapie primärer Kopfschmerzen. In: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* (Elfte Ausgabe). Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, eds. Munich: Urban & Fischer 2013: 191-8.

File SE, Hyde JR. Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol* 1978; 62: 19-24.

Fink H, Frey H-H. Allgemeine Pharmakologie. In: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Löscher W, Richter A, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2016: 26.

Fink H, Voigt JP. Periphere und zentral wirksame Mediatoren In: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Löscher W, Richter A, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2016: 108-24.

Fisher RS, van Emde Boas W, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J, Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005; 46: 470-2.

Flügge G. Dynamics of central nervous 5-HT<sub>1A</sub>-receptors under psychosocial stress. *J Neurosci* 1995; 15: 7132-40.

Fonseca NC, Joaquim HP, Talib LL, Vincentis S, Gattaz WF, Valente KD. 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor density in the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy is associated with disease duration. *Eur J Neurol* 2017; 24: 602-8.

Fujiwara Y, Nelson DL, Kashihara K, Varga E, Roeske WR, Yamamura HI. The cloning and sequence analysis of the rat serotonin-1A receptor gene. *Life Sci* 1990; 47: P1127-32.

Gaddum JH, Picarelli ZP. Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother* 1957; 12: 323-8.

Garcia-Finana M, Cruz-Orive LM, Mackay CE, Pakkenberg B, Roberts N. Comparison of MR imaging against physical sectioning to estimate the volume of human cerebral compartments. *Neuroimage* 2003; 18: 505-16.

Garcia-Garcia AL, Newman-Tancredi A, Leonardo ED. 5-HT<sub>1A</sub> receptors in mood and anxiety: recent insights into autoreceptor versus heteroreceptor function. *Psychopharmacology (Berl)* 2014; 231: 623-36.

Gaskill BN, Karas AZ, Garner JP, Pritchett-Corning KR. Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. *J Vis Exp* 2013; 51012.

Gastens AM, Brandt C, Bankstahl JP, Löscher W. Predictors of pharmaco-resistant epilepsy: pharmaco-resistant rats differ from pharmaco-responsive rats in behavioral and cognitive abnormalities associated with experimentally induced epilepsy. *Epilepsia* 2008; 49: 1759-76.

Geinisman Y, Gundersen HJ, van der Zee E, West MJ. Unbiased stereological estimation of the total number of synapses in a brain region. *J Neurocytol* 1996; 25: 805-19.

Genzel L, Adan R, Berns A, van den Beucken J, Blokland A, Boddeke E, Bogers WM, Bontrop R, Bulthuis R, Bousema T, Clevers H, Coenen T, van Dam AM, Deen PMT, van Dijk KW, Eggen BJJ, Elgersma Y, Erdogan I, Englitz B, Fentener van Vlissingen JM, la Fleur S, Fouchier R, Fitzsimons CP, Frieling W, Haagmans B, Heesters BA, Henckens M, Herfst S, Hol E, van den Hove D, de Jonge MI, Jonkers J, Joosten LAB, Kalsbeek A, Kamermans M, Kampinga HH, Kas MJ, Keijer JA, Kersten S, Kiliaan AJ, Kooij TWA, Kooijman S, Koopman WJH, Korosi A, Krugers HJ, Kuiken T, Kushner SA, Langermans JAM, Lesscher HMB, Lucassen PJ, Lutgens E, Netea MG, Noldus L, van der Meer JWM, Meye FJ, Mul JD, van Oers K, Olivier JDA, Pasterkamp RJ, Philippens I, Prickaerts J, Pollux BJA, Rensen PCN, van Rheenen J, van Rij RP, Ritsma L, Rockx BHG, Roozendaal B, van Schothorst EM, Stittelaar K, Stockhofe N, Swaab DF, de Swart RL, Vanderschuren L, de Vries TJ, de Vrij F, van Wezel R, Wierenga CJ, Wiesmann M, Willuhn I, de Zeeuw CI, Homberg JR. How the COVID-19 pandemic highlights the necessity of animal research. *Curr Biol* 2020; 30: R1014-r8.

Gharib A, Sayyahi Z, Komaki A, Barkley V, Sarihi A, Mirnajafi-Zadeh J. The role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors of hippocampal CA1 region in anticonvulsant effects of low-frequency stimulation in amygdala kindled rats. *Physiol Behav* 2018; 196: 119-25.

Gilliam F, Hecimovic H, Sheline Y. Psychiatric comorbidity, health, and function in epilepsy. *Epilepsy Behav* 2003; 4 Suppl 4: S26-30.

Giovacchini G, Conant S, Herscovitch P, Theodore WH. Using cerebral white matter for estimation of nondisplaceable binding of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in temporal lobe epilepsy. *J Nucl Med* 2009; 50: 1794-800.

Glagolev AA (1955) On geometrical methods of quantitative mineralogical analysis of Rocks. Atomic Energy Research Establishment

Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp Neurol* 1969; 25: 295-330.

Goel N, Innala L, Viau V. Sex differences in serotonin (5-HT) 1A receptor regulation of HPA axis and dorsal raphe responses to acute restraint. *Psychoneuroendocrinology* 2014; 40: 232-41.

Golledge H, Jirkof P. Score sheets and analgesia. *Lab Anim* 2016; 50: 411-3.



Goodfellow NM, Benekareddy M, Vaidya VA, Lambe EK. Layer II/III of the prefrontal cortex: Inhibition by the serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor in development and stress. *J Neurosci* 2009; 29: 10094-103.

Goodwin GM, De Souza RJ, Green AR. The pharmacology of the hypothermic response in mice to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OH-DPAT). A model of presynaptic 5-HT<sub>1</sub> function. *Neuropharmacology* 1985; 24: 1187-94.

Gouveia K, Hurst JL. Optimising reliability of mouse performance in behavioural testing: the major role of non-aversive handling. *Sci Rep* 2017; 7: 44999.

Gozlan H, El Mestikawy S, Pichat L, Glowinski J, Hamon M. Identification of presynaptic serotonin autoreceptors using a new ligand: 3H-PAT. *Nature* 1983; 305: 140-2.

Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, Deakin JF. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; 54: 129-41.

Graf M, Jakus R, Kantor S, Levay G, Bagdy G. Selective 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> antagonists decrease epileptic activity in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy. *Neurosci Lett* 2004; 359: 45-8.

Grone BP, Baraban SC. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. *Nature Neuroscience* 2015; 18: 339-43.

Grønli J, Murison R, Fiske E, Bjorvatn B, Sørensen E, Portas CM, Ursin R. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. *Physiol Behav* 2005; 84: 571-7.

Gross D, Tolba RH. Ethics in Animal-Based Research. *Eur Surg Res* 2015; 55: 43-57.

Gundersen H, Jensen E. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of microscopy* 1987; 147: 229-63.

Gundersen HJ, Osterby R. Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or 'do more less well!'. *J Microsc* 1981; 121: 65-73.

Guy AP, Gardner CR. Pharmacological characterisation of a modified social interaction model of anxiety in the rat. *Neuropsychobiology* 1985; 13: 194-200.

Häger C, Keubler LM, Biernot S, Dietrich J, Buchheister S, Buettner M, Bleich A. Time to Integrate to Nest Test Evaluation in a Mouse DSS-Colitis Model. *PLoS One* 2015; 10: e0143824.

Haleem DJ, Saify ZS, Siddiqui S, Batool F, Haleem MA. Pre- and postsynaptic responses to 1-(1-naphthylpiperazine) following adaptation to stress in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2002; 26: 149-56.

Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology* 1934; 18: 385-403.

Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1984; 327: 1-5.

Handley SL. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol Ther* 1995; 66: 103-48.

Harkin A, Houlihan DD, Kelly JP. Reduction in preference for saccharin by repeated unpredictable stress in mice and its prevention by imipramine. *J Psychopharmacol* 2002; 16: 115-23.

Hascoët M, Bourin M, Nic Dhonnchadha BA. The mouse light-dark paradigm: a review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2001; 25: 141-66.

Hasler G, Bonwetsch R, Giovacchini G, Toczek MT, Bagic A, Luckenbaugh DA, Drevets WC, Theodore WH. 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in temporal lobe epilepsy patients with and without major depression. *Biol Psychiatry* 2007; 62: 1258-64.

Helmstaedter C, Witt JA. Epilepsy and cognition - A bidirectional relationship? *Seizure* 2017; 49: 83-9.

Heo S, Lubec G. Generation and characterization of a specific polyclonal antibody against the mouse serotonin receptor 1A: a state-of-the-art recommendation on how to characterize antibody specificity. *Electrophoresis* 2010; 31: 3789-96.

Hermann BP, Seidenberg M, Bell B. Psychiatric comorbidity in chronic epilepsy: identification, consequences, and treatment of major depression. *Epilepsia* 2000; 41 Suppl 2: S31-41.

Hess SE, Rohr S, Dufour BD, Gaskill BN, Pajor EA, Garner JP. Home improvement: C57BL/6J mice given more naturalistic nesting materials build better nests. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2008; 47: 25-31.

Hjorth S, Carlsson A, Lindberg P, Sanchez D, Wikström H, Arvidsson LE, Hacksell U, Nilsson JLG. 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, 8-OH-DPAT, a potent and selective simplified ergot congener with central 5-HT-receptor stimulating activity. *Journal of Neural Transmission* 1982; 55: 169-88.

Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *Embo j* 1990; 9: 2459-64.

Holmes A (1921) Petrographic methods and calculations: with some examples of results achieved. Thomas Murby & Company

Holmes A. Genetic variation in cortico-amygdala serotonin function and risk for stress-related disease. *Neurosci Biobehav Rev* 2008; 32: 1293-314.

Hölter SM, Einicke J, Sperling B, Zimprich A, Garrett L, Fuchs H, Gailus-Durner V, Hrabé de Angelis M, Wurst W. Tests for Anxiety-Related Behavior in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 2015; 5: 291-309.

Howard CV, Reed MG (2005) Unbiased stereology. BIOS Scientific Publ. [u.a.], Abingdon [u.a.]. XVII, 277 pages.

Howell LA, Harris RB, Clarke C, Youngblood BD, Ryan DH, Gilbertson TA. The effects of restraint stress on intake of preferred and nonpreferred solutions in rodents. *Physiol Behav* 1999; 65: 697-704.

Howells DW, Porritt MJ, Wong JY, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ, Donnan GA. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol* 2000; 166: 127-35.

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 1994; 46: 157-203.

Huang N, Yang C, Hua D, Li S, Zhan G, Yang N, Luo A, Xu H. Alterations in the BDNF-mTOR Signaling Pathway in the Spinal Cord Contribute to Hyperalgesia in a Rodent Model of Chronic Restraint Stress. *Neuroscience* 2019; 409: 142-51.

Hudson JM, Flowers KA, Walster KL. Attentional control in patients with temporal lobe epilepsy. *J Neuropsychol* 2014; 8: 140-6.

Humphrey PP, Hartig P, Hoyer D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1993; 14: 233-6.

Huot P, Fox SH, Brotchie JM. The serotonergic system in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2011; 95: 163-212.

Hutchinson E, Avery A, Vandewoude S. Environmental enrichment for laboratory rodents. *Ilar j* 2005; 46: 148-61.

Idova GV, Davydova SM. Involvement of presynaptic 5-HT(1A) receptors in immunomodulation in conditions of psychoemotional tension. *Neurosci Behav Physiol* 2010; 40: 495-9.

Iken K, Chheng S, Fargin A, Goulet AC, Kouassi E. Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT1A receptors. *Cell Immunol* 1995; 163: 1-9.

Innis RB, Aghajanian GK. Pertussis toxin blocks 5-HT1A and GABAB receptor-mediated

inhibition of serotonergic neurons. *Eur J Pharmacol* 1987; 143: 195-204.

Inostroza M, Cid E, Menendez de la Prida L, Sandi C. Different emotional disturbances in two experimental models of temporal lobe epilepsy in rats. *PLoS One* 2012; 7: e38959.

Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* 1968; 13: 222-57.

Ito S, Suhara T, Ito H, Yasuno F, Ichimiya T, Takano A, Maehara T, Matsuura M, Okubo Y. Changes in central 5-HT(1A) receptor binding in mesial temporal epilepsy measured by positron emission tomography with [(11)C]WAY100635. *Epilepsy Res* 2007; 73: 111-8.

Iyo AH, Kieran N, Chandran A, Albert PR, Wicks I, Bisette G, Austin MC. Differential regulation of the serotonin 1 A transcriptional modulators five prime repressor element under dual repression-1 and nuclear-deformed epidermal autoregulatory factor by chronic stress. *Neuroscience* 2009; 163: 1119-27.

Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 1992; 72: 165-229.

Janardhan KS, Jensen H, Clayton NP, Herbert RA. Immunohistochemistry in Investigative and Toxicologic Pathology. *Toxicol Pathol* 2018; 46: 488-510.

Janusz W, Kleinrok Z. The role of the central serotonergic system in pilocarpine-induced seizures: receptor mechanisms. *Neurosci Res* 1989; 7: 144-53.

Jastrzębska-Więsek M, Partyka A, Rychtyk J, Śniecikowska J, Kołaczkowski M, Wesołowska A, Varney MA, Newman-Tancredi A. Activity of Serotonin 5-HT(1A) Receptor Biased Agonists in Rat: Anxiolytic and Antidepressant-like properties. *ACS Chem Neurosci* 2018; 9: 1040-50.

Jennings M, Silcock S. Benefits, necessity and justification in animal research. *Altern Lab Anim* 1995; 23: 828-36.

Jirkof P, Cesarovic N, Rettich A, Nicholls F, Seifert B, Arras M. Burrowing behavior as an indicator of post-laparotomy pain in mice. *Front Behav Neurosci* 2010; 4: 165.

Jirkof P, Leucht K, Cesarovic N, Caj M, Nicholls F, Rogler G, Arras M, Hausmann M. Burrowing is a sensitive behavioural assay for monitoring general wellbeing during dextran sulfate sodium colitis in laboratory mice. *Lab Anim* 2013a; 47: 274-83.

Jirkof P, Fleischmann T, Cesarovic N, Rettich A, Vogel J, Arras M. Assessment of postsurgical distress and pain in laboratory mice by nest complexity scoring. *Lab Anim* 2013b; 47: 153-61.

Jirkof P. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J Neurosci Methods* 2014; 234: 139-46.

Josephson CB, Jetté N. Psychiatric comorbidities in epilepsy. *Int Rev Psychiatry* 2017; 29: 409-24.

Jovanovic H, Perski A, Berglund H, Savic I. Chronic stress is linked to 5-HT(1A) receptor changes and functional disintegration of the limbic networks. *Neuroimage* 2011; 55: 1178-88.

Kalynchuk LE. Long-term amygdala kindling in rats as a model for the study of interictal emotionality in temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24: 691-704.

Kalynchuk LE, Pinel JP, Meaney MJ. Serotonin receptor binding and mRNA expression in the hippocampus of fearful amygdala-kindled rats. *Neurosci Lett* 2006; 396: 38-43.

Kanner AM. Depression in epilepsy: prevalence, clinical semiology, pathogenic mechanisms, and treatment. *Biol Psychiatry* 2003; 54: 388-98.

Kanner AM, Barry JJ, Gilliam F, Hermann B, Meador KJ. Anxiety disorders, subsyndromic depressive episodes, and major depressive episodes: do they differ on their impact on the quality of life of patients with epilepsy? *Epilepsia* 2010; 51: 1152-8.

Kanner AM. Management of psychiatric and neurological comorbidities in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 2016; 12: 106-16.

Kaufman J, DeLorenzo C, Choudhury S, Parsey RV. The 5-HT1A receptor in Major Depressive Disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 2016; 26: 397-410.

Kia HK, Brisorgueil MJ, Hamon M, Calas A, Vergé D. Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine1A receptors in the rat brain. *J Neurosci Res* 1996a; 46: 697-708.

Kia HK, Miquel MC, Brisorgueil MJ, Daval G, Riad M, El Mestikawy S, Hamon M, Vergé D. Immunocytochemical localization of serotonin1A receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 1996b; 365: 289-305.

Kinder EF. A study of the nest-building activity of the albino rat. *Journal of Experimental Zoology* 1927; 47: 117-61.

Knapp DJ, Overstreet DH, Crews FT. Brain 5-HT1A receptor autoradiography and hypothermic responses in rats bred for differences in 8-OH-DPAT sensitivity. *Brain Res* 1998; 782: 1-10.

Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol* 2015; 25: R1116-21.

Kokaia M, Ernfors P, Kokaia Z, Elmér E, Jaenisch R, Lindvall O. Suppressed epileptogenesis

in BDNF mutant mice. *Exp Neurol* 1995; 133: 215-24.

Koska I, van Dijk RM, Seiffert I, Di Liberto V, Möller C, Palme R, Hellweg R, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: II. Chemical post-status epilepticus model. *Epilepsia* 2019; 60: 2114-27.

Kung MP, Frederick D, Mu M, Zhuang ZP, Kung HF. 4-(2'-Methoxy-phenyl)-1-[2'-(n-2"-pyridinyl)-p-iodobenzamido]-ethyl- piperazine ([<sup>125</sup>I]p-MPPI) as a new selective radioligand of serotonin-1A sites in rat brain: in vitro binding and autoradiographic studies. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 429-37.

Kwon CH, Luikart BW, Powell CM, Zhou J, Matheny SA, Zhang W, Li Y, Baker SJ, Parada LF. Pten regulates neuronal arborization and social interaction in mice. *Neuron* 2006; 50: 377-88.

la Fougère C, Böning G, Bartmann H, Wängler B, Nowak S, Just T, Wagner E, Winter P, Rominger A, Förster S, Gildehaus FJ, Rosa-Neto P, Minuzzi L, Bartenstein P, Potschka H, Cumming P. Uptake and binding of the serotonin 5-HT<sub>1A</sub> antagonist [<sup>18</sup>F]-MPPF in brain of rats: effects of the novel P-glycoprotein inhibitor tariquidar. *Neuroimage* 2010; 49: 1406-15.

Laaris N, Le Poul E, Hamon M, Lanfumey L. Stress-induced alterations of somatodendritic 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor sensitivity in the rat dorsal raphe nucleus--in vitro electrophysiological evidence. *Fundam Clin Pharmacol* 1997; 11: 206-14.

Lai MK, Tsang SW, Francis PT, Esiri MM, Keene J, Hope T, Chen CP. Reduced serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in the temporal cortex correlates with aggressive behavior in Alzheimer disease. *Brain Res* 2003; 974: 82-7.

Lanfumey L, Haj-Dahmane S, Schechter LE, Bolaños FJ, Gozlan H, Hamon M. Functional and Regulatory Properties of Presynaptic Autoreceptors of the 5-HT<sub>1A</sub> Subtype on Dorsal Raphe Neurons in Brain Stem Slices. In: *Presynaptic Receptors and Neuronal Transporters*. Langer SZ, Galzin AM, Costentin J, eds.: Pergamon 1991: 285-8.

Lanfumey L, Pardon MC, Laaris N, Joubert C, Hanoun N, Hamon M, Cohen-Salmon C. 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice. *Neuroreport* 1999; 10: 3369-74.

Law AMK, Yin JXM, Castillo L, Young AJ, Piggin C, Rogers S, Caldon CE, Burgess A, Millar EKA, O'Toole SA, Gallego-Ortega D, Ormandy CJ, Oakes SR. Andy's Algorithms: new automated digital image analysis pipelines for FIJI. *Scientific Reports* 2017; 7: 15717.

Leal G, Afonso PM, Salazar IL, Duarte CB. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Res* 2015; 1621: 82-101.

LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. Deep learning. *Nature* 2015; 521: 436-44.

Lee C, Rodgers RJ. Effects of buspirone on antinociceptive and behavioural responses to the elevated plus-maze in mice. *Behav Pharmacol* 1991; 2: 491-6.

Leonard BE. HPA and immune axes in stress: involvement of the serotonergic system. *Neuroimmunomodulation* 2006; 13: 268-76.

Lesch KP, Gutknecht L. Focus on The 5-HT<sub>1A</sub> receptor: emerging role of a gene regulatory variant in psychopathology and pharmacogenetics. *Int J Neuropsychopharmacol* 2004; 7: 381-5.

Lewis MW, Jones RT, Davis MT. Exploring the impact of trauma type and extent of exposure on posttraumatic alterations in 5-HT<sub>1A</sub> expression. *Transl Psychiatry* 2020; 10: 237.

Lidster K, Jefferys JG, Blumcke I, Crunelli V, Flecknell P, Frenguelli BG, Gray WP, Kaminski R, Pitkanen A, Ragan I, Shah M, Simonato M, Trevelyan A, Volk H, Walker M, Yates N, Prescott MJ. Opportunities for improving animal welfare in rodent models of epilepsy and seizures. *J Neurosci Methods* 2016; 260: 2-25.

Liew CJ, Lim YM, Bonwetsch R, Shamim S, Sato S, Reeves-Tyer P, Herscovitch P, Dustin I, Bagic A, Giovacchini G, Theodore WH. 18F-FCWAY and 18F-FDG PET in MRI-negative temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2009; 50: 234-9.

Lilley E, Andrews MR, Bradbury EJ, Elliott H, Hawkins P, Ichiyama RM, Keeley J, Michael-Titus AT, Moon LDF, Pluchino S, Riddell J, Ryder K, Yip PK. Refining rodent models of spinal cord injury. *Exp Neurol* 2020; 328: 113273.

Lin SL, Setya S, Johnson-Farley NN, Cowen DS. Differential coupling of 5-HT(1) receptors to G proteins of the G(i) family. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 1072-8.

Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 1987; 92: 180-5.

Liu Y, Schwartz AG, Hong Y, Peng X, Xu F, Thomopoulos S, Genin GM. Correction of bias in the estimation of cell volume fraction from histology sections. *J Biomech* 2020; 104: 109705.

Lladó-Pelfort L, Assié MB, Newman-Tancredi A, Artigas F, Celada P. Preferential in vivo action of F15599, a novel 5-HT(1A) receptor agonist, at postsynaptic 5-HT(1A) receptors. *Br J Pharmacol* 2010; 160: 1929-40.

López-Meraz ML, González-Trujano ME, Neri-Bazán L, Hong E, Rocha LL. 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists modify epileptic seizures in three experimental models in rats. *Neuropharmacology* 2005; 49: 367-75.

Löscher W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status

epilepticus models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2002; 50: 105-23.

Lothe A, Didelot A, Hammers A, Costes N, Saoud M, Gilliam F, Ryvlin P. Comorbidity between temporal lobe epilepsy and depression: a [18F]MPPF PET study. *Brain* 2008; 131: 2765-82.

Lowry CA. Functional subsets of serotonergic neurones: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol* 2002; 14: 911-23.

Lu KT, Gean PW. Endogenous serotonin inhibits epileptiform activity in rat hippocampal CA1 neurons via 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor activation. *Neuroscience* 1998; 86: 729-37.

Lucki I, Nobler MS, Frazer A. Differential actions of serotonin antagonists on two behavioral models of serotonin receptor activation in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 228: 133-9.

Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA. G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 1997; 19: 687-95.

Maclean PD. Some psychiatric implications of physiological studies on frontotemporal portion of limbic system (visceral brain). *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1952; 4: 407-18.

Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 2000; 20: 9104-10.

Manser CE, Broom DM, Overend P, Morris TH. Investigations into the preferences of laboratory rats for nest-boxes and nesting materials. *Lab Anim* 1998; 32: 23-35.

Marcinkiewicz M, Vergé D, Gozlan H, Pichat L, Hamon M. Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT<sub>1</sub> sites in the rat brain. *Brain Res* 1984; 291: 159-63.

Markstein R, Hoyer D, Engel G. 5-HT<sub>1A</sub>-receptors mediate stimulation of adenylate cyclase in rat hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1986; 333: 335-41.

Mattson MP, Maudsley S, Martin B. BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2004; 27: 589-94.

Mauk MD, Peroutka SJ, Kocsis JD. Buspirone attenuates synaptic activation of hippocampal pyramidal cells. *J Neurosci* 1988; 8: 1-11.

Mazarati A, Shin D, Auvin S, Caplan R, Sankar R. Kindling epileptogenesis in immature rats leads to persistent depressive behavior. *Epilepsy Behav* 2007; 10: 377-83.

Mazarati A, Siddarth P, Baldwin RA, Shin D, Caplan R, Sankar R. Depression after status



epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine. *Brain* 2008; 131: 2071-83.

Mazarati AM, Shin D, Kwon YS, Bragin A, Pineda E, Tio D, Taylor AN, Sankar R. Elevated plasma corticosterone level and depressive behavior in experimental temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 2009; 34: 457-61.

Mellanby J, Strawbridge P, Collingridge GI, George G, Rands G, Stroud C, Thompson P. Behavioural correlates of an experimental hippocampal epileptiform syndrome in rats. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1981; 44: 1084-93.

Merkley R, Pippin JJ, Joffe AR. A survey to understand public opinion regarding animal use in medical training. *Altern Lab Anim* 2018; 46: 133-43.

Merlet I, Ostrowsky K, Costes N, Ryvlin P, Isnard J, Faillenot I, Lavenne F, Dufournel D, Le Bars D, Mauguière F. 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding and intracerebral activity in temporal lobe epilepsy: an [<sup>18</sup>F]MPPF-PET study. *Brain* 2004; 127: 900-13.

Middlemiss DN, Fozard JR. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT<sub>1</sub> recognition site. *Eur J Pharmacol* 1983; 90: 151-3.

Millan MJ, Bervoets K, Colpaert FC. 5-hydroxytryptamine (5-HT)<sub>1A</sub> receptors and the tail-flick response. I. 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin HBr-induced spontaneous tail-flicks in the rat as an in vivo model of 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256: 973-82.

Minjarez B, Camarena HO, Haramati J, Rodríguez-Yañez Y, Mena-Munguía S, Buriticá J, García-Leal O. Behavioral changes in models of chemoconvulsant-induced epilepsy: A review. *Neurosci Biobehav Rev* 2017; 83: 373-80.

Mogha A, Guariglia SR, Debata PR, Wen GY, Banerjee P. Serotonin 1A receptor-mediated signaling through ERK and PKC $\alpha$  is essential for normal synaptogenesis in neonatal mouse hippocampus. *Transl Psychiatry* 2012; 2: e66.

Mohajeri MH, Madani R, Saini K, Lipp HP, Nitsch RM, Wolfer DP. The impact of genetic background on neurodegeneration and behavior in seized mice. *Genes Brain Behav* 2004; 3: 228-39.

Möller C, Wolf F, van Dijk RM, Di Liberto V, Russmann V, Keck M, Palme R, Hellweg R, Gass P, Otzdorff C, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: I. Electrical kindling. *Epilepsia* 2018; 59: 765-77.

Montgomery KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol* 1955; 48: 254-60.

Moreau JL. Simulating the anhedonia symptom of depression in animals. *Dialogues Clin*

Neurosci 2002; 4: 351-60.

Moretti P, Bouwknecht JA, Teague R, Paylor R, Zoghbi HY. Abnormalities of social interactions and home-cage behavior in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 205-20.

Mormède P, Andanson S, Aupérin B, Beerda B, Guémené D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen CG, Richard S, Veissier I. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav* 2007; 92: 317-39.

Morton DB, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, Inglis I, James R, Page C, Sharman I, Verschoyle R, Westall L, Wilson AB. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. *Lab Anim* 2001; 35: 1-41.

Mouton PR (2002) *Principles and Practices of Unbiased Stereology : An Introduction for Bioscientists*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, US. 89-112.

Mouton PR (2011) *Unbiased Stereology: A Concise Guide*. John Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. 177 pages.

Mouton PR (2014) *Neurostereology : Unbiased Stereology of Neural Systems*. John Wiley & Sons, Incorporated, Hoboken, US. 54.

Mulisch M, Aescht E, Romeis B (2015) *Romeis Mikroskopische Technik*. Springer Spektrum, Berlin [u.a.]. 603 Seiten.

Nakamura K, Wong-Lin K. Functions and computational principles of serotonergic and related systems at multiple scales. *Front Integr Neurosci* 2014; 8: 23.

Napper RMA. Total Number Is Important: Using the Disector Method in Design-Based Stereology to Understand the Structure of the Rodent Brain. *Front Neuroanat* 2018; 12: 16.

National Research Council. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. In: *Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals* Washington (DC): National Academies Press (US)

Copyright © 2008, National Academy of Sciences. 2008:

Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 2010; 13: 1161-9.

Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci* 1995; 15:

7539-47.

Nichols DE, Nichols CD. Serotonin receptors. *Chem Rev* 2008; 108: 1614-41.

Nunes-de-Souza RL, Canto-de-Souza A, da-Costa M, Fornari RV, Graeff FG, Pelá IR. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and midazolam. *Psychopharmacology (Berl)* 2000; 150: 300-10.

Oberholzer MJ (1983) *Morphometrie in der klinischen Pathologie*. Springer, Berlin [u.a.]. XIV, 251 Seiten.

Ochs M. Morphometrie in der Mikroskopie: stereologische Methoden. In: Romeis - Mikroskopische Technik. Mulisch M, Welsch U, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2015: 515-24.

Ono Y, Lin HC, Tzen KY, Chen HH, Yang PF, Lai WS, Chen JH, Onozuka M, Yen CT. Active coping with stress suppresses glucose metabolism in the rat hypothalamus. *Stress* 2012; 15: 207-17.

Page DT, Kuti OJ, Sur M. Computerized assessment of social approach behavior in mouse. *Front Behav Neurosci* 2009; 3: 48.

Pakkenberg B, Gundersen HJ. Neocortical neuron number in humans: effect of sex and age. *J Comp Neurol* 1997; 384: 312-20.

Palchoudhuri M, Flügge G. 5-HT<sub>1A</sub> receptor expression in pyramidal neurons of cortical and limbic brain regions. *Cell Tissue Res* 2005; 321: 159-72.

Pan L, Gilbert F. Activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor subtype in the paraventricular nuclei of the hypothalamus induces CRH and ACTH release in the rat. *Neuroendocrinology* 1992; 56: 797-802.

Park H, Poo MM. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci* 2013; 14: 7-23.

Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin<sub>1A</sub> receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 10734-9.

Pasini A, Tortorella A, Gale K. Anticonvulsant effect of intranigral fluoxetine. *Brain Res* 1992; 593: 287-90.

Paxinos G, Watson C (2007) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Acad. Press, Amsterdam [u.a.]. XXXI S., 209 Bl.

Pazos A, Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 1985; 346: 205-30.

Pedigo NW, Yamamura HI, Nelson DL. Discrimination of multiple [3H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *J Neurochem* 1981; 36: 220-6.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985; 14: 149-67.

Peña-Rangel MT, Mercado R, Hernández-Rodríguez J. Regulation of glial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by serotonin: identification of participating receptors. *Neurochem Res* 1999; 24: 643-9.

Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *Br J Pharmacol* 2020; 177: 3617-24.

Pernhorst K, van Loo KM, von Lehe M, Priebe L, Cichon S, Herms S, Hoffmann P, Helmstaedter C, Sander T, Schoch S, Becker AJ. Rs6295 promoter variants of the serotonin type 1A receptor are differentially activated by c-Jun in vitro and correlate to transcript levels in human epileptic brain tissue. *Brain Res* 2013; 1499: 136-44.

Phillips HS, Hains JM, Armanini M, Laramée GR, Johnson SA, Winslow JW. BDNF mRNA is decreased in the hippocampus of individuals with Alzheimer's disease. *Neuron* 1991; 7: 695-702.

Pijlman FT, Wolterink G, Van Ree JM. Physical and emotional stress have differential effects on preference for saccharine and open field behaviour in rats. *Behav Brain Res* 2003; 139: 131-8.

Pineda E, Shin D, Sankar R, Mazarati AM. Comorbidity between epilepsy and depression: experimental evidence for the involvement of serotonergic, glucocorticoid, and neuroinflammatory mechanisms. *Epilepsia* 2010; 51 Suppl 3: 110-4.

Pineda EA, Hensler JG, Sankar R, Shin D, Burke TF, Mazarati AM. Plasticity of presynaptic and postsynaptic serotonin 1A receptors in an animal model of epilepsy-associated depression. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36: 1305-16.

Pitkänen A, Lukasiuk K, Dudek FE, Staley KJ. Epileptogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5.

Płaźnik A, Stefański R, Kostowski W. Restraint stress-induced changes in saccharin preference: the effect of antidepressive treatment and diazepam. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 33: 755-9.

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 1992; 12: 440-53.

Poole T. Happy animals make good science. *Lab Anim* 1997; 31: 116-24.

Popova NK, Naumenko VS, Cybko AS, Bazovkina DV. Receptor-genes cross-talk: effect of chronic 5-HT(1A) agonist 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin treatment on the expression of key genes in brain serotonin system and on behavior. *Neuroscience* 2010; 169: 229-35.

Popova NK, Naumenko VS. 5-HT1A receptor as a key player in the brain 5-HT system. *Rev Neurosci* 2013; 24: 191-204.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977; 266: 730-2.

Prescott MJ, Brown VJ, Flecknell PA, Gaffan D, Garrod K, Lemon RN, Parker AJ, Ryder K, Schultz W, Scott L, Watson J, Whitfield L. Refinement of the use of food and fluid control as motivational tools for macaques used in behavioural neuroscience research: report of a Working Group of the NC3Rs. *J Neurosci Methods* 2010; 193: 167-88.

Price LH, Cappiello A, Malison RT, McDougle CJ, Pelton GH, Schöllnhammer G, Heninger GR. Effects of antigluco-corticoid treatment on 5-HT1A function in depressed patients and healthy subjects. *Neuropsychopharmacology* 1997; 17: 246-57.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003; 463: 3-33.

Puglisi-Allegra S, Andolina D. Serotonin and stress coping. *Behav Brain Res* 2015; 277: 58-67.

Puhani J (2020) Statistik. Springer Gabler, Wiesbaden. XVIII, 212 Seiten.

R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria

Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1972; 32: 281-94.

Raghupathi RK, McGonigle P. Differential effects of three acute stressors on the serotonin 5-HT1A receptor system in rat brain. *Neuroendocrinology* 1997; 65: 246-58.

Rajmohan V, Mohandas E. The limbic system. *Indian J Psychiatry* 2007; 49: 132-9.

Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14476-81.

Rapport MM, Green AA, Page IH. Crystalline Serotonin. *Science* 1948; 108: 329-30.

Raymond JR, Mukhin YV, Gettys TW, Garnovskaya MN. The recombinant 5-HT<sub>1A</sub> receptor: G protein coupling and signalling pathways. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1751-64.

Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 2001; 92: 179-212.

Remy S, Beck H. Molecular and cellular mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy. *Brain* 2006; 129: 18-35.

Riad M, Emerit MB, Hamon M. Neurotrophic effects of ipsapirone and other 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists on septal cholinergic neurons in culture. *Brain Res Dev Brain Res* 1994; 82: 245-58.

Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, el Mestikawy S, Hamon M, Descarries L. Somatodendritic localization of 5-HT<sub>1A</sub> and preterminal axonal localization of 5-HT<sub>1B</sub> serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 2000; 417: 181-94.

Riad M, Watkins KC, Doucet E, Hamon M, Descarries L. Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors). *J Neurosci* 2001; 21: 8378-86.

Rivier C, Vale W. Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 1983; 305: 325-7.

Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 1997; 21: 801-10.

Rosiwal A. Ueber geometrische Gesteinsanalysen. *Verh. KK Geol. Reichsanst Wien* 1898: 143-75.

Russell WMS, Burch RL (1959) *The principles of humane experimental technique*. Methuen.

Rutten K, Schiene K, Robens A, Leipelt A, Pasqualon T, Read SJ, Christoph T. Burrowing as a non-reflex behavioural readout for analgesic action in a rat model of sub-chronic knee joint inflammation. *Eur J Pain* 2014; 18: 204-12.

Salgado-Commissariat D, Alkadhi KA. Serotonin inhibits epileptiform discharge by activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in CA1 pyramidal neurons. *Neuropharmacology* 1997; 36: 1705-12.

Samad N, Tahira P, Saida H, Haleem D. Attenuation of Restraint-induced Anorexia and Anxiogenic Behavior by Serotonin-1A Agonists in Rats. *Journal of Medical Sciences* 2005: 289-93.

Samad N, Perveen T, Haider S, Haleem M, Haleem DJ. Inhibition of restraint-induced

neuroendocrine and serotonergic responses by buspirone in rats. *Pharmacol Rep* 2006; 58: 636-42.

Sánchez C, Hyttel J. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol Neurobiol* 1999; 19: 467-89.

Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F. Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 2004; 14: 1100-9.

Sapa J, Zygmunt M, Kulig K, Malawska B, Dudek M, Filipek B, Bednarski M, Kusak A, Nowak G. Evaluation of anticonvulsant activity of novel pyrrolidin-2-one derivatives. *Pharmacol Rep* 2014; 66: 708-11.

Saudou F, Hen R. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes in vertebrates and invertebrates. *Neurochem Int* 1994; 25: 503-32.

Savic I, Lindström P, Gulyás B, Halldin C, Andréé B, Farde L. Limbic reductions of 5-HT1A receptor binding in human temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2004; 62: 1343-51.

Savitz J, Lucki I, Drevets WC. 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol* 2009; 88: 17-31.

Schain RJ, Freedman DX. Studies on 5-hydroxyindole metabolism in autistic and other mentally retarded children. *J Pediatr* 1961; 58: 315-20.

Schenkel LC, Bragatti JA, Becker JA, Torres CM, Martin KC, de Souza AC, Manfro GG, Leistner-Segal S, Bianchin MM. Serotonin gene polymorphisms and psychiatry comorbidities in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res* 2012; 99: 260-6.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9: 676-82.

Schmitt U, Hiemke C. Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1998; 22: 1197-215.

Schober P, Boer C, Schwarte LA. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesth Analg* 2018; 126: 1763-8.

Schöneberg T. Tolerance and Desensitization. In: *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*. Offermanns S, Rosenthal W, eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg 2008: 1203-7.

Schwabe K, Boldt L, Bleich A, van Dijk RM, Helgers SOA, Häger C, Nowakowska M, Riedesel AK, Schönhoff K, Struve B, Wittek J, Potschka H. Nest-building performance in rats: impact of vendor, experience, and sex. *Lab Anim* 2020; 54: 17-25.

Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp* 2015: e52434.

Seiffert I, van Dijk RM, Koska I, Di Liberto V, Möller C, Palme R, Hellweg R, Potschka H. Toward evidence-based severity assessment in rat models with repeated seizures: III. Electrical post-status epilepticus model. *Epilepsia* 2019; 60: 1539-51.

Seo J, Jung S, Lee SY, Yang H, Kim BS, Choi J, Bang M, Shin HS, Jeon D. Early deficits in social behavior and cortical rhythms in pilocarpine-induced mouse model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 2013; 241: 38-44.

Sharp T, Hjorth S. Application of brain microdialysis to study the pharmacology of the 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptor. *J Neurosci Methods* 1990; 34: 83-90.

Sharp T, Boothman L, Raley J, Queree P. Important messages in the 'post': recent discoveries in 5-HT neurone feedback control. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 629-36.

Slomianka L, West MJ. Estimators of the precision of stereological estimates: an example based on the CA1 pyramidal cell layer of rats. *Neuroscience* 2005; 136: 757-67.

Smith D, Anderson D, Degryse AD, Bol C, Criado A, Ferrara A, Franco NH, Gyertyan I, Orellana JM, Ostergaard G, Varga O, Voipio HM. Classification and reporting of severity experienced by animals used in scientific procedures: FELASA/ECLAM/ESLAV Working Group report. *Lab Anim* 2018; 52: 5-57.

Smith SM, Vale WW. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci* 2006; 8: 383-95.

Smythies J. Section V. Serotonin system. *Int Rev Neurobiol* 2005; 64: 217-68.

Sniecikowska J, Newman-Tancredi A, Kolaczowski M. From Receptor Selectivity to Functional Selectivity: The Rise of Biased Agonism in 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Drug Discovery. *Curr Top Med Chem* 2019; 19: 2393-420.

Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Mapplebeck JC, Wei P, Zhan S, Zhang S, McDougall JJ, King OD, Mogil JS. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 2011; 7: 55.

Stahn AC, Gunga HC, Kohlberg E, Gallinat J, Dinges DF, Kuhn S. Brain Changes in Response to Long Antarctic Expeditions. *N Engl J Med* 2019; 381: 2273-5.



Stam NJ, Van Huizen F, Van Alebeek C, Brands J, Dijkema R, Tonnaer JA, Olijve W. Genomic organization, coding sequence and functional expression of human 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptor genes. *Eur J Pharmacol* 1992; 227: 153-62.

Stamford JA, Davidson C, McLaughlin DP, Hopwood SE. Control of dorsal raphé 5-HT function by multiple 5-HT(1) autoreceptors: parallel purposes or pointless plurality? *Trends Neurosci* 2000; 23: 459-65.

Starke K. Kapitel 2 - Grundlagen der Pharmakologie des Nervensystems. In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (Elfte Ausgabe). Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, eds. Munich: Urban & Fischer 2013: 95-125.

Statnick MA, Dailey JW, Jobe PC, Browning RA. Abnormalities in 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptor binding in severe-seizure genetically epilepsy-prone rats (GEPR-9s). *Neuropharmacology* 1996; 35: 111-8.

Steen B, Hendriksen C, Visser J, Cussler K, Morton D, Streijer F. The evaluation of humane endpoints in pertussis vaccine potency testing. RIVM Rapport 623860007 1999;

Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 1984; 134: 127-36.

Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L, Rajkowska G. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci* 1998; 18: 7394-401.

Strech D, Dirnagl U. 3Rs missing: animal research without scientific value is unethical. *BMJ Open Science* 2019; 3: bmjos-2018-000048.

Stuart A (1984) *The ideas of sampling*. Griffin, High Wycombe. VIII, 91 pages.

Sturman O, Germain PL, Bohacek J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test. *Stress* 2018; 21: 443-52.

Su L, Cai Y, Xu Y, Dutt A, Shi S, Bramon E. Cerebral metabolism in major depressive disorder: a voxel-based meta-analysis of positron emission tomography studies. *BMC Psychiatry* 2014; 14: 321.

Svob Strac D, Pivac N, Smolders IJ, Fogel WA, De Deurwaerdere P, Di Giovanni G. Monoaminergic Mechanisms in Epilepsy May Offer Innovative Therapeutic Opportunity for Monoaminergic Multi-Target Drugs. *Front Neurosci* 2016; 10: 492.

Szewczyk B, Kotarska K, Daigle M, Misztak P, Sowa-Kucma M, Rafalo A, Curzytek K, Kubera M, Basta-Kaim A, Nowak G, Albert PR. Stress-induced alterations in 5-HT<sub>1A</sub> receptor transcriptional modulators NUDR and Freud-1. *Int J Neuropsychopharmacol* 2014; 17: 1763-75.

Theodore WH, Hasler G, Giovacchini G, Kelley K, Reeves-Tyer P, Herscovitch P, Drevets W. Reduced hippocampal 5HT1A PET receptor binding and depression in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2007; 48: 1526-30.

Theodore WH, Wiggs EA, Martinez AR, Dustin IH, Khan OI, Appel S, Reeves-Tyer P, Sato S. Serotonin 1A receptors, depression, and memory in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2012; 53: 129-33.

Thoenen H. The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 1991; 14: 165-70.

Thomas DR, Soffin EM, Roberts C, Kew JN, de la Flor RM, Dawson LA, Fry VA, Coggon SA, Faedo S, Hayes PD, Corbett DF, Davies CH, Hagan JJ. SB-699551-A (3-cyclopentyl-N-[2-(dimethylamino)ethyl]-N-[(4'-[[[2-phenylethyl]amino]methyl]-4-biphenyl)methyl]propanamide dihydrochloride), a novel 5-HT<sub>5A</sub> receptor-selective antagonist, enhances 5-HT neuronal function: Evidence for an autoreceptor role for the 5-HT<sub>5A</sub> receptor in guinea pig brain. *Neuropharmacology* 2006; 51: 566-77.

Thomson E. Quantitative microscopic analysis. *The Journal of Geology* 1930; 38: 193-222.

Toczek MT, Carson RE, Lang L, Ma Y, Spanaki MV, Der MG, Fazilat S, Kopylev L, Herscovitch P, Eckelman WC, Theodore WH. PET imaging of 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding in patients with temporal lobe epilepsy. *Neurology* 2003; 60: 749-56.

Trimmer JS. Recombinant Antibodies in Basic Neuroscience Research. *Curr Protoc Neurosci* 2020; 94: e106.

Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc* 2011; 243: 47-59.

Van Bogaert P, De Tiège X, Vanderwinden JM, Damhaut P, Schiffmann SN, Goldman S. Comparative study of hippocampal neuronal loss and in vivo binding of 5-HT<sub>1a</sub> receptors in the KA model of limbic epilepsy in the rat. *Epilepsy Res* 2001; 47: 127-39.

van der Hart MG, Czéh B, de Biurrun G, Michaelis T, Watanabe T, Natt O, Frahm J, Fuchs E. Substance P receptor antagonist and clomipramine prevent stress-induced alterations in cerebral metabolites, cytogenesis in the dentate gyrus and hippocampal volume. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 933-41.

van Dijk RM, Di Liberto V, Brendel M, Waldron AM, Möller C, Gildehaus FJ, von Ungern-Sternberg B, Lindner M, Ziegler S, Hellweg R, Gass P, Bartenstein P, Potschka H. Imaging biomarkers of behavioral impairments: A pilot micro-positron emission tomographic study in a rat electrical post-status epilepticus model. *Epilepsia* 2018; 59: 2194-205.

van Dijk RM, Koska I, Bleich A, Tolba R, Seiffert I, Möller C, Di Liberto V, Talbot SR, Potschka H. Design of composite measure schemes for comparative severity assessment in animal-based neuroscience research: A case study focussed on rat epilepsy models. *PLoS One*

2020; 15: e0230141.

Van Laeken N, Pauwelyn G, Dockx R, Descamps B, Brans B, Peremans K, Baeken C, Goethals I, Vanhove C, De Vos F. Regional alterations of cerebral [(18)F]FDG metabolism in the chronic unpredictable mild stress- and the repeated corticosterone depression model in rats. *J Neural Transm (Vienna)* 2018; 125: 1381-93.

Van Loo PL, Baumans V. The importance of learning young: the use of nesting material in laboratory rats. *Lab Anim* 2004; 38: 17-24.

van Vliet EA, Aronica E, Gorter JA. Role of blood-brain barrier in temporal lobe epilepsy and pharmacoresistance. *Neuroscience* 2014; 277: 455-73.

Vergé D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, el Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT1 receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci* 1986; 6: 3474-82.

Volpi-Abadie J, Kaye AM, Kaye AD. Serotonin syndrome. *Ochsner J* 2013; 13: 533-40.

Wada T, Sameshima A, Yonezawa R, Morita M, Sawakawa K, Tsuneki H, Sasaoka T, Saito S. Impact of central and peripheral estrogen treatment on anxiety and depression phenotypes in a mouse model of postmenopausal obesity. *PLoS One* 2018; 13: e0209859.

Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc* 2007; 2: 322-8.

Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 2003; 299: 76.

Wanke R, Weis S, Kluge D, Kahnt E, Schenk E, Brem G, Hermanns W. Morphometric evaluation of the pancreas of growth hormone-transgenic mice. *Acta Stereologica* 1994; 13: 3-8.

Wanke R. Stereology--benefits and pitfalls. *Exp Toxicol Pathol* 2002; 54: 163-4.

Wei T, Simko V. R package "corrplot": Visualization of a Correlation Matrix (Version 0.84). 2017: <https://github.com/taiyun/corrplot>. 16. September 2020.

Weibel ER, Kistler GS, Scherle WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol* 1966; 30: 23-38.

Weibel ER (1979) *Stereological methods*. Acad. Pr., London u.a. 415 Seiten.

West MJ, Slomianka L, Gundersen HJ. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 1991; 231: 482-97.

West MJ. Introduction to stereology. Cold Spring Harb Protoc 2012; 2012

Whimbey AE, Denenberg VH. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. J Comp Physiol Psychol 1967; 63: 500-4.

Whirledge S, Cidlowski JA. Glucocorticoids, stress, and fertility. Minerva Endocrinol 2010; 35: 109-25.

Whitaker-Azmitia PM, Clarke C, Azmitia EC. Localization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors to astroglial cells in adult rats: implications for neuronal-glia interactions and psychoactive drug mechanism of action. Synapse 1993; 14: 201-5.

Wickham H (2016) ggplot2: elegant graphics for data analysis. Springer Verlag, New York.

Willner P. The validity of animal models of depression. Psychopharmacology (Berl) 1984; 83: 1-16.

Willner P, Muscat R, Papp M. Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. Neurosci Biobehav Rev 1992; 16: 525-34.

Wilson RC, Vacek T, Lanier DL, Dewsbury DA. Open-field behavior in muroid rodents. Behav Biol 1976; 17: 495-506.

Wolfensohn S, Hawkins P, Lilley E, Anthony D, Chambers C, Lane S, Lawton M, Robinson S, Voipio HM, Woodhall G. Reducing suffering in animal models and procedures involving seizures, convulsions and epilepsy. J Pharmacol Toxicol Methods 2013; 67: 9-15.

Woolley DW, Shaw E. A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders Proc Natl Acad Sci U S A 1954; 40: 228-31.

Xie L, Chen J, Ding YM, Gui XW, Wu LX, Tian S, Wu W. MicroRNA-26a-2 maintains stress resiliency and antidepressant efficacy by targeting the serotonergic autoreceptor HTR<sub>1A</sub>. Biochem Biophys Res Commun 2019; 511: 440-6.

Yan W, Wilson CC, Haring JH. 5-HT<sub>1a</sub> receptors mediate the neurotrophic effect of serotonin on developing dentate granule cells. Brain Res Dev Brain Res 1997; 98: 185-90.

Zacharová G, Kubínová L. Stereological methods based on point counting and unbiased counting frames for two-dimensional measurements in muscles: comparison with manual and image analysis methods. J Muscle Res Cell Motil 1995; 16: 295-302.

Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG. Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. Science 2004; 305: 217.

Zhou J, Cao X, Mar AC, Ding YQ, Wang X, Li Q, Li L. Activation of postsynaptic 5-HT<sub>1A</sub> receptors improve stress adaptation. Psychopharmacology (Berl) 2014; 231: 2067-75.

---

Zifa E, Fillion G. 5-Hydroxytryptamine receptors. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 401-58.

Zimmer L, Rbah L, Giacomelli F, Le Bars D, Renaud B. A reduced extracellular serotonin level increases the 5-HT<sub>1A</sub> PET ligand 18F-MPPF binding in the rat hippocampus. *J Nucl Med* 2003; 44: 1495-501.

## X. ANHANG

### 1. Geräte

Geräte	Hersteller
Eppendorf Zentrifuge 5418	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Haake SWB25 Wasserbad	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kamera MBF CX9000	MBF Bioscience, Williston, VT, USA
KEYENCE Mikroskop Modell BZ-X710	KEYENCE GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Konfokales Lasermikroskop LSM 880 mit Airyscan	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Kryostat	Microm GmbH, Walldorf, Deutschland
Leica Mikroskop Typ DMLB	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte	VWR International GmbH, USA
Motorisierter Objektisch	MBF Bioscience, Williston, VT, USA
Personal Computer	Diverse
pH-meter	Hanna Instruments GmbH, Vöhringen, Deutschland
Qualitron Micro Centrifuge Model DW-41-115	Impexron GmbH, Pfullingen, Deutschland
Schüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Vortexer LMS® VTX-3000L Mixer Uzuso	LSM Technologies, Brisbane, Australien

## 2. Software

Software	Hersteller
BZ-X-Viewer	KEYENCE GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
EndNote Version X9.3.3	Clarivate Analytics, USA
Fiji	National Institutes of Health, USA
Graph Pad Prism Version 5.04	GraphPad, San Diego, CA, USA
Microsoft Office® für Windows	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft Office® für Mac	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
RStudio Version 1.2.1335	RStudio Team, Boston, MA, USA
Stereo Investigator® Version 2017.03.3	MBF Bioscience, Williston, VT, USA
Zen software: Digital Imaging for Light Microscopy - Black edition Version 2.3.	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland

## 3. Lösungen und Substanzen

### Lösungen

*30-prozentige Zuckerlösung für perfundierte Gehirne (Angaben pro Gehirn)*

- 6 g Haushaltszucker
- ad 20 ml 0.1 M Phosphatpuffer

*4-prozentiges Paraformaldehyd (PFA) in 0.1 M Phosphatpuffer*

- 200 ml 8-prozentiges Paraformaldehyd
- verdünnen mit 200 ml 0.2 M Phosphatpuffer

*0.01 M phosphatgepufferte Kochsalzlösung*

- 9 g NaCl
- 50 ml 0.2 M Phosphatpuffer

- mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen

*Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7.4)*

- 8.0 g NaCl
- 0.2 g KCl
- 1.44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0.24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen

*Kryoprotektivum im Verhältnis 3:3:1:3*

- 98% Glycerin
- Ethylenglykol
- 0.2 M Phosphatpuffer
- destilliertes Wasser

*Phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween®-20 (PBST)*

- PBS
- 0.1 % Tween®-20

*10 mM Natriumcitratpuffer (pH 6.0)*

- 10 mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat
- Bidestilliertes Wasser
- mithilfe von 2 M HCL auf pH 6.0 anpassen

*Trägerlösung*

- 1% BSA
- 0.3 % Triton™ X-100
- 1% normales Ziegenserum S-1000
- PBS 1X

*3%-prozentige Wasserstoffperoxid Lösung*

- 1 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 9 ml destilliertes Wasser

*Blockpuffer*

- BSA 2%
- Trägerlösung



*DAB-Lösung*

- Merck DAB-Tabletten auf Raumtemperatur bringen
- 20 ml bidestilliertes Wasser pro Tablette
- 40 µl 3%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung pro 20 ml DAB-Lösung

*DAPI Arbeitslösung*

- 0.2 µl Hoechst® 33342
- 1 ml PBS

*Chromgelatine*

- 7g Gelatine
- 900 ml destilliertes Wasser
- 0,7 g Chrom (III)-Kaliumsulfat Dodecahydrat
- 2 Spatelspitzen Thymol

**Substanzen**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Tabletten	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bidestilliertes Wasser	eigene Herstellung
Bovines Serumalbumin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chrom(III)-Kaliumsulfat Dodecahydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck Millipore, Burlington, USA
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hoechst® 33342	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Immunfluoreszenzmedium	DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Millipore, Burlington, USA

---

Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck Millipore, Burlington, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck Millipore, Burlington, USA
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Normales Ziegen Serum S-1000	Vector Labs, Burlingame, USA
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pentobarbital (Narcoren®)	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Stickstoff (flüssig)	Besamungsstation München/Grub, Deutschland
Tissue-Tek®	Sakura Finetek, Europa
Thymol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck Millipore, Burlington, USA
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Tween®-20	Merck Millipore, Burlington, USA
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Xylol (Isomerengemisch)	VWR Chemicals, Radnor, USA

---

**Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Wirtspezies</b>
<b>Primäre Antikörper</b>			
Polyklonaler Anti-5-HT <sub>1A</sub> - Rezeptor-AK	abcam 227165	Abcam, Cambridge, UK	Kaninchen
Monoklonaler Anti-GFAP-AK	ab4648	Abcam, Cambridge, UK	Maus
Monoklonaler Anti-NeuN-AK	MAB377	Merck Millipore, Burlington, USA	Maus
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
Polyklonaler Ziege-anti- Kaninchen-AK, biotinyliert	BA-1000	Vector, Burlingame, USA	Ziege
Polyklonaler Ziege-anti- Kaninchen-AK, Alexa Fluor® 647	A-27040	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Ziege
Polyklonaler Ziege-anti-Maus- AK, Cyanine3	ab97035	Abcam, Cambridge, UK	Ziege
Polyklonaler Ziege-anti-Maus- AK, Alexa Fluor® 488	A-11029	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Ziege

**Verwendete Kits**

<b>Kit</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
VECTASTAIN® ABC-HRP-Kit	PK-4000	Vector, Burlingame, USA

## 4. Etablierung der Färbungen

### Protokoll der Etablierung der Enzym-Substrat-Färbung

1. AK (Wirt)	Konzentration	Ergebnis	Nächste Schritte
Anti-5-HT <sub>1A</sub> - Rezeptor (Kaninchen) ab85615	1:200 1:500 1:1000	Keine spezifische Färbung in <i>Hippocampus</i> und <i>Septum</i>	Neuen AK ab227165 testen
Anti-5-HT <sub>1A</sub> - Rezeptor (Kaninchen) ab227165	1:200 1:500 1:1000	Spezifische Färbung in <i>Septum</i> und <i>Hippocampus</i> . Eine Verdünnung bis zu 1:1000 ist zur Darstellung der Strukturen geeignet.	-

## Protokoll der Etablierung der Immunfluoreszenzfärbung

1. AK (Wirt)	Konz.	2. AK (Wirt)	Konz.	3. AK (Wirt)	Konz.	Besonderheit	Ergebnis	Nächste Schritte
Anti-GFAP (Maus) ab4646	1:1500	Anti-5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor (Kaninchen) ab227165	1:1000	Anti-NeuN (Maus) MAB377 Charge 3075598	1:500		GFAP funktioniert sehr gut, 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor etwas schwach, NeuN nicht sichtbar	NeuN andere Charge ausprobieren, Konzentration des 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptors anpassen
		Anti-5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor (Kaninchen) ab227165	1:1000 1:500	Anti-NeuN (Maus) MAB377 Charge 3075598 & Charge 3018823	1:500	Verschiedene Chargennummern (NeuN) und Cy2 als sekundären AK getestet	5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor 1:500 deutlich besser sichtbar als 1:1000 NeuN: beide Chargen funktionieren, die neue Charge deutlich besser (3018823)	Test Dreifachfärbung mit: GFAP 1:1500 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor 1:500 NeuN neue Charge
Anti-GFAP (Maus) ab4646	1:1500	Anti-5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor (Kaninchen) ab227165	1:500	Anti-NeuN (Maus) MAB377 (3018823)	1:500		Sehr gutes Ergebnis	Test der neu bestellten AK

1. AK (Wirt)	Konz.	2. AK (Wirt)	Konz.	3. AK (Wirt)	Konz.	Ergebnis	Nächste Schritte
Anti-GFAP (Maus) ab4646	1:1500 1:3000	Anti-5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor (Kaninchen) ab227165	1:500	Anti-NeuN (Maus)	1:500	Test der neu bestellten AK NeuN und GFAP in Ordnung, 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor stellt andere Strukturen dar als zuvor	Neuer Test des 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor AK 1:500, 1:000 Verdünnung sowie mit 2µl und 5µl DAPI, alter AK erneut mit 2 µl
Anti-5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor (Kaninchen) ab227165 neue Charge	1:500 1:1000	Anti-5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor (Kaninchen) ab227165 alte Charge	1:500			neue Charge des 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptors färbt unspezifisch; 2µl Hoechst sind ausreichend	Weitere Färbung mit 3 Verdünnungen mit einem anderen Batch derselben Charge
Anti-5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor (Kaninchen) ab227165 neue Charge	1:500 1:1000 1:3000					Gleiches Ergebnis wie zuvor	Verbleibende alte AK für die Mehrfach-Immunfluoreszenzfärbung verwenden
Anti-GFAP (Maus)	1:3000	Anti-5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor (Kaninchen) ab227165 alte Charge	1:500	Anti-NeuN (Maus)	1:500	GFAP stellt sich nicht gut dar	-

## 5. Protokolle

### Enzym-Substrat-Färbung

---

#### Färbung in 12-Well-Platten mit NetWells®

---

Tag 1

- 3 × 5 min in PBST waschen
- 1 x 30 min hitzeinduzierte Epitopdemaskierung in Natriumcitratpuffer (pH 6) im vorgeheizten Wasserbad bei 80°C
- 1 x 10 min abkühlen lassen
- 3 × 5 min in PBST waschen
- 30 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS inkubieren
- 3 × 5 min in PBST waschen
- 1 x 60 min in Blockpuffer inkubieren
- Primärer Anti-5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Antikörper (Wirtspezies: Kaninchen, ab227165, Abcam, Cambridge, UK) 1:1000 in Trägerlösung über Nacht bei 4°C inkubieren

Tag 2

- 4 × 3 min in PBST waschen
- Inkubation in dem biotinylierten, sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper (Wirtspezies: Ziege, BA-1000, Vector, Burlingame, USA) 1:1000 in Trägerlösung für 60 min bei Raumtemperatur
- 4 × 3 min in PBST waschen
- Inkubation in ABC-Kit (PK-4000, Vector, Burlingame, USA) 1:100 in PBST für 60 min bei Raumtemperatur  
*ABC-Kit entsprechend der Anleitung 30 min vor Verwendung vorbereiten*
- 4 × 3 min in PBS waschen
- ± 1 min Inkubation in DAB-Lösung (bis zur gewünschten Farbintensität)
- kurz mit bidestilliertem Wasser ausspülen und so die Reaktion stoppen
- 2 × 5 min in PBS waschen
- Schnitte in PBS-Puffer auf vorbehandelte Objektträger (z.B. Starfrost, Superfrost oder andere) aufziehen
- Präparate über Nacht trocknen lassen

Tag 3

- eine Minute in Xylol verbringen
-

- Objektträger mit Entellan und Menzel Deckglas Stärke 1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) eindecken

## **Immunfluoreszenzfärbung**

### **Färbung in 12-Well-Platten mit NetWells®**

- |              |   |
|--------------|---|
| <b>Tag 1</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 3 × 5 min in PBST waschen</li> <li>• 1 x 30 min hitzeinduzierte Epitopdemaskierung mit Natriumcitrat (pH 6) im vorgeheizten Wasserbad bei 80°C</li> <li>• 1 x 10 min abkühlen lassen</li> <li>• 3 × 5 min in PBST waschen</li> <li>• 1 x 60 min in Blockpuffer inkubieren</li> <li>• Erster primärer AK (anti-GFAP, Wirtspezies Maus, ab4648, Abcam, Cambridge, UK) 1:3000 und zweiter primärer AK (anti-5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor, Wirtspezies Kaninchen, ab227165, Abcam, Cambridge, UK) 1:500 in Trägerlösung über Nacht bei 4° inkubieren</li> </ul>  |
| <b>Tag 2</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 × 3 min in PBST waschen</li> <li>• <u>Ab diesem Zeitpunkt sollte im Dunklen gearbeitet werden, um die Fluorophore zu schützen.</u></li> <li>• Erster sekundärer Ziege-anti-Maus-AK (Cy3, ab97035, Abcam, Cambridge, UK) 1:1000 und zweiter sekundärer Ziege-anti-Kaninchen-AK (Alexa Fluor® 647, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 1:500 in Trägerlösung bei Raumtemperatur für 60 min inkubieren</li> <li>• 4 × 3 min in PBST waschen</li> <li>• Dritter primärer AK (NeuN, Wirtspezies: Maus, MAB377, Merck Millipore, Burlington, USA) 1:500 in Trägerlösung über Nacht bei 4° inkubieren lassen</li> </ul> |
| <b>Tag 3</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 4 × 3 min in PBST waschen</li> <li>• Dritter sekundärer Ziege-anti-Maus-AK (Alexa Fluor® 488, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 1:1000 in Trägerlösung bei Raumtemperatur für 60 Minuten inkubieren lassen</li> <li>• 2 × 3 min in PBST waschen</li> </ul>   |



- 2 × 3 min in PBS waschen
- 30 s in DAPI-Arbeitslösung inkubieren
- 3 × 3 min in PBS waschen
- gefärbte Schnittpräparate mit Chromgelatine auf Objektträger aufziehen
- 15 min auf einer Heizplatte bei 45°C trocknen lassen
- eindecken mit Immunfluoreszenz-Eindeckmedium (DIANOVA GmbH, Hamburg, Deutschland) und Menzel Deckglas Stärke 1,5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
- Deckglas fixieren
- Lagerung im Kühlschrank

## 6. Fehlerkoeffizienten der Volumenbestimmung des Referenzraumes nach Cavalieri

		Sept	CA1	CA3	GD	Hil
<b>Restraint-Stressmodell</b>	Naiv	0.15	0.15	0.15	0.15	0.14
	Transport	0.17	0.16	0.14	0.15	0.14
	<i>Restraint</i>	0.15	0.16	0.16	0.13	0.14
<b>Post-SE-Modell (elektrisch)</b>	Naiv	0.14	0.15	0.15	0.13	0.13
	<i>Sham</i>	0.13	0.15	0.14	0.14	0.14
	SE	0.15	0.15	0.14	0.13	0.14
<b>Post-SE-Modell (chemisch)</b>	Naiv	0.21	0.14	0.14	0.13	0.13
	<i>Sham</i>	0.25	0.14	0.14	0.13	0.13
	SE	0.26	0.14	0.14	0.13	0.14

Tabelle 7: Für die stereologische Volumenbestimmung des Referenzraumes nach CAVALIERI (1635) wurde der Fehlerkoeffizient (Gundersen,  $m = 0$ ) für die einzelnen Messungen bestimmt. In dieser Tabelle werden für die untersuchten Modelle und Hirnregionen, die Fehlerkoeffizienten (CE) in den experimentellen Gruppen dargestellt. Im Mittel war der CE in allen Modellen, Gruppen und Regionen 0.15.

Sept: *Septum*, CA1: *Cornu ammonis 1*, CA3: *Cornu ammonis 3*, GD: *Gyrus dentatus*, Hil: *Hilus*, SE: *Status Epilepticus*.

## 7. R-Skripte

### Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni Korrektur

---

```
#Vorbereitungen
```

```
rm(list=ls())
```

```
setwd("")
```

---

```
#One-way ANOVA
```

```
##Septum (Beispiel)
```

```
aov_Sept <- aov(Sept ~ Group, data = d)
```

```
summary(aov_Sept)
```

---

```
#Bonferroni Korrektur
```

```
##Septum (Beispiel)
```

```
BonferroniSept <- pairwise.t.test(d$Sept, d$Group, pool.sd = T,  
                                p.adjust.method = "bonferroni")
```

```
BonferroniSept
```

---

### Kastengrafik (engl. *box-plot*)

---

```
#Vorbereitungen
```

```
rm(list=ls())
```

```
library("ggplot2")
```

```
install.packages("XLConnect")
```

```
library("reshape2")
```

```
library(ggtext)
```

```
setwd("")
```

```
d<-read.csv2(".csv", header=T)
```

```
d$Group<-as.factor(d$Group)
```

```
d$Sept <- as.numeric(d$Sept)
```

```
d$CA1 <- as.numeric(d$CA1)
```

```
d$CA3 <- as.numeric(d$CA3)
```

```
d$DG <- as.numeric(d$DG)
```

```
d$Hil <- as.numeric(d$Hil)
```

---

```
#Reihenfolge anpassen
```

---

---

```
d$Group <- factor(d$Group, levels=c("Naive", "Sham", "SE"))
str(d)
d
```

---

```
#Darstellung der Kastengrafik
```

---

```
##Optische Dichte (OD)
```

---

```
##Septum (Beispiel)
```

---

```
Sept<-ggplot(d, aes(x=Group, y=Sept, colour=Group, shape=Group)) +
  geom_boxplot(outlier.colour = "white",na.rm=TRUE) +
  geom_jitter(width=0.12,size=1.5, na.rm=TRUE) +
  labs(y = "Optical density [OD] \n Septum", x = "") +
  lims(y=c(0,0.8))+
  theme_classic()+
  theme(axis.text = element_text(size=14),
        axis.title.x = element_markdown(size=14),
        axis.title.y=element_markdown(size=14))+
  scale_shape_manual(values=c(1,15,17)) +
  scale_color_manual(values=c("forestgreen","darkblue","brown2")) +
  theme(legend.position=("")) +
  theme(plot.title = element_text(color="black",size=14, face="bold",hjust=0.5))

Sept
```

---

```
##Absolutes Rezeptorvolumen (VTotal)
```

---

```
##Septum (Beispiel)
```

---

```
Sept<-ggplot(d, aes(x=Group, y=Sept, colour=Group, shape=Group)) +
  geom_boxplot(outlier.colour = "white",na.rm=TRUE) +
  geom_jitter(width=0.12,size=1.5, na.rm=TRUE) +
  labs(y = "Total receptor volume in mm^3 \n Septum", x = "") +
  lims(y=c(0,0.5))+
  theme_classic()+
  theme(axis.text = element_text(size=14),
        axis.title.x = element_markdown(size=14),
        axis.title.y=element_markdown(size=14))+
  scale_shape_manual(values=c(1,15,17)) +
```

---

---

```
scale_color_manual(values=c("forestgreen","darkblue","brown2")) +  
theme(legend.position=("")) +  
theme(plot.title = element_text(color="black",size=14, face="bold",hjust=0.5))
```

---

Sept

---

*##Layout*

---

```
install.packages("gridExtra")  
library(gridExtra)  
grid.arrange(Sept, CA1, CA3, DG, Hil, nrow=2)
```

---

## **Korrelationsmatrix**

---

*#Vorbereitungen*

---

```
rm(list=ls())  
setwd("")  
library("corrplot")  
library("caret")  
library("made4")  
library("Hmisc")  
library("gridExtra")
```

---

*#Daten einlesen*

---

```
C1 <- read.csv(".csv", sep=';', dec=",",check.names = F)
```

---

*#wählt nur die Daten ohne Tiernummer oder experimentelle Gruppe aus*

---

```
rownames(C1) <- C1$ID  
all_C1 <- C1[,3:NCOL(C1)]
```

---

*#Korrelationsanalyse*

---

```
cor <- rcorr(as.matrix(all_C1), type="spearman")  
cormat <- round(cor$r,2)
```

---

*#Schreiben der p und r Werte*

---

```
write.csv2(round(cor$r,2), "cor_matrix_r.csv")  
write.csv2(cor$p, "cor_matrix_p.csv")
```

---

*#Auswahl der Zeilen*

---

```
cormat <- cormat[1:10,]
```

---

*#Darstellung der Korrelationsmatrix*

---

---

```
corrplot(cormat, method="color", tl.col="black", tl.cex=1.0, cl.cex = 1.0, type="upper")
```

```
#Speichern der Korrelationsmatrix als PDF
```

---

```
pdf(file="cor_matrix.pdf", width=15, height=15)
```

```
corrplot(cormat, method="color", tl.col="black", tl.cex=1.0, cl.cex = 1.0, type="upper")
```

```
dev.off()
```

---

## XI. PUBLIKATIONSLISTE

Teile dieser Arbeit wurden unter dem Titel „**Hippocampal and Septal 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Expression in Two Rat Models of Temporal Lobe Epilepsy**“ bei dem Journal *Neuroscience* veröffentlicht:

### **Hippocampal and Septal 5-HT<sub>1A</sub> Receptor Expression in Two Rat Models of Temporal Lobe Epilepsy**

Schönhoff K, von Rüden EL, Koska I, Seiffert I, Potschka H.

#### **Weitere Publikationen:**

##### **Molecular alterations of the TLR4-signaling cascade in canine epilepsy.**

von Rüden EL, Gualtieri F, Schönhoff K, Reiber M, Wolf F, Baumgärtner W, Hansmann F, Tipold A, Potschka H.

##### **Nest-building performance in rats: impact of vendor, experience, and sex.**

Schwabe K, Boldt L, Bleich A, van Dijk RM, Helgers SOA, Häger C, Nowakowska M, Riedesel AK, Schönhoff K, Struve B, Wittek J, Potschka H.

##### **Impact of repeated kindled seizures on heart rate rhythms, heart rate variability, and locomotor activity in rats.**

Möller C, van Dijk RM, Wolf F, Keck M, Schönhoff K, Bierling V, Potschka H.

## XII. DANKSAGUNG

Abschließend möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich im Rahmen dieser Arbeit unterstützt haben. An erster Stelle gilt mein Dank Frau Prof. Dr. Heidrun Potschka für die Möglichkeit schon während meines Studiums an zahlreichen, interessanten Projekten mitarbeiten zu können. Darüber hinaus bedanke ich mich für die fachliche Betreuung meiner Dissertation. Dr. Eva-Lotta von Rüden, PhD danke ich für die Mitbetreuung und insbesondere das kritische und konstruktive Korrekturlesen meiner Arbeit. Dem gesamten Team der Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie danke ich für eine spannende und lehrreiche Zeit. Dr. Maarten van Dijk, PhD danke ich für sein Engagement bei der Erklärung von Zusammenhängen bezüglich der Stereologie, Statistik und R. Fabio Gualtieri, PhD möchte ich dafür danken mir wichtige Grundlagen der Mikroskopie erklärt zu haben. Den anderen Doktorandinnen, Dr. Lena Boldt, Dr. Marta Nowakowska, Dr. Isabel Seiffert, Dr. Ines Koska, Nina Miljanović, Katharina Aulehner, Verena Buchecker und Maria Reiber, danke ich für eine tolle Zeit am Institut. Weiterhin möchte ich mich bei Helen Stirling, Anke Bettenbrock, Sabine Sass, Sieglinde Fischlein, Sarah Glisic und Claudia Siegl für die technische Unterstützung bedanken. Vor allem Claudia gilt mein besonderer Dank für den intensiven Austausch, ihre Geduld und die Bereitschaft ihr Wissen bezüglich der Laborarbeit und der immunhistochemischen Methoden weiterzugeben. Darüber hinaus danke ich Dr. Claudia Pace, Grazyna Langer, Susanne Legat, Isabella Waclawczyk, Andreas Kutschka, Katharina Gabriel, Sabine Vican und Uwe Roßberg für die freundliche Zusammenarbeit im Institut. Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung geht mein Dank an das statistische Beratungslabor der LMU, insbesondere an Maximilian Weigert und Juliana Schäfer, sowie an die Staburo GmbH für das Kursangebot zum Thema Statistik. Für die Beantwortung von Fragestellungen zum Thema der Stereologie geht mein Dank an Herrn Prof. Dr. Rüdiger Wanke und Herrn PD Dr. Dr. Andreas Parzefall. Dr. Harald Florstedt und Kerstin Peschel danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die zahlreichen persönlichen Ratschläge im Laufe meines Lebens. In diesem Kontext bedanke ich mich außerdem aus vollem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer tatkräftig unterstützt haben. Lennart danke ich dafür stets für mich da zu sein. Ich bin froh dich an meiner Seite zu haben.