

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jürgen Deckert

**Expressionsanalytische und behaviourale Phänotypisierung der *Nos1***

**Knockdown Maus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt  
von  
Sarah Kittel-Schneider  
aus  
Hamburg

Würzburg, Mai 2010

Referent Prof. Dr. med. A. Reif

Koreferent Prof. Dr. med. C. Sommer (Neurologische Klinik)

Dekan Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2010

Die Promovendin ist Ärztin

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>1.1</b>	<b>Überblick</b> .....	1
<b>1.2</b>	<b>NO-Synthasen</b> .....	2
1.2.1	NOS-I .....	2
1.2.2	NOS-II .....	3
1.2.3	NOS-III.....	4
<b>1.3</b>	<b>Enzymatischer Reaktionsablauf</b> .....	4
<b>1.4</b>	<b>NO-Rezeptoren</b> .....	5
<b>1.5</b>	<b><i>Nos</i> Knockout /-down Mäuse</b> .....	5
1.5.1	<i>Nos1</i> Knockdown Maus .....	5
1.5.2	<i>Nos2</i> Knockout Maus .....	6
1.5.3	<i>Nos3</i> Knockout Maus .....	7
<b>1.6</b>	<b>Physiologische und pathologische Funktionen von NO</b> .....	10
1.6.1	Zentrales Nervensystem .....	10
1.6.1.1	Lernen und Gedächtnis.....	10
1.6.1.2	Neurodegeneration und Neurotoxizität .....	10
1.6.1.3	Schizophrene Psychosen .....	11
1.6.1.4	Affektive Erkrankungen .....	12
1.6.1.5	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom .....	12
1.6.1.6	Weitere Erkrankungen.....	13
1.6.2	Peripheres Nervensystem .....	13
1.6.3	Immunsystem .....	13
1.6.4	Kardiovaskuläres System .....	14
1.6.5	Andere Organsysteme.....	15
<b>1.7</b>	<b>Fragestellung</b> .....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	18
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	18
2.1.1	Gewebe .....	18
2.1.2	Tiere.....	18
2.1.3	Oligodesoxynukleotide.....	19
2.1.4	Reaktionskits .....	20
2.1.5	Chemikalien.....	20

2.1.6	Geräte.....	21
2.1.7	Software.....	21
2.1.8	Sonstiges.....	22
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.2.1	Herstellung von RNase-freien Lösungen und Gefäßen.....	23
2.2.2	RNA-Extraktion aus Gehirngewebe der Maus.....	23
2.2.3	Fällung von Nukleinsäuren.....	24
2.2.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	24
2.2.5	cDNA Erststrangsynthese.....	24
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA.....	25
2.2.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	26
2.2.8	PCR-Methoden.....	26
2.2.8.1	Konventionelle PCR.....	26
2.2.8.2	Quantitative Real Time PCR.....	27
<b>2.3</b>	<b>Verhaltensuntersuchungen.....</b>	<b>32</b>
2.3.1	<i>Elevated Plus Maze</i> .....	32
2.3.2	Das COGITAT-System.....	34
<b>2.4</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>37</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Gen-Expressionsanalyse mittels der quantitativen Real Time PCR.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2</b>	<b>Untersuchung der Ängstlichkeit mittels des <i>Elevated Plus Maze</i>.....</b>	<b>40</b>
<b>3.3</b>	<b>Untersuchung des räumlichen Lernens und der Gedächtnisleistung mittels des COGITAT-Systems.....</b>	<b>42</b>
3.3.1	Ergebnisse der Kurzzeitversuche.....	42
3.3.2	Ergebnisse der Langzeitversuche 1 und 2.....	43
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression der monoaminergen Transmitter bei der <i>Nos1</i> kd Maus.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2</b>	<b>Ängstlichkeit der <i>Nos1</i> kd Maus.....</b>	<b>53</b>
<b>4.3</b>	<b>Räumliches Lernen und Gedächtnis der <i>Nos1</i> kd Maus.....</b>	<b>54</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>59</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom
5-HT	Serotonin, 5-Hydroxytryptamin
5-HTT	Serotonin-Transporter
7-NI	7-Nitroindazol
7-NINA	7-Nitroindazol-Mononatrium-Salz, nitroindazole monosodium salt
cDNA	copy deoxyribonucleic acid, complementary deoxyribonucleic acid
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CT	Threshold Cycle, Schwellenzyklus
DAT	Dopamin-Transporter
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA, DNS	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DRD	Dopamin-Rezeptor D
EPM	Elevated Plus Maze
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EthBr	Ethidiumbromid
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GVI	Gen von Interesse, gene of interest
HHG	Haushaltsgen, housekeeping gene
ko Mäuse	Knockout Mäuse
kd Mäuse	Knockdown Mäuse
L-NAME	N(G)-Nitro-L-Arginin-Methylester
LZV 1	Langzeitversuch 1, Versuch nach 3 Tagen Pause
LZV 2	Langzeitversuch 2, Versuch nach 7 Tagen Pause
mRNA	messenger Ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
MAO	Monoaminoxidase
METH	Methamphetamin
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin

NHE	Naples High-Excitability Rat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid, Stickoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NOS-I	NO-Synthase Typ I, neuronale NO-Synthase
NOS-II	NO-Synthase Typ II, induzierbare NO-Synthase
NOS-III	NO-Synthase Typ III, endotheliale NO-Synthase
<i>NOS1</i>	humanes <i>NOS1</i> Gen
<i>Nos1</i>	murines <i>Nos1</i> Gen
<i>Nos1</i> +/+ Tiere	Wildtyp Tiere
<i>Nos1</i> -/- Tiere	<i>Nos1</i> Knockdown Tiere
PDZ	Post synaptic density protein (PSD95), <i>Drosophila</i> disc large tumor suppressor (DlgA), and Zonula occludens-1 protein (zo-1)
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PSD Proteine	Postsynaptic Density Proteins
qRT PCR	quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion
rme	reference memory error, Fehler im Referenzgedächtnis
RNA, RNS	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SERT	Serotonin-Transporter
SYBR® Green	2-{2-[(3-Dimethylaminopropyl)-propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methylbenzothiazol-3-ium-Kation
sGC	lösliche Guanylylcyclase
SHR	Spontaneously Hypertensive Rat
SNP	single nucleotide polymorphism, Einzelbasenpolymorphismus
SSRI	selektiver Serotonin Reuptake Inhibitor, selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer
TPH	Tryptophan-Hydroxylase
VNTR	variable number tandem repeat
wme	working memory error, Fehler im Arbeitsgedächtnis
wt Mäuse	Wildtyp Mäuse

# 1 Einleitung

## 1.1 Überblick

In den vergangenen fünf Jahrzehnten konnten auf dem Gebiet der Neurowissenschaften rasante Fortschritte erzielt werden (1). Bis in die 1950er Jahre waren nur die zwei verschiedenen Neurotransmitter Acetylcholin und Noradrenalin bekannt. Später konnte dann auch noch die Botenstofffunktion der biogenen Amine, wie Serotonin, Dopamin, Histamin geklärt werden und man fand heraus, dass auch Aminosäuren wie  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA), Glutamat und Glycin Wirkungsweisen von Neurotransmittern besitzen. In den 1970er Jahren wurden schließlich auch Peptide beschrieben, welche als Botenstoffe im Nervensystem fungieren. Die große Gruppe dieser Peptide, welche beispielsweise Substanz P und die Enkephaline einschließt, wurde Neuropeptide genannt. Die neuesten Entdeckungen auf dem Gebiet der Neurotransmitter sind D-Aminosäuren und gasförmige Botenstoffe, wie Kohlenstoffmonoxid (CO) und Stickstoffmonoxid (NO) (2). Schon 1980 beobachteten Furchgott und Zawadzki, dass durch die Stimulation von Gefäßendothel mit Acetylcholin ein Faktor freigesetzt wurde, der die Muskulatur des Gefäßes zum Erschlaffen brachte (3). Diesen Faktor nannten sie Endothelium-derived relaxing factor (EDRF), welcher später von Ignarro et al. als NO identifiziert werden konnte (4). Die außerordentliche Bedeutung ihrer wissenschaftlichen Arbeit spiegelt sich in der Tatsache wider, dass R.F. Furchgott, L.J. Ignarro und F. Murad im Jahre 1998 hierfür der Nobelpreis verliehen wurde. Stickoxid wird vom Körper in zahlreichen Organen produziert und erfüllt ganz unterschiedliche Aufgaben. Unter anderem spielt es eine Rolle in der Immunabwehr, bei der Dilatation von Blutgefäßen und vermutlich auch beim Lernen und dem Gedächtnis (2). Außerdem gibt es Hinweise, dass NO auch bei verschiedenen Krankheitsbildern eine Rolle spielt, so zum Beispiel bei Reperfusionsschäden nach einem Schlaganfall (5). Auch bei verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen scheinen Fehlregulationen im nitrinergen System vorhanden zu sein (6-8). Das bedeutet, dass NO sowohl wichtige physiologische Funktionen im Körper erfüllt, aber auf der anderen Seite auch eine Rolle bei

verschiedenen pathologischen Prozessen hat. Deswegen ist es von großem Interesse, mehr über die Aufgaben von NO im menschlichen Körper herauszufinden.

## 1.2 NO-Synthasen

Produziert wird das NO von drei isoformen Enzymen, der neuronalen NO-Synthase (nNOS, NOS-I) (9), der induzierbaren NOS (iNOS, NOS-II) (10) und der endothelialen NOS (eNOS, NOS-III) (11), welche allesamt zur Familie der Cytochrom-P450-Enzyme gerechnet werden. Die drei Enzyme unterscheiden sich in ihrer Struktur, den benötigten Kofaktoren, der Lokalisation in der Zelle sowie der gewebsspezifischen Verteilung. Im Folgenden werden einige wichtige Unterschiede der drei Isoformen dargestellt.

### 1.2.1 NOS-I

Die neuronale Isoform der NOS wird in ihrer Aktivität durch die freie intrazelluläre Calciumkonzentration und das Calcium bindende Calmodulin (CaM) reguliert. Ungefähr 1% aller Neuronen im menschlichen Gehirn exprimieren NOS-I, aber fast jede Nervenzelle erhält Input von den NOS-haltigen Neuronen (12). Die Aktivität der neuronalen Form der NOS wird aber nicht nur durch die intrazelluläre Calciumkonzentration, sondern auch über Interaktionen mit verschiedenen Proteinen reguliert. Der N-Terminus des Enzyms bindet via PDZ-PDZ Interaktionen an PSD95 und PSD93 (Postsynaptic density proteins) und somit an den NMDA-Rezeptor, so dass bei dessen Aktivierung durch Glutamat der lokale Calcium-Einstrom NOS-I direkt aktivieren kann (13). Die weiteren Schritte zur NO-Produktion werden unter Punkt 1.3 allgemein beschrieben. Proteine, die mit den PSD-Proteinen um die PDZ Domäne der NOS-I konkurrieren, sind strukturelle Regulatoren der NO Produktion. Solche Proteine sind NOS-I AP (NOS-I Adapterprotein; früher CAPON, C-terminal PDZ ligand of NOS-I) und PIN (Protein inhibitor of NOS-I). Zunächst wurde angenommen, dass PIN die NOS-I inhibieren würde, indem es die Ausbildung von Dimeren, welche zur Aktivierung des Enzyms unerlässlich ist, verhindert (14). Dies ließ sich allerdings nicht replizieren (15). Mittlerweile geht man davon aus, dass PIN zur Familie der Dynein

Leichtketten gehört, welche für intrazelluläre Transportvorgänge verantwortlich sind, weshalb PIN mittlerweile den offiziellen Namen Dynein light chain 8 hat (LC8, DLC1). Man konnte zum Beispiel in menschlichen Mastzellen zeigen, dass PIN an NOS-I bindet und diese inhibiert, der genaue molekulare Mechanismus ist aber weiter nicht bekannt (16). Auch scheint PIN in vivo eine Rolle bei der Insulinfreisetzung zu spielen und die Produktion von Sauerstoffradikalen durch NOS-I zu inhibieren (17,18). NOS-I AP interagiert mit der PDZ Domäne von NOS-I und spaltet bei Überexpression PSD95-NOS-I-Komplexe. Auch koppelt NOS-I AP die NOS-I an Dexas1, welches eine kleine GTPase ist, die als second messenger der NOS-I fungiert (19). Mittlerweile gilt *NOS1* AP auch als Kandidatengen für Schizophrenie und bipolar-affektive Psychosen. Mehrere Linkage-Analysen zeigen positive Kopplungsbefunde für die oben genannten psychiatrischen Erkrankungen mit dem *NOS1* AP-Locus auf Chromosom 1 (20,21). Man findet NOS-I außer in Neuronen auch in Herzmuskelzellen, Skelettmuskelzellen und in Zellen der Adventitia von nervenversorgenden Gefäßen (22). Außerdem wurde das Enzym auch in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas, im Bronchialepithel und in Mastzellen detektiert (23).

### 1.2.2 NOS-II

Im Gegensatz zur NOS-I und NOS-III ist die Aktivität der induzierbaren Form der NOS nicht Calcium abhängig, sie bindet Calcium-Calmodulin unabhängig von dem intrazellulären Calcium-Spiegel. Über Interaktionen mit Proteinen weiß man sehr viel weniger als bei den anderen Isoformen. NOS-II produziert NO hauptsächlich um Bakterien und maligne Zellen abzuwehren, jedoch weniger zum Zweck der Signalübermittlung. Stimuli für die Expression der NOS-II sind pro-inflammatorische Mediatoren wie Lipopolysaccharide, Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ , Interleukin-1 und Interferon  $\gamma$ . Vermutlich ist fast jede Zelle in der Lage die NOS-II zu exprimieren, gefunden wurde das Enzym jedoch zuerst in Makrophagen. Es konnte dann auch noch in zahlreichen anderen Gewebearten nachgewiesen werden (23).

### 1.2.3 NOS-III

Im Grundzustand, das heißt nicht aktiviert, bindet die NOS-III an Caveolin-1, welches das strukturgebende Protein von Caveolae ist. Caveolae sind Strukturen, die sich in der Oberflächenmembran von Zellen befinden und an denen viele Signalwege reguliert werden. Wenn dann externe Stimuli wie Bradykinin, Acetylcholin, Thrombin oder VEGF (vascular endothelium growth factor) an ihre jeweiligen Rezeptoren binden und somit den intrazellulären Calciumspiegel in den Endothelzellen anheben, bildet sich Calcium-Calmodulin (CaM). Dieses verdrängt NOS-III aus seiner Bindung mit Caveolin-1 und aktiviert somit das Enzym. HSP90 (heat shock protein 90) bindet NOS-III und erleichtert die CaM abhängige Trennung von Caveolin und vermittelt die Interaktion zwischen NOS-III und der Proteinkinase B/akt (24,25). Außer in Endothelzellen wurde die NOS-III auch in Neuronen gefunden (23), wobei sich dieser Befund jedoch bislang nicht replizieren ließ.

### 1.3 Enzymatischer Reaktionsablauf

NO wird von den NO-Synthasen aus L-Arginin hergestellt, welches zu L-Citrullin umgesetzt wird. Als Kofaktoren dieser Reaktion werden NADPH (Nicotinadenindinukleotidphosphat) als Elektronendonator, FAD (Flavinadenindinukleotid) und FMN (Flavinmononukleotid) als Elektronenshuttle und Häm als Sauerstoff- und Substratbindungsstelle der mischfunktionellen Oxygenase benötigt. Weitere Kofaktoren sind Calcium-Calmodulin und H<sub>4</sub>Bip (Tetrahydrobiopterin) (26,27). Der schematische Ablauf soll hier lediglich an einem Beispiel erläutert werden.

Die Produktion von NO durch die NOS-I wird beispielsweise dadurch in Gang gesetzt, dass Glutamat an einen NMDA-Rezeptor an der Zellmembran bindet (wobei jedoch eine Vielzahl von Signalwegen an NOS gekoppelt sein kann). Hier kommt es zum Öffnen eines Ionenkanals und nachfolgendem Calcium-Einstrom in die Zelle. Calcium-Calmodulin (CaM) bindet sich an NOS, aktiviert das Enzym und es werden zunächst Elektronen von NADPH zu FAD und FMN und dann auf die Hämgruppe des Enzyms

übertragen. Dort geht dann in zwei weiteren Reaktionsschritten die Umsetzung von L-Arginin in L-Citrullin sowie NO vonstatten (28,29). Wie weiter oben bereits erwähnt wurde, bestehen natürlich Unterschiede zwischen den Isoformen in den Einzelheiten der Aktivierung und Inaktivierung sowie den interagierenden Proteinen.

## **1.4 NO-Rezeptoren**

Der wichtigste Rezeptor und damit second messenger von NO ist die lösliche Guanylylcyclase (sGC) (30). NO komplexiert das Eisen der Hämgruppe der sGC und aktiviert somit das Enzym. Die sGC wandelt GTP (Guanosintriphosphat) in cGMP (zyklisches Guanosinmonophosphat) um, welches wiederum in der Lage ist, Aktivitätszustände von Proteinkinasen und die Struktur von Ionenkanälen zu steuern. Auch scheint NO über S-Nitrosylierung Signalwege beeinflussen zu können (31,32). S-Nitrosylierung ist neben der länger bekannten Phosphorylierung ein wichtiger posttranslatonaler Mechanismus, der eine Rolle bei der Regulation vieler verschiedener Proteine spielt (33).

## **1.5 *Nos* Knockout /-down Mäuse**

Um zu erforschen, welche Aufgaben NO und die NOS im Organismus erfüllen, wurden Knockout-Mausmodelle für die drei Isoformen generiert (34-36). Im Folgenden soll kurz auf die Phänotypen der drei verschiedenen Knockout /-down (ko bzw. kd) Mäuse eingegangen werden. Siehe für eine Zusammenfassung auch Tabellen 1.1 und 1.2.

### **1.5.1 *Nos1* Knockdown Maus**

Für die neuronale Isoform gibt es streng genommen keine Knockout Maus, sondern lediglich eine Knockdown (kd) Maus, da bei den Mutanten Exon 1 deletiert wurde und es durch die Expression alternativer Spliceformen zu einer residuellen Expression des

Enzyms mit auf ca. 6-10 % reduzierter Aktivität kommt. Diese kd Tiere haben vergrößerte Mägen mit einem hypertrophen Pylorus sowie ebenfalls hypertrophe Ringmuskulatur (34). Außerdem zeigen sie eine Insulinresistenz (37), linksventrikuläre Hypertrophie (38) und komplexe Verhaltensauffälligkeiten (39). Zu letzteren zählt ein vermehrt aggressives Verhalten der Männchen sowohl in der Gruppe als auch bei einem sog. *resident-intruder test* (40), bei dem ein Tier in einen Käfig gesetzt wird (der „resident“) und nach einer gewissen Habituationszeit ein zweites Tier (der „intruder“) dazu gesetzt wird. Die Aggressivität des „residents“ ist normalerweise höher, wenn er bei seiner Familie lebt und sich diese auch im Käfig befinden. Auch fallen die Männchen der *Nos1* kd Maus durch exzessive sexuelle Aktivität auf. Die Weibchen dagegen zeigen verminderte mütterliche Aggression im Vergleich zu Wildtypen. Ebenso sind die *Nos1* kd Mäuse weniger ängstlich als die Wildtypen (40). Zu den neurologischen Auffälligkeiten zählt eine bei Nacht geringere Koordinationsfähigkeit als bei den Wildtypen, bei Tag zeigen sich hingegen keine Unterschiede (41). Auf Rezeptorebene fand man hypofunktionale 5-HT<sub>1A</sub>- und 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptoren sowie einen erniedrigten Serotonin-Umsatz im Frontalhirn mit konsekutiv erhöhter Serotonin-Konzentration (42). Auch gibt es Hinweise auf eine Beteiligung des nitrinergen Systems bei den neurobehaviouralen Effekten von Alkoholkonsum. So konnte gezeigt werden, dass die kd Mäuse durch Alkohol weniger sediert waren und sich schneller vom Alkoholgenuss erholten als die Wildtypen (43). Darüber hinaus scheint das räumliche Lernen bei den *Nos1* kd Tieren vermindert zu sein. Hierauf wird bei Punkt 1.6.1.1 nochmals ausführlicher eingegangen.

### 1.5.2 *Nos2* Knockout Maus

Diese Tiere zeigen in Abwesenheit von pathogenen Faktoren und assoziierten inflammatorischen Stimuli außer einer beeinträchtigten NO Produktion in Makrophagen keine Auffälligkeiten (22).

### 1.5.3 *Nos3* Knockout Maus

Diese Tiere leiden unter Bluthochdruck, wodurch eine Rolle von NOS-III in der Regulation des Blutdruckes wahrscheinlich ist (35). Außerdem zeigten mehrere Studien, dass diese Mäuse unter anderem eine verminderte Herzfrequenz im Wachzustand, eine beeinträchtigte Angiogenese, Insulinresistenz und altersabhängige linksventrikuläre Hypertrophie haben. Viele der Tiere versterben bereits kurz nach der Geburt, meist wegen kardiovaskulärer Fehlbildungen (44). Auch im Verhalten zeigen sich die *Nos3* ko Mäuse auffällig. So zeigen sie eine verminderte Aggressivität (45) und es wurde bei ihnen eine erhöhte Angstbereitschaft und ein besseres Lernvermögen im *Morris Water Maze* festgestellt (46). Im Gehirn der Mäuse fand man einen gesteigerten Dopamin-Umsatz im Striatum und sowohl dort als auch im frontalen Kortex einen erhöhten Serotonin-Umsatz (47).

<b>Untersuchung</b>	<b>Nos1 Knockdown Tiere</b>	<b>Nos3 Knockout Tiere</b>
<b>Aktivität und Neugier</b>		
Open Field	Mehr Aktivität während des aktiven Zyklus, mehr verbrachte Zeit im Zentrum des Open Field (48), mehr Eintritte ins Zentrum (46), kein Unterschied (49), mehr Zeit im Zentrum (50), kein Unterschied (51), kein Unterschied (52)	Reduzierte Explorationen ohne Habituation, mehr Zeit im Zentrum (53), geringere Aktivität, mehr Zeit in den Ecken (47), kein Unterschied (54)
Novel Cage (Risikoverhalten)	Kein Unterschied (52)	Kein Unterschied (54)
Novelty Seeking	Kein Unterschied (52)	Nicht bekannt
<b>Emotionalität</b>		
Light-Dark-Box (Ängstlichkeit)	Kein Unterschied (52)	Kein Unterschied (54)
Porsolt Forced Swim Test (Depression)	Reduzierte Immobilität (51), kein Unterschied (52)	Kein Unterschied (54)
Learned Helplessness (Depression)	Kein Unterschied (52)	Besseres und schnelleres Lernen (54)
Elevated Plus Maze (Ängstlichkeit)	Kein Unterschied (48), mehr Zeit im geschlossenen Arm (46), mehr Eintritte in den geschlossenen Arm (50) <i>In der vorliegenden Arbeit: mehr Eintritte bzw. mehr Zeit auf den offenen Armen</i>	Weniger Bewegungen auf dem offenen Arm, sonst normal (53), kein Unterschied (45), weniger Zeit auf dem offenen und mehr Zeit auf dem geschlossenen Arm (47)
<b>Lernen und räumliches Gedächtnis</b>		
COGITAT-System	<i>In der vorliegenden Arbeit: Defizite im Arbeitsgedächtnis</i>	Nicht bekannt
8-Arm Radial Maze	Nicht bekannt	Kein Unterschied (53)
Morris Water Maze	Schlechtere Leistung (46)	Bessere Leistung (47)
Multiple T-Maze	Bessere Leistung (46)	Nicht bekannt
<b>Aggression &amp; Maternalität</b>		
Resident-Intruder Aggression und neutrale Aggression	Bei männlichen Tieren gesteigert (39), Testosteron-abhängig (55), nicht bei BL/6 back crossed Mäusen (56), gesteigert (57)	Keine Aggression bei männlichen Tieren (45)
Maternale Aggression	Abwesend (58)	Kein Unterschied (59)
Maternales Verhalten	Ansonsten kein Unterschied (59,60)	Kein Unterschied (59)

**Tab.1.1** Zusammenfassung des behaviouralen Phänotyps der *Nos1* kd und der *Nos3* ko Tiere im Vergleich zu Wildtyp Mäusen.

<b>Untersuchung</b>	<b><i>Nos1</i> Knockdown Tiere</b>	<b><i>Nos3</i> Knockout Tiere</b>
<b>Stress</b>		
Baseline Corticosterone	Höhere Spiegel (48)	Nicht bekannt
Stress-induzierte Erhöhung	Gedämpfte Corticosteron-Response (48)	Nicht bekannt
<b>Effekte von Substanzen</b>		
Alkohol	Gesteigerter Konsum hochprozentigen Alkohols, reduzierte Sensitivität, keine Toleranzentwicklung (43)	Nicht bekannt
Phencyclidin	Verminderte Wirkung (61)	Nicht bekannt
Morphin	Kein Unterschied (62)	Nicht bekannt
Kokain	Keine Kokain-induzierte lokomotorische Sensitivierung (63), resistent gegenüber Kokain-konditionierter Platz-Präferenz (64)	Nicht bekannt
Methamphetamin	Reduktion von METH-induzierter dopaminerger Neurotoxizität und lokomotorischer Sensitivierung (65)	Nicht bekannt
<b>Verschiedene</b>		
Sensorimotorisches Screening / Observation	Gesteigerte Fluchtreaktion, Lokomotion, Elevation und Pflege, sowie reduzierte Vokalisation → Angst-analoge Verhaltensweisen (46)	Gesteigerte Kraft in der vorderen Extremität, sonst normal (45)
Pole / Plank Test (Gleichgewicht / Koordination)	Nachts gestört (41), kein Unterschied (39)	Kein Unterschied (45,53)
Rotarod (Koordination)	Kein Unterschied (49,50)	Nicht bekannt
Prepuls Startle Inhibition	Gestört (66)	Nicht bekannt
Schlaf	Gestörte REM-Regulation (67)	Nicht bekannt

**Tab.1.2** Fortsetzung des behaviouralen Phänotyps der *Nos1* Knockdown und der *Nos3* Knockout Tiere im Vergleich zu Wildtyp Mäusen.

## 1.6 Physiologische und pathologische Funktionen von NO

Wie aus den obigen Beschreibungen schon ersichtlich, erfüllt NO eine ganze Reihe von physiologischen, aber auch pathophysiologischen Funktionen. Im Folgenden sollen anhand von verschiedenen Organsystemen kurz einige der Aufgaben von NO erläutert werden.

### 1.6.1 Zentrales Nervensystem

#### 1.6.1.1 Lernen und Gedächtnis

Ratten zeigten nach der Gabe des NOS-I-Inhibitors 7-Nitroindazol vermindertes räumliches Lernen (68) bzw. ein beeinträchtigt räumliches Gedächtnis im *Morris Water Maze*. In einer Studie mit *Nos1* kd Mäusen zeigten diese ebenfalls schlechtere Ergebnisse im *Morris Water Maze* als die Wildtypen. Allerdings waren die Ergebnisse im *Multiple T Maze* gleich gut, so dass man hier auch überlegen muss, ob die NOS-I Inhibition die kognitiven Fähigkeiten nur unter vermehrtem Stress beeinträchtigt (46,68). Auch bei anderen Tieren gibt es Hinweise für eine Beteiligung der Signalübertragung durch NO bei Lernprozessen (69,70). Bei der so genannten Langzeitpotenzierung, welche als ein wichtiger Mechanismus bei Lern- und Gedächtnisprozessen gilt, scheint NO ebenfalls beteiligt zu sein (71).

#### 1.6.1.2 Neurodegeneration und Neurotoxizität

Des weiteren ist NO wahrscheinlich auch bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer pathophysiologisch beteiligt (72-75). In einer neueren Studie konnten bei Ratten durch Acetylcholin-Depletion erzeugte Gedächtnisdefizite und Defizite im räumlichen Lernen, welche analog zu den Gedächtnisdefiziten bei der Alzheimer Demenz beim Menschen waren, durch Verabreichung des Nitrates GT1061 verbessert werden. Diese Substanz aktiviert den

*second messenger* des NO, die lösliche Guanylylcyclase, wohl bevorzugt im Hippocampus (76). Außerdem scheint NO eine wichtige Rolle bei der glutamatvermittelten und auch der amphetamininduzierten dopaminergen Neurotoxizität zu haben (65,77). Besonders erwähnenswert in diesem Kontext ist hier der Reperfusionsschaden nach einem ischämischen Insult, der unter anderem durch überhöhte Glutamatspiegel zustande kommt (78). Diese glutamatvermittelte Neurotoxizität sowie der resultierende Schaden nach einer Ischämie sind bei *Nos1* kd Mäusen und bei Ratten, die mit NO-Inhibitoren behandelt wurden, geringer (5,79).

### 1.6.1.3 Schizophrene Psychosen

Viele Studien beschäftigen sich mit der Rolle des nitrinergen Systems bei psychiatrischen Erkrankungen, besonders der Schizophrenie und affektiven Erkrankungen wie der bipolaren Störung und der Depression. Zum einen wurden hierzu ein pharmakologisches Tiermodell für schizophrene Psychosen untersucht: nach Gabe von Glutamatantagonisten, zum Beispiel Ketamin oder Phencyclidin (PCP), kommt es sowohl im Verhalten als auch im Gehirnstoffwechsel zu ähnlichen Veränderungen wie sie auch bei schizophrenen Patienten beobachtet wurden. Unter anderem zeigte sich hier das nitrinerge System verändert (80,81). Auch hatten im Tiermodell mehrere etablierte Risikofaktoren für schizophrene Psychosen Auswirkungen auf NOS-I. Intrauterine Infektionen mit Influenza-Viren hatten bei Mäusen eine signifikant reduzierte NOS-I Expression zur Folge (82) und durch hippocampaler Läsionierung bei Ratten resultierte eine verminderte Anzahl NOS-positiver Neurone im präfrontalen und entorhinalen Cortex (83). In diesen Gehirnarealen wurden bei schizophrenen Patienten prominente morphologische Auffälligkeiten gefunden (84). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass diese durch Phencyclidin ausgelösten Modell-Psychosen durch Gabe von NO-Donoren verhindert werden konnten (85). Außerdem fand man im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen veränderte NO- bzw. NO-Metaboliten-Spiegel in verschiedenen Körperflüssigkeiten von schizophrenen Patienten (86,87). Allerdings sollte angemerkt werden, dass gerade die Messung von NO-Stoffwechselprodukten in den Körperflüssigkeiten kein besonders guter Biomarker für die Schizophrenie im

Speziellen ist, da veränderte Werte in diesem Bereich auch bei vielen anderen psychiatrischen und auch kardiovaskulären Erkrankungen vorkommen (88).

Auf der genetischen Ebene zeigten Linkage-Analysen zum Teil positive Kopplungsbefunde mit dem Locus des *NOS1* Gens für schizophrene Psychosen, wobei andere Gruppen diese Ergebnisse aber nicht unterstützen können (6,88).

#### 1.6.1.4 Affektive Erkrankungen

Auch zur Rolle des NO bei affektiven Erkrankungen kommen verschiedene Untersuchungen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Zum einen wurden genetische Untersuchungen durchgeführt, die keine Assoziation von Polymorphismen des *NOS1* Gens mit Depression feststellen konnten (89). Andererseits konnte man im Blut von depressiven Patienten ebenfalls erniedrigte NO-Spiegel messen (90) und bei Untersuchungen des Gehirns fand man eine reduzierte Aktivität der NOS-I in mehreren Bereichen (91). Wenn bei Nagetieren NOS-I mittels Gabe von zum Beispiel 7-Nitroindazol oder L-NAME inhibiert wurde, konnten hierdurch antidepressive Effekte beispielsweise im *Forced Swim Test* erzeugt werden (92,93). Des Weiteren zeigte Methylenblau, ein Inhibitor der NOS und der sGC, therapeutische Effekte bei der Behandlung von schweren depressiven Episoden beim Menschen (94). Auch konnte gezeigt werden, dass NOS-Inhibitoren die Wirkung von Antidepressiva verstärken (95).

#### 1.6.1.5 Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom

Auch beim ADHS (Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom) zeigt sich das nitrinerge System verändert. Hierfür sprechen auch wieder veränderte Plasmaspiegel (96,97) und eine kürzlich gezeigte Assoziation von impulsivem, hyperaktivem und aggressivem Verhalten bei adultem ADHS und Cluster-B-Persönlichkeitsstörungen mit einem funktionellen Promotor-Polymorphismus im *NOS1*-Gen (98). Auch gibt es Tierversuche mit verschiedenen hyperaktiven Tiermodellen, wie der Spontaneously

Hypertensive Rat (SHR) oder der Naples High-Excitability Rat (NHE). Diese Tiere zeigten in mehreren Studien verbesserte nicht-selektive Aufmerksamkeit und verminderte Hyperaktivität, wenn sie mit NOS-Inhibitoren behandelt worden waren (99,100).

#### 1.6.1.6 Weitere Erkrankungen

Ebenso gibt es Hinweise auf eine Rolle des NO bei der Entstehung der posttraumatischen Belastungsstörung und beim Pathomechanismus des Tinnitus (101,102).

#### 1.6.2 Peripheres Nervensystem

Im peripheren Nervensystem fungiert NO als Botenstoff, der die penile Erektion vermittelt. Hierbei spielt vor allem die NOS-III eine wichtige Rolle. Eine verminderte Verfügbarkeit von NO könnte bei der Pathogenese der vaskulären erektilen Dysfunktion ein wichtiger Faktor sein (103). Auch bei der Regulation des Muskeltonus des Magen-Darm-Traktes durch so genannte nichtadrenerge, nichtcholinerge Transmission (NANC) scheint NO eine große Bedeutung zu haben. So kann man zum Beispiel analog zum oben beschriebenen Tiermodell (1.5.1) bei Patienten mit infantiler hypertropher Pylorusstenose keine NOS-I Proteine im Pylorus finden (104). Bei der Regulation der Harnblasenfunktion spielt das nitrinerge System ebenfalls eine große Rolle. NO-haltige Neurone des unteren Harnwegstraktes stellen vermutlich ein inhibitorisches System dar, welches in die Relaxation des Ausflusstraktes involviert ist (105-107).

#### 1.6.3 Immunsystem

Zum einen spielt NO eine Rolle bei der unspezifischen Abwehr von intrazellulären Bakterien und Parasiten durch Makrophagen und anderen Immunzellen (108). Aber dies

sind nicht die einzigen Effekte, die NO und andere reaktive Sauerstoffspezies bei der Inflammation und der Regulation der Immunantwort haben. Unter anderem kommt es hierbei auf die Menge des produzierten NO an. In größeren Mengen wirkt es zytotoxisch und proinflammatorisch, in kleineren Mengen hingegen inhibiert es die Synthese von Zytokinen und Chemokinen (109). Auch bei Autoimmunprozessen wie zum Beispiel bei Morbus Behçet und immunologisch bedingten Vaskulitiden spielen Fehlregulationen im nitrinergen System eine Rolle (110,111). Die NOS-II, auch „high output“ NOS genannt, welche die oben erwähnten großen Mengen an NO produzieren kann, wird auch in Tumorzellen zahlreicher Spezies exprimiert. Ihre Rolle ist allerdings weiterhin unklar, da es sowohl Studien gibt, die das Enzym als Tumorsuppressor beschreiben als auch Studien, die zeigen, dass NOS-II das Tumorwachstum begünstigt (112).

#### 1.6.4 Kardiovaskuläres System

Am bekanntesten ist die Rolle des von der NOS-III produzierten NO als Vasodilatator der peripheren Blutgefäße, aber es gibt auch Hinweise, dass NO, welches von der NOS-I produziert wird, eine Rolle in der Regulation der Herzfunktion hat (113). Im Gefäßsystem sorgt NO neben der Vasodilatation auch für Thrombozytenaggregationshemmung und scheint vor Arteriosklerose zu schützen (114). Dieser Schutz geschieht durch Inhibition von proarteriogenen Prozessen wie der Oxidation von LDL und der Proliferation von glatter Gefäßmuskulatur (115). Auch der thrombozytenregulierende Effekt sowohl des NO aus dem Gefäßendothel als auch aus den Thrombozyten selbst ist schon länger bekannt (116,117) und spielt eine wichtige Rolle beim protektiven Effekt des NO in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Die Produktion von NO im kardiovaskulären System hängt vermutlich unmittelbar mit der Stimulation von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren zusammen (118,119). Außerdem findet man bei vielen Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems Alterationen im nitrinergen System. So konnten zum Beispiel bei der arteriellen Hypertension, der koronaren Herzkrankheit (KHK), der Herzinsuffizienz und dem Myokardinfarkt Veränderungen festgestellt werden (120-123). Auch bei der Suche nach den zugrunde liegenden Mechanismen,

warum das Vorliegen einer Depression einen unabhängiger Risikofaktor für die KHK darstellt, könnte sich das nitrinerge System als bedeutend herausstellen (124). Denn sowohl bei der Depression als auch bei der KHK gibt es Veränderungen im nitrinergen System, welches somit das Verbindungsglied der beiden Erkrankungen sein könnte. Weitere Hinweise dafür sind eine erniedrigte Aktivität der NOS-III in den Thrombozyten und erniedrigte NO Plasmaspiegel bei Patienten mit einer schwerem depressiven Episode (125).

#### 1.6.5 Andere Organsysteme

Auch in der Niere werden sowohl die NOS-I als auch die NOS-III in jeweils verschiedenen Zelltypen exprimiert und das NO ist dort unter anderem an der Regulation des tubulointerstitiellen Feedbacks und der Produktion von Renin beteiligt (126). Im Atemwegssystem besitzt NO aus unterschiedlichen Quellen ebenfalls wichtige Funktionen. Es relaxiert die bronchiale Muskulatur, verbessert die Motilität der Zilien, hat antimikrobielle Effekte, und erhöht die Expression des CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulation) Proteins in Atemwegsepithelzellen. Bei Patienten mit Mukoviszidose finden sich erniedrigte Konzentrationen von NO (127). NO scheint auch ein *second messenger* für Insulin zu sein, es hatte in Untersuchungen zu diesem Thema einen Insulin-ähnlichen Effekt in Bezug auf Stimulation des Glucosetransports und Glucoseoxidation in Muskelzellen (128). Auch sind *Nos3* ko Mäuse, bei denen experimentell ein Diabetes mellitus induziert wurde, anfälliger dafür, eine diabetische Nephropathie zu bekommen. Dies könnte durch erhöhte VEGF (Vascular Endothelium Growth Factor) Spiegel und dadurch ausgelöste exzessive endotheliale Zellproliferation verursacht werden (129). Bei Menschen wurde in einer Kopplungsanalyse ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen im *NOS3*-Gen und dem erhöhten Risiko einer Nephropathie bei diabetischen Patienten gefunden (130).

## 1.7 Fragestellung

NO ist als Neurotransmitter bei einer Vielzahl von Prozessen im menschlichen und tierischen Organismus beteiligt. Trotz intensiver Forschung gibt es aber noch viele offene Fragen hinsichtlich der Rolle von NO insbesondere im zentralen Nervensystem. Mehrere Studien legen allerdings eine Rolle des nitrinergen Systems bei Lernen und Gedächtnis, Aufmerksamkeit und Aktivität sowie eine pathophysiologische Rolle bei schizophrenen, neurodegenerativen sowie affektiven Erkrankungen nahe. In der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zur weiteren Phänotypisierung der *Nos1* Knockdown Maus geleistet werden, denn auch hier ergeben vorherige Arbeiten kein einheitliches Bild.

Mittels Knockout Mäusen kann die Interaktion verschiedener Gene bzw. der Einfluss eines ausgeschalteten Gens auf das Transkriptom mittels Expressionsanalyse untersucht werden. Erstes Ziel dieser Arbeit ist es, die Interaktion zwischen dem nitrinergen und den monoaminergen Systemen auf der Ebene der Genexpression zu untersuchen, insbesondere da die genaueren Mechanismen der Interaktion zwischen NO und Serotonin noch immer unklar sind. Auch der genaue Mechanismus der Zusammenhänge zwischen nitrinergem und dopaminergem System ist nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wird daher die Expression der Monoamintransporter bei den *Nos1* Knockdown Mäusen untersucht. Zweites Ziel ist es, mittels Verhaltensversuchen den Phänotyp der *Nos1* Knockdown Maus genauer zu charakterisieren, nicht zuletzt da hier die Datenlage, wie oben erwähnt (siehe Tabellen 1.1 und 1.2), sehr uneinheitlich ist. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Frage, ob die *Nos1* Knockdown Maus ein passendes Tiermodell für das Aufmerksamkeitsdefizit/Hyperaktivitätssyndrom sein könnte. Die Ursachen des ADHS scheinen nämlich unter anderem in Störungen der Signalübertragung monoaminergere Transmittersystemen zu liegen, die, wie oben beschrieben, wiederum mit dem nitrinergen System interagieren.

Tiermodelle sind wertvolle Hilfsmittel, um Theorien hinsichtlich der Krankheitsursachen zu testen, pathophysiologische Mechanismen aufzudecken und neue therapeutische Strategien zu entwickeln. Allerdings müssen dazu behaviourale

Merkmale bei dem untersuchten Tier vorhanden sein, die als Analoga zur humanen Erkrankung angesehen werden können. Anders ausgedrückt, Tiermodelle psychiatrischer Erkrankungen müssen Konstrukt-, Augenschein- und prädiktive Validität aufweisen (131). Dies alles konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht umfassend untersucht werden, zumindest aber sollte getestet werden, ob *Nos1* Knockdown Mäuse die für das menschliche ADHS entscheidenden Merkmale wie verminderte Aufmerksamkeit, motorische Hyperaktivität, Lerndefizite und Desorganisiertheit im Verhalten zeigen. Hierzu muss angemerkt werden, dass wie bei allen psychiatrischen Erkrankungen auch bei ADHS eine Vielzahl von Genen und nicht nur die Dysregulation eines einzelnen Transmittersystemes beteiligt sind. Bei den meisten psychiatrischen Erkrankungen wird mittlerweile von der Existenz von Endophänotypen ausgegangen, denen vermutlich jeweils unterschiedliche Defekte und Dysregulationen im Hirnstoffwechsel zugrunde liegen und deren molekulare Basis möglicherweise homogener ist (132,133).

Daher soll in der vorliegenden Arbeit herausgefunden werden, ob die *Nos1* kd Maus für zumindest einen Endophänotypen des ADHS als Tiermodell dienen könnte und welche Störungen der Signalübertragung diesen bestimmten Endophänotypen zugrunde liegen könnten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Gewebe

Für die Gen-Expressionsanalysen wurden Gehirne von *Nos1* Knockdown (*Nos1* kd) Mäusen (*Mus musculus*) verwendet. Generiert wurden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Nos1* kd von der Arbeitsgruppe um Huang aus einem C57/BL6 Stamm (34). In den *Nos1* kd Tieren wurde das Exon 1 gezielt ausgeschaltet. Die PDZ Bindungsdomäne geht so verloren, wodurch allerdings eine verbleibende Expression von alternativen *Nos1*-Splicevarianten von 6 - 10% resultiert. Deswegen sind diese Tiere Knockdown Mäuse, was vermutlich eher die Situation bei Fehlfunktionen im menschlichen nitrinergen System widerspiegelt, da ein völliges Fehlen der NOS beim Menschen bisher nicht beschrieben wurde. Die *Nos1* kd Mäuse wurden vom *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, USA) bezogen. Als Kontrolle dienten Geschwistertiere, bei denen das Gen nicht deletiert war (Wildtyp, wt). Die Versuchstiere wurden in der Tierhaltungseinrichtung der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg gehalten. Die Haltungsbedingungen waren folgende: Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 Stunden, Wasser und Futter *ad libitum*. Die Tiere wurden für die Genexpressions-Analysen durch zervikale Dislokation getötet, danach sofort dekapitiert und die Gehirne entnommen. Es folgte die Präparation des Hippocampus, Cerebellums, Striatums, Cortex und des Hirnstamms mithilfe eines Binokulares und einer Kühlplatte. Die präparierten Regionen wurden jeweils in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mithilfe von Trockeneis eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Gehirnentnahme und Präparation der verschiedenen Gehirnregionen wurde von Frau Dr. Angelika Schmitt und Frau Dipl.-Biol. Sabrina Klein durchgeführt.

#### 2.1.2 Tiere

Die Tiere für die Verhaltensversuche entstammten der bei 2.1.1 beschriebenen Zucht. Es wurden Tiere im Alter von 1,5 bis 3 Monaten verwendet. Darunter befanden sich 16 Männchen (9 Wildtypen und 8 *Nos1* Knockdowns) und 15 Weibchen (9 Wildtypen und 6 *Nos1* Knockdowns). Sie wurden in einem inversen 12:12h Tag:Nacht Rhythmus

gehalten. Die Mäusehaltung erfolgte bei 21-24 °C und die Tiere wurden nach Geschlechtern getrennt in unterschiedlich großen Gruppen in Standardkäfigen gehalten. Die Mäuse mussten vor dem COGITAT-Test auf intermittierenden Nahrungsentzug gesetzt werden. Es erfolgte eine Fütterung am Tag. In der Zwischenzeit hatten die Tiere Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Das Gewicht der Mäuse wurde während des gesamten Versuchs hindurch protokolliert. Der Gewichtsverlust der Tiere betrug maximal 10 %. Vor dem *Elevated Plus Maze* Versuch hatten die Tiere Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung.

### 2.1.3 Oligodesoxynukleotide

Alle Oligodesoxynukleotide wurden bezogen von MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland).

<b>Name</b>	<b>Sequenz 5'→3'</b>	<b>Tm°C</b>
DAT-sense	CTT CTC CTC TGG CTT CGT TGT	54
DAT-antisense	CAG GGT AGA TGA TGA AGA TCA ACC	54
5-HTT-sense	GAC AGC CAC CTT CCC TTA CA	61
5-HTT-antisense	CTA GCA AAC GCC AGG AGA AC	61
m18S-F	GAA ACT GCG AAT GGC TCA TTA AA	60
m18S-R	CCA CAG TTA TCC AAG TAG GAG AGG A	60
mGAPDH-F	AAC GAC CCC TCC ATT GAC	60
mGAPDH-R	TCC ACG ACA TAC TCA GCA C	60

#### 2.1.4 Reaktionskits

<b>Reaktionskit</b>	<b>Hersteller</b>
RNeasy Midi Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Mini Elute <sup>TM</sup> Gel Extraction Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
peqGOLD RNAPure <sup>TM</sup>	peqLab, Erlangen, Deutschland
iScript <sup>TM</sup> cDNA Synthesis Kit	BioRad Laboratories, Hercules, USA
iQ <sup>TM</sup> SYBR® Green Supermix	BioRad Laboratories, Hercules, USA

#### 2.1.5 Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chloroform	Roche, Basel, Schweiz
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	J.T. Baker, Phillipsburg, USA
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
LTK-008	Biodelta GmbH, Löhne, Deutschland
Merck-Wasser	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
TAE-Laufpuffer (1mM EDTA, 40mM TrisAcetat, pH 8,0)	Eigenherstellung

### 2.1.6 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Autoclave 3850 ELV	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
Biofuge Fresco (Tischzentrifuge)	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
iCycler iQ™ Real Time Detection System	BioRad Laboratories, Hercules, USA
PCR Gradienten Thermocycler UNO II	Biometra GmbH i.L., Göttingen, Deutschland
Rotanta 96 RS (große Zentrifuge)	HettichLab, Tuttlingen, Deutschland
TDX Centrifuge (Tischzentrifuge)	Abbott Diagnostics Division, Illinois, USA
Mikro Rapid K (Tischzentrifuge)	HettichLab, Tuttlingen, Deutschland
Vortex Microspin FV 2400	Lab4you, Berlin, Deutschland
Minizentrifuge	neoLab, Heidelberg, Deutschland
COGITAT-System	Cognitron GmbH, Göttingen, Deutschland
Elevated Plus Maze	TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland

### 2.1.7 Software

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
GeNorm_3.4	<a href="http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm">http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm</a>
iCycler iQ™ Optical System Software 3.1	BioRad Laboratories, Hercules, USA
Microsoft Word 2002	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Excel 2002	Microsoft, Redmond, USA
SigmaPlot for Windows Version 11.0	Systat Software Inc., Chicago, USA
Reference Manager Professionel Edition Version 10	ISI Research Software, Thomson Reuters, New York, USA
VideoMot2	TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland
RatMemory V2.4	Cognitron, GmbH, Göttingen, Deutschland

### 2.1.8 Sonstiges

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pipettenspitzen für Real Time PCR	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen für Sonstiges	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, Deutschland
UVetten (Photometerküvetten)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen für RT PCR	StarLab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Futter-Pellets (20 mg) im COGITAT System	Bioserv Product F05550, Frenchtown New Jersey, USA

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Herstellung von RNase-freien Lösungen und Gefäßen

Für Versuche mit RNA wurden Wasser und Reaktionsgefäße mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt. Dazu wurde eine 0,05 %ige DEPC-H<sub>2</sub>O-Lösung hergestellt und 2 h bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt. Diese Lösung wurde danach 20 min bei 2 bar und 120 °C autoklaviert, dabei zerfällt DEPC in CO<sub>2</sub> und Ethanol. Die Reaktionsgefäße wurden für 2 h bei 37 °C in DEPC-H<sub>2</sub>O inkubiert und nach Abschütten des Wassers 20 min bei 2 bar und 120 °C autoklaviert. Glasgegenstände wurden für 4 h bei 200 °C gebacken, um eventuell vorhandene RNasen abzutöten.

### 2.2.2 RNA-Extraktion aus Gehirngewebe der Maus

Der erste Schritt der RNA-Extraktion wurde mittels peqGOLD RNAPure™ durchgeführt. Dabei wurde das Gewebe, aus dem die RNA zu isolieren war, mit je 2 ml peqGOLD RNAPure™ homogenisiert. Danach wurden die Proben für 5 min auf Eis belassen, damit die Nukleotidkomplexe dissoziieren konnten. Nach Zugabe von 0,4 ml Chloroform wurden die Proben kräftig geschüttelt und dann für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min mit 4500 rpm zentrifugiert. Dies führte zu einer Trennung in drei Phasen: eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischen liegende Interphase. Die RNA befand sich in der wässrigen Phase und wurde in ein frisches Röhrchen überführt. Weitere Arbeitsschritte erfolgten mit dem RNeasy Midi Kit™ von Qiagen. Zu der Probe wurde 1 Probenvolumen, hier also 2 ml, 70% Ethanol gegeben und geschüttelt. Danach wurde die Probe auf eine RNeasy Midi™ Säule, die sich in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen befand, gegeben und 5 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Hier schloss sich ein optionaler DNase Schritt mit dem RNase-Free DNase Set™ von Qiagen an, bei dem möglicherweise vorhandene Verunreinigungen mit DNA entfernt werden sollten. Dazu wurde zunächst 2 ml RW1 Puffer auf die Säulen gegeben, und 5 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Danach wurden 20 µl DNase Stock Solution mit 140 µl RDD Puffer vermischt. Dieser so genannte Inkubationsmix wurde auf die Probe gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgten erneute

Waschschritte mit 2,0 ml RW1 Puffer, Zentrifugation, 2,5 ml RPE Puffer und abermaliger Zentrifugation. Zum Eluieren der RNA wurden 15 ml RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und für 3 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Die somit vorliegende RNA wurde nach Fällung (2.2.3) in 25 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Zur Überprüfung der Qualität und Quantität führte man abschließend noch eine Konzentrationsbestimmung (2.2.4) und eine Agarosegelelektrophorese (2.2.6) durch.

### 2.2.3 Fällung von Nukleinsäuren

Die Fällung der wie in 2.2.2 beschriebenen isolierten RNA erfolgte durch Zugabe von 0,1 Vol. 3M Natriumacetatlösung und 2,5 Vol. 100 %igen Ethanols und folgender Inkubation bei -20 °C üN. Das Gemisch wurde dann bei 1200 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert, mit 70 %igem Ethanol in DEPC-Wasser gelöst versetzt und wiederum bei oben genannten Bedingungen für 10 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Das dabei entstandene Pellet wurde im Abzug getrocknet und dann in DEPC-Wasser gelöst. Das DEPC verändert einen Histidinrest im aktiven Zentrum der RNAsen und inaktiviert diese somit.

### 2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration sowohl der DNA als auch der RNA wurde das Photometer von Eppendorf verwendet. Die Nukleinsäuren wurden verdünnt (jeweils 1 µl Nukleinsäure und 79 µl Merck-Wasser) und die optische Dichte bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  und  $\lambda = 280 \text{ nm}$  gemessen.

### 2.2.5 cDNA Erststrangsynthese

Bei der Herstellung einer cDNA (c steht für copy bzw. complementary) aus RNA handelt es sich um die Reaktion der reversen Transkription (134). Hierbei wird mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus der Vorlage eines mRNA-Stranges ein cDNA-Strang synthetisiert. Die Herstellung der cDNA wurde mittels iScript™cDNA Synthesis Kit von BioRad getätigt. In diesem Kit sind Oligo-dT-Primer enthalten, die sich an den

3'-Poly-A-Schwanz der mRNA anlagern und so der Reversen Transkriptase die Synthese der cDNA ermöglichen. Diese dienen auch als Startpunkte für die Reverse Transkriptase und so ist gesichert, dass die gesamte mRNA transkribiert wird. Der cDNA Strang wird dann aus den vier verschiedenen Desoxyribonukleosidtriphosphaten dATP, dTTP, dCTP und dGTP aufgebaut, die ebenfalls im Reaktionsmix enthalten sind. Das Enzym im verwendeten Kit ist eine modifizierte Version aus dem Moloney Mäuse Leukämie Virus (MMLV) und kann nur RNA transkribieren. Zur cDNA Synthese wurden 500 ng RNA eingesetzt, welche mit 4 µl iScript Reaction Mix, 1 µl iScript Reverse Transkriptase, 5 µl Nuklease-freiem Wasser versetzt wurden. Die Reaktion erfolgte für 5 min bei 25 °C, 30 min bei 42 °C und abschließend nochmals 5 min bei 85 °C. Dann wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA

Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese ist die Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe im elektrischen Feld (135). Zur Herstellung eines Agarosegels (2-3 % bei 5-60 kb DNA Fragmenten) wird Agarosepulver durch Kochen in Trisacetatpuffer (TAE-Puffer) gelöst. Nach kurzem Abkühlen wird Ethidiumbromid (EthBr) hinzu gegeben (3 µl EthBr zu 100 ml-Agarose, 2 µl EthBr zu 50 ml-Agarose) und die gelartige Masse in eine dafür vorgesehene Form gegossen. Nach vollständiger Polymerisierung der Agarose wird das fertige Gel in eine Kammer gelegt, komplett mit TAE-Puffer bedeckt und die Proben in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert. Für ein besseres Absinken der Proben in die Geltaschen und zur besseren optischen Verfolgung des Fortschrittes der Nukleinsäureauftrennung wurden die Proben zuvor mit Bromophenol Blau versetzt. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes wandern größere Moleküle langsamer durch die Poren des Agarosegels von der Kathode auf die Anode zu als kleinere Moleküle. Das Ethidiumbromid interkaliert mit dsDNA, ssDNA und RNA. Bei Bestrahlung mit UV-Licht (300 nm) zeigt EthBr eine orangefarbene Fluoreszenz (590 nm). Somit können die verschiedenen Nukleinsäure-Moleküle anhand der verschiedenen Banden nach der Auftrennung im Gel gut voneinander abgegrenzt und ihre Größe anhand eines Größenmarkers abgeschätzt werden. Der Größenmarker enthält verschiedene

Nukleinsäure-Fragmente bekannter Größe, die ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt werden. Es wurden 2 %ige Agarosegele und ein 100 bp DNA-Größenmarker benutzt.

### 2.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte mittels des MiniElute™ Gel Extraction Kit Protokolls von Qiagen. Benötigt wurde dieses Verfahren um die vorher mittels Real Time PCR amplifizierte und dann auf Agarosegel aufgetragene Standard-DNA zu isolieren. Das DNA Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gewogen. Das Gelstück wurde mit 3 Vol QG Puffer versetzt und bei 50° C für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 1 Vol Isopropanol wurde die Probe auf die MiniElute™ Säule überführt und 1 min lang zentrifugiert. Nun wurden 500 µl QG Puffer hinzu gegeben und wiederum erfolgte eine Zentrifugation für 1 min. Es folgte ein Waschschrift mit 750 µl PE Puffer, hier wurde ebenfalls 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Probe eine weitere Minute zentrifugiert. Zum Eluieren der DNA wurden 10 µl EB Puffer (10mM Tris-Cl, pH 8,5) auf das Zentrum der Membran gegeben und 1 min inkubiert, bevor ein letztes Mal für 1 min zentrifugiert wurde. Das Eluat wurde mit 10 µl Merck-Wasser versetzt und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.8 PCR-Methoden

#### 2.2.8.1 Konventionelle PCR

Mit der konventionellen PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) hat man die Möglichkeit DNA-Sequenzen zu vervielfachen (134). Bestimmte Regionen der DNA werden hierbei von einer DNA-Polymerase, welche Desoxynukleotide als Bausteine für den neuen Strang benutzt, kopiert. Welche Region vervielfältigt werden soll, kann man mit Oligonukleotiden, den so genannten Primern, bestimmen, die an die DNA binden und als Startpunkte für die Polymerase dienen. Für die PCR benutzt man eine spezielle, hitzebeständige DNA-Polymerase, die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt und als Taq-DNA-Polymerase bezeichnet wird. Die Hitzebeständigkeit dieses Enzyms erlaubt wiederholte Amplifikationszyklen nach einer einmaligen Zugabe der Taq-Polymerase am Beginn der Reaktion. Als erstes erfolgt die Denaturierungsphase, wobei

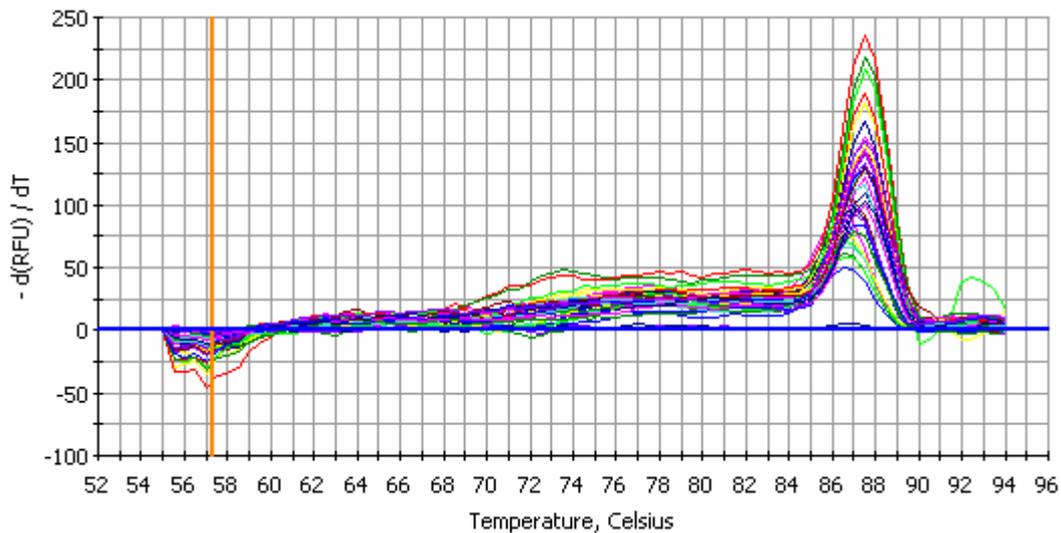
der Ausgangs-DNA-Strang bei 95 °C denaturiert und somit in zwei komplementäre Einzelstränge getrennt wird. Dann folgt die Annealingphase, in der sich ein Primerpaar, bestehend aus einem Forward- und einem Reverse-Primer, jeweils an einen der Einzelstränge bindet. Dies geschieht bei Temperaturen zwischen 40-72 °C. Ausgehend von diesen Primern kann nun die DNA-Synthese stattfinden, denn der DNA-Polymerase ist es möglich an die freien 3'-Hydroxylgruppen der Primer zu binden. Der dritte Schritt beinhaltet also die DNA-Synthese und wird auch Extensionsphase genannt. Dazu benötigt die DNA-Polymerase Magnesium als Cofaktor und es müssen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) als Bausteine zugegeben werden. Jede der genannten drei Phasen der PCR wird mehrfach als Zyklus wiederholt, meist handelt es sich um 30-40 Zyklen. In den Folgezyklen werden auch die neu gebildeten Stränge als Matrizen benutzt, so dass man nach 30 Zyklen theoretisch auf einen Vervielfältigungsfaktor von  $10^9$  kommt.

#### 2.2.8.2 Quantitative Real Time PCR

Wenn man die Expression verschiedener Gene in unterschiedlichen Gehirnregionen quantitativ erfassen möchte, bietet sich die Methode der quantitativen Real Time PCR an. Die Quantifizierung wird mithilfe von Fluoreszenz-Messungen während der PCR-Zyklen durchgeführt. Die Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren in die doppelsträngige DNA, wodurch diese stärker fluoresziert als der freie Farbstoff. Für alle Versuchsansätze wurde der iQ™ SYBR® Green Supermix von BioRad verwendet, der als Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green enthält. Das Anregungsmaximum von SYBR® Green liegt bei einer Wellenlänge von 490 nm und das Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 520 nm. Der verwendete BioRad iCycler misst während der Annealing-Phase den Anstieg der Fluoreszenz, der wie oben beschrieben aus der Amplifikation der doppelsträngigen PCR-Produkte resultiert. Zuerst ist die Amplifikation aufgrund der geringen Menge an DNA-Matrizen begrenzt, später steigt die Anzahl der Produkte derart an, dass es zur Hemmung der Reaktion kommt. Die Phase dazwischen, in der die Produktmenge exponentiell ansteigt, wird exponentielle Phase genannt. Der Übergang von der ersten Phase in die exponentielle Phase definiert den so genannten Schwellenzyklus (Threshold Cycle,  $C_T$ ). Der  $C_T$ -Wert hängt von der Ausgangsmenge der DNA ab und kann somit als quantitative Einheit verwendet werden.

Da SYBR® Green unabhängig von der Sequenz der gebildeten dsDNA interkaliert, muss eine Schmelzkurvenanalyse zur Unterscheidung von Primerdimeren und dem spezifischen PCR-Produkt durchgeführt werden. Die gegebenenfalls unerwünschten Nebenprodukte, wie zum Beispiel Primerdimere, haben eine andere Schmelztemperatur als das spezifische Hauptprodukt. Das Schmelzverhalten von doppelsträngiger DNA ist abhängig vom Anteil an GC, der Sekundärstruktur der DNA und Nukleotidfehlbildungen. Die Temperatur wird während der Schmelzkurvenanalyse stufenweise erhöht, dabei schmelzen die Doppelstränge wieder auseinander und es kommt zu einem Fluoreszenzverlust. In Abb. 2.1 sieht man ein Beispiel für eine Schmelzkurve, bei der die erste negative Ableitung des Fluoreszenzwertes gegen die Temperatur aufgetragen ist. Den Peak der Schmelzkurve befindet sich deshalb bei der Temperatur, bei der die meisten Doppelstränge denaturiert sind. Wurden bei der PCR Nebenprodukte gebildet, so gibt es mehrere Peaks bei der Schmelzkurvenanalyse.

Auch wurde nach jeder Real Time PCR eine Agarose-Gelelektrophorese (2.2.6) mit dem Produkt durchgeführt um ebenfalls die Spezifität der Reaktion sicherzustellen. Von jeder Probe wurden Doppeltbestimmungen durchgeführt und der durch die Software errechnete Mittelwert für die Auswertung genutzt. Jedes Experiment wurde zwei bis drei Mal durchgeführt. Besonders auffällige Einzelwerte („Ausreißer“) wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Um die Effizienz der Reaktion zu überprüfen und Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der verwendeten DNA zu erhalten wird parallel zur Real Time PCR der so genannten Gene von Interesse (GVI) eine Verdünnungsreihe einer Standard-DNA analysiert. Bei dieser Verdünnungsreihe wird die Standard-DNA

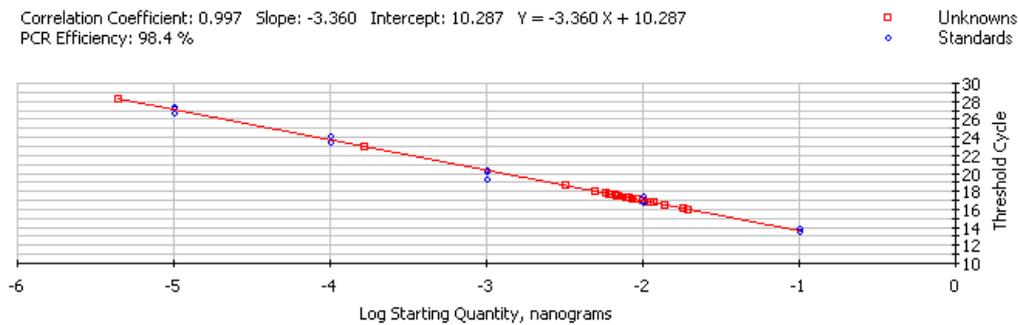


**Abb. 2.1: Beispiel einer Schmelzkurve.** Sie wurde erstellt zur Überprüfung der Spezifität der qRT PCR. Die Kurve wurde erstellt für das GVI 5-HTT im Hirnstamm der Maus.

von  $10^{-1}$  auf  $10^{-6}$  ng/ $\mu$ l abfallend verdünnt. Um die Standard-DNA zu erhalten, wurde ein Gemisch aus cDNA verschiedenster Hirnregionen als Matrize eingesetzt. Dieses Gemisch wurde dann ebenfalls mithilfe des iCycler iQ™ Real Time Detection System amplifiziert. Dann wurde das PCR Produkt auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und auf unerwünschte Nebenprodukte überprüft. Wenn keine Nebenprodukte vorhanden waren, wurde die Standard-DNA mittels MinElute™ Gel Extraction Kit Protokoll von Qiagen (2.2.7) aus dem Gel eluiert. Wenn man die Standard-DNA in bekannter Verdünnung parallel zur PCR der cDNA der zu untersuchenden Gehirnregion einsetzt, kann die Software eine Standardkurve berechnen, durch deren Steigung (slope) die Effizienz der PCR bestimmt werden kann. Ein Beispiel für eine solche Standardkurve liefert Abb. 2.2. Die Formel zur Bestimmung der Effizienz (=E) lautet:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Bei dieser Formel geht man von einer negativen Steigung aus. Das Programm gibt die Effizienz der Reaktion automatisch in Prozent an. Eine optimale Effizienz (100 %, Steigung 3,32) liegt vor, wenn die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt wird. Um zu überprüfen, ob eine lineare Beziehung vorhanden ist, kann man den Korrelationsquotienten zu Rate ziehen, welcher ungefähr bei 1 liegen sollte. Außerdem wurden quantitative Real Time PCR Untersuchungen mit Haushaltsgenen (HHG, engl. *house keeping*



**Abb. 2.2: Beispiel einer Standard-Kurve:** Die Kurve wurde erstellt durch Verdünnung einer Standard-DNA (blaue Markierung). Die rote Markierung gibt die Messwerte für das HHG GAPDH im Hirnstamm der Maus an.

*genes*, HKGs) durchgeführt und mit den Ergebnissen der PCR des GVI abgeglichen. Dies dient der Normalisierung der ermittelten Expressionsdaten (136). Das bedeutet auch, dass Ungenauigkeiten der RNA-Konzentrationsbestimmung und der cDNA-Synthese ausgeglichen werden. Haushaltsgene sind Gene, die grundlegende Zellfunktionen besitzen und so in allen Zellen bzw. Gehirnregionen aktiv sind. Folgende zwei HHG wurden verwendet: 18S (ribosomal 18S) und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase). Man sollte gegen mehr als ein HHG normieren, da gezeigt wurde, dass auch bei den HHG signifikante Expressionsunterschiede zwischen Geweben bestehen (136). Rechnerisch wurde die Normalisierung mittels der Normalisierungssoftware geNorm (GeNorm\_3.4) durchgeführt (137). Mögliche signifikante Unterschiede in der Expression der untersuchten Gene (5-HTT und DAT) zwischen Mäusen des Wildtyps und *Nos1* kd Mäusen wurden mittels des Student's t-Test ermittelt. In den folgenden Tabellen (Tab. 2.1, 2.2 und 2.3) sind die Reaktionsansätze für die quantitative Real Time PCR und die Reaktionsprotokolle dargestellt.

Reagenz	Menge (Standard-DNA, HHG)	Menge (GVI)
iQ™ SYBR Green Supermix	12,5 µl	12,5 µl
Forward Primer (1:10 bzw. 1:20 verdünnt)	1,0 µl	1,0 µl
Reverse Primer (1:10 bzw. 1:20 verdünnt)	1,0 µl	1,0 µl
cDNA	1,0 µl	2,0 µl
H <sub>2</sub> O (Merck)	9,5 µl	8,5 µl
Endvolumen	25,0 µl	25,0 µl

**Tab. 2.1:** Reaktionsansatz für quantitative Real Time PCR

Schritt	Phase	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
1	Denaturierung	95 °C	3 min	
2	Annealing	95 °C Annealingtemp.	30 s 45 s	Schritt 1-3 x mal
3	Reaktionsende	95 °C	1 min	
4	Schmelzkurven- erstellung	55 °C Temperatur wird nach 2. Zyklus um jeweils 0.5 °C erhöht.	10 s	80 mal
5	Lagerung	15 °C		1 mal

**Tab. 2.2:** Reaktionsprotokoll für quantitative Real Time PCR

	Annealingtemperatur	Anzahl der Zyklen
GAPDH	60 °C	x = 38 Zyklen
18S	60 °C	x = 30 Zyklen
DAT	54 °C	x = 40 Zyklen
5-HTT	61 °C	x = 40 Zyklen

**Tab. 2.3:** Annealingtemperaturen und Zyklenzahl der qRT PCR

## 2.3 Verhaltensuntersuchungen

### 2.3.1 *Elevated Plus Maze*

Der *Elevated Plus Maze* Test (EPM) wurde entwickelt, um Unterschiede in der Ängstlichkeit von Nagetieren festzustellen (138). Die zugrunde liegende Vorrichtung, welche aufgrund ihrer Bauweise dem Experiment ihren Namen gab, besteht aus vier Armen (jeweils 30 x 5 cm), die sich etwa 70 cm über dem Boden befinden. Zwei der Arme sind von nicht transparenten Seitenwänden (15 cm hoch) umschlossen, die anderen zwei sind offen. Die Plattform in der Mitte der vier Arme ist 5 x 5 cm groß. Die offenen Arme wurden konstant mit einer Beleuchtungsintensität von 200 Lux illuminiert, die Plattform in der Mitte mit 150 Lux und die geschlossenen Arme mit 100 Lux.

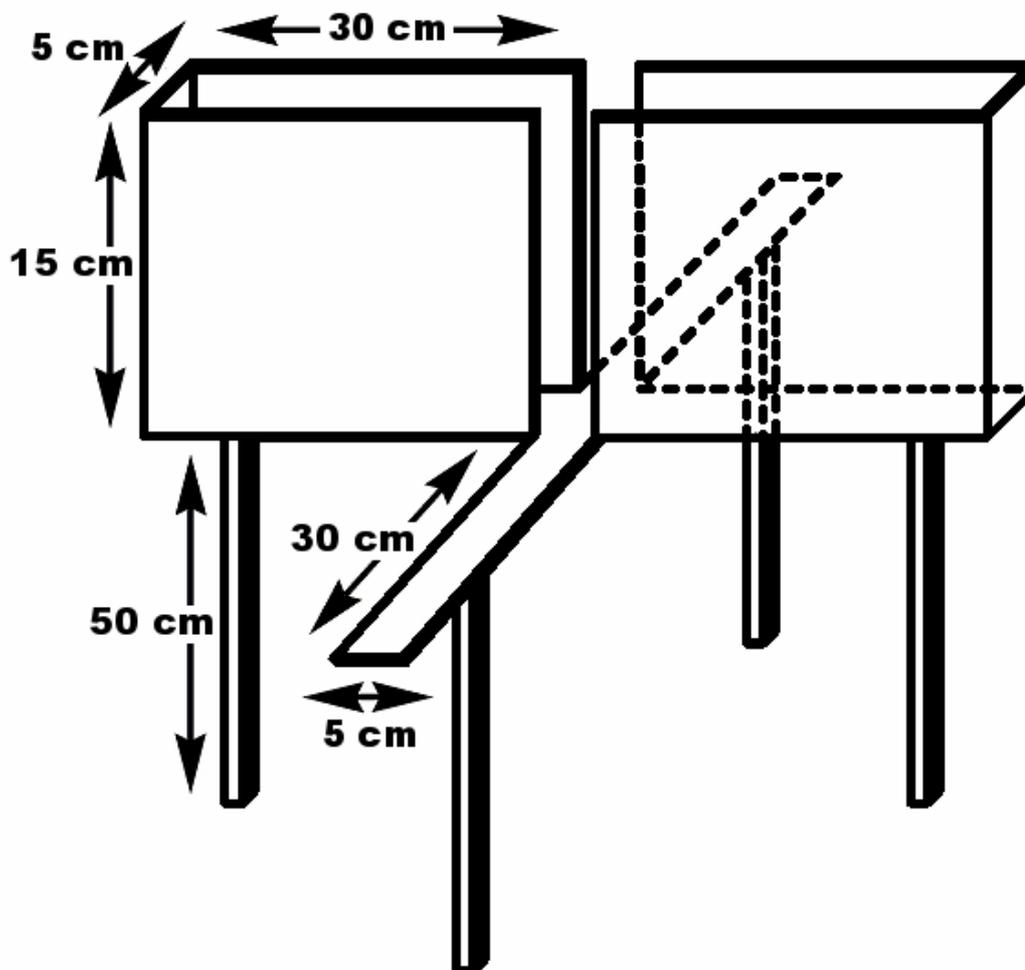


Abb. 2.3: Skizze der Versuchsvorrichtung des Elevated Plus Maze

Die Mäuse wurden zunächst mit Blickrichtung zu einem offenen Arm auf der Plattform abgesetzt, danach hatte sie fünf Minuten Zeit das EPM zu untersuchen. Das Verhalten der Tiere wurde mittels Videokamera festgehalten. Die Aufnahmen wurden mithilfe des VideoMot2 Programms (VideoMot2, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) ausgewertet. Sowohl die Strecke, welche die Mäuse auf jedem der vier Stege zurücklegten als auch die Zeit, welche sie auf dem jeweiligen Steg verbrachten, wurden bestimmt. Ein Eintritt oder Besuch wurde als solcher gewertet, wenn die Maus sich mit allen vier Pfoten auf einem Arm befand. Folgende Versuchsparameter wurden festgehalten:

- Anzahl der Besuche der offenen Arme
- Aufenthaltsdauer auf den offenen Armen
- Zurückgelegte Strecke auf den offenen Armen
- Anzahl der Besuche der geschlossenen Arme
- Aufenthaltsdauer auf den geschlossenen Armen
- Zurückgelegte Strecke auf den geschlossenen Armen
- Latenz bis zum ersten Besuch eines offenen Armes
- Verbrachte Zeit auf der zentralen Plattform

Daraus können folgende Parameter berechnet werden:

- Anzahl aller Besuche
- Zurückgelegte Gesamtdistanz
- Prozentualer Anteil der Besuche der offenen Arme an der Anzahl aller Besuch
- Prozentualer Anteil der Zeit auf den offenen Armen an der Gesamtzeit
- Prozentualer Anteil der Besuche der geschlossenen Arme an der Anzahl aller Besuche
- Prozentualer Anteil der Zeit auf den geschlossenen Armen an der Gesamtzeit

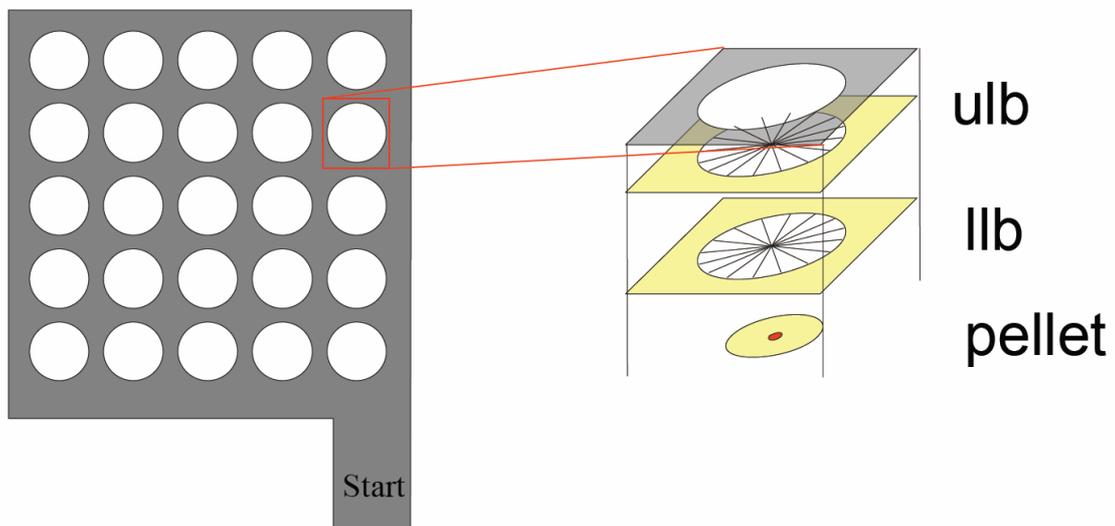
Zur Beurteilung der Ängstlichkeit der Mäuse wurden als wichtigste Parameter die Anzahl der Besuche der offenen Arme und der Zeitanteil auf den offenen Armen

dargestellt. Als Abschätzung der lokomotorischen Aktivität diente die zurückgelegte Gesamtdistanz.

### 2.3.2 Das COGITAT-System

Das COGITAT-System ist ein automatisches Lochbrettssystem (COGITAT, Cognitron GmbH, Göttingen, Deutschland) (139). In der vorliegenden Arbeit sollten mithilfe des COGITAT-Systems die Aufmerksamkeit und das räumliche Gedächtnis der Tiere untersucht werden. Die Oberfläche der COGITAT-Box wird von einer schwarzen Plexiglasplatte mit 25 Löchern (5 x 5) gebildet. Diese Löcher münden in Röhren, deren Boden eine weiße Platte bildet, die für jedes Loch eine Vertiefung aufweist, in welche ein Pellet (geruchloses Futter für die Versuchstiere) gelegt werden kann. Die Farbe dieser so genannten Fütterungsplatte entspricht der Farbe des Pellets (20 mg, Bioserv Product F05550, Frenchtown New Jersey, USA), damit letztere nicht von außerhalb der Röhre gesehen werden können. Als Umrandung der Box diente durchsichtiges Plexiglas, damit die Mäuse sich an den äußeren Gegebenheiten orientieren konnten. Um die Aktivitäten der Mäuse zu messen, wurde ein Infrarot-System verwendet. In den Röhren befinden sich drei verschiedene Lichtschranken, die erste 10 mm unter der Oberfläche, die zweite 20 mm unter der Oberfläche, die dritte auf Höhe der Pellets. Wurde nur die erste Lichtschranke durchbrochen, bedeutete dies eine „Inspektion“ des Lochs. Wurde die zweite Lichtschranke durchbrochen, das Pellet aber nicht gefressen, bedeutete dies einen „Besuch“ des Lochs. An dem angeschlossenen Computer wurde sowohl mittels proprietärer Software (RatMemory V2.4, Cognitron, GmbH, Göttingen, Deutschland) als auch mittels des Videotracking-Systems (VideoMot 2, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) 21 verschiedene Parameter der Aktivität der Maus ausgewertet. Für eine Übersicht aller möglichen Parameter siehe Tabellen 2.3 und 2.4. Die Kombination des Videotrackings mit dem Lichtschranken-Array ermöglicht die simultane Auswertung von globaler Aktivität und kognitions-relevanter Parameter. Das COGITAT-System wurde für Ratten entwickelt und bisher noch nicht an Mäusen etabliert. Es zeigte sich, dass die Mäuse sehr viel länger als Ratten brauchten, um zu erkennen, dass sich in den Löchern Pellets befinden. Für eine Skizze des COGITAT-Systems siehe Abb. 2.4.

## Holeboard



**Abb. 2.4:** Skizze der Versuchsvorrichtung des COGITAT-Systems

<b>Parameter</b>	<b>Bedeutung</b>
ols	Zahl der Ereignisse bei denen die obere Lichtschranke durchbrochen wird (entspricht Inspektionen)
uls	Zahl der Ereignisse bei denen die untere Lichtschranke durchbrochen wird (entspricht Besuchen)
x2	Anzahl Besuche von ursprünglich belegten Löchern
x3	Anzahl der gefressenen Pellets
x4	Anzahl Besuche von nicht belegten Löchern
x5	Anzahl Besuche von bereits geleerten Löchern
x6	Anzahl Besuche belegter Löcher ab dem ersten Loch des gesetzten Musters
x7	Anzahl in Reihenfolge geleerter Löcher ab dem ersten Loch des gesetzten Muster
x8	Anzahl der mehrfach besuchten Löcher
x9	Größte Anzahl der in Folge geleerter Löcher
i2	Anzahl Inspektionen von ursprünglich belegten Löchern
i4	Anzahl Inspektionen von nicht belegten Löchern
i5	Anzahl Inspektionen von bereits geleerten Löchern
i8	Anzahl der mehrfach inspizierten Löcher
ins	Anzahl der Inspektionen

**Tab. 2.3:** Parameter, die mittels des COGITAT-Systems gemessen werden können

Parameter	Bedeutung
wme	working memory error (5X/uls)
rme	reference memory error (4X/uls)
iwme	working memory error für Inspektionen (i5/ins)
irme	reference memory error für Inspektionen (i4/ins)
awme	Allgemeiner working memory error (X5+i5/ols)
arme	Allgemeiner reference memory error (X4+i4/ols)

**Tab. 2.4:** Abgeleitete Parameter des COGITAT-Systems

Die Experimente wurden jeweils zwischen 8 Uhr morgens und 16 Uhr nachmittags durchgeführt. Von den 25 Löchern des COGITAT-Systems wurden acht in einem bestimmten Muster mit den Pellets belegt. Jeden Tag wurden zwei Versuchsdurchläufe durchgeführt, die jeweils 240 s dauerten. Die Tiere wurden in einer zufälligen Reihenfolge getestet. Ein Versuchsdurchlauf war beendet, wenn ein Tier entweder alle Pellets gefunden und gefressen hatte oder wenn die Zeit abgelaufen war. Dieses wird im Folgenden als Kurzzeitversuche bezeichnet. Dann wurden nach den ersten Versuchsdurchläufen jeweils nach 3 Tagen Pause und dann nochmals nach 7 Tagen Pause erneut Versuchsdurchläufe durchgeführt, die so genannten Langzeitversuche 1 bzw. 2 (LZV 1 und LZV 2).

## 2.4 Statistik

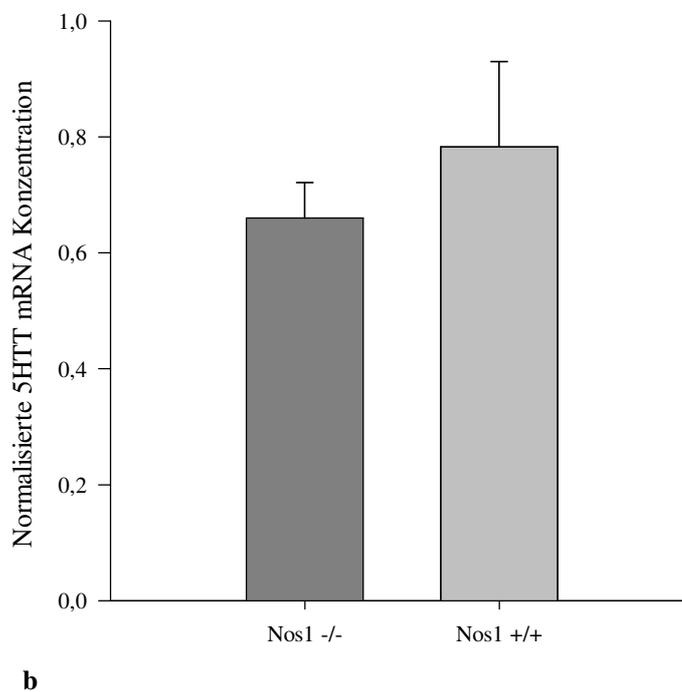
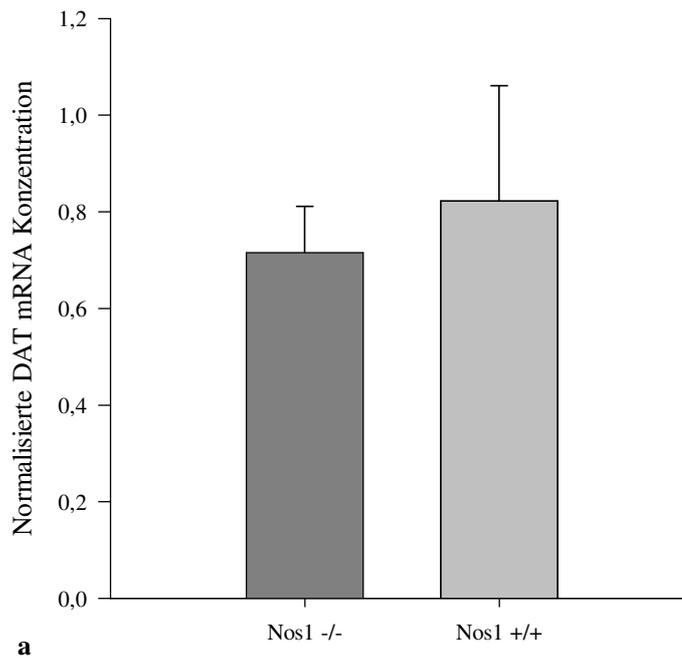
Als Signifikanztest wurde der t-Test nach Student (ungepaart, einseitig) verwendet. Dabei wurden p-Werte  $< 0,05$  als signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Gen-Expressionsanalyse mittels der quantitativen Real Time PCR

Aufgrund der Interaktion zwischen dem nitrinergen und serotonergen sowie dem dopaminergen System und der Hinweise, dass bei *Nos1* kd Mäusen diese monoaminergen Systeme dysreguliert sind, stellten wir die Hypothese auf, dass bei den *Nos1* kd Tieren eine veränderte Expression des Serotonin- (5-HTT) sowie des Dopamin-Transporters (DAT) vorliegt. Als zu untersuchender Teil des Gehirns wurde in Hinblick auf den 5-HTT der Hirnstamm gewählt, da hier die Raphekerne liegen, in denen die serotonergen Neuronen zu finden sind, da für eine selektive Präparation die Raphekerne der Maus zu klein sind. Für die Untersuchung des Dopamin-Transporters wählten wir das Striatum, welches eine hohe Anzahl an dopaminergen Neuronen aufzeigt. Die Gehirne wurden wie in 2.1 und 2.2 beschrieben entnommen, die RNA isoliert, cDNA hergestellt und diese mittels qRT PCR untersucht. Es wurde das Gewebe von jeweils sieben Knockout- und sieben Wildtyptieren untersucht. Die hieraus gewonnenen Werte wurden gegen die Haushaltsgene 18S und GAPDH normalisiert.

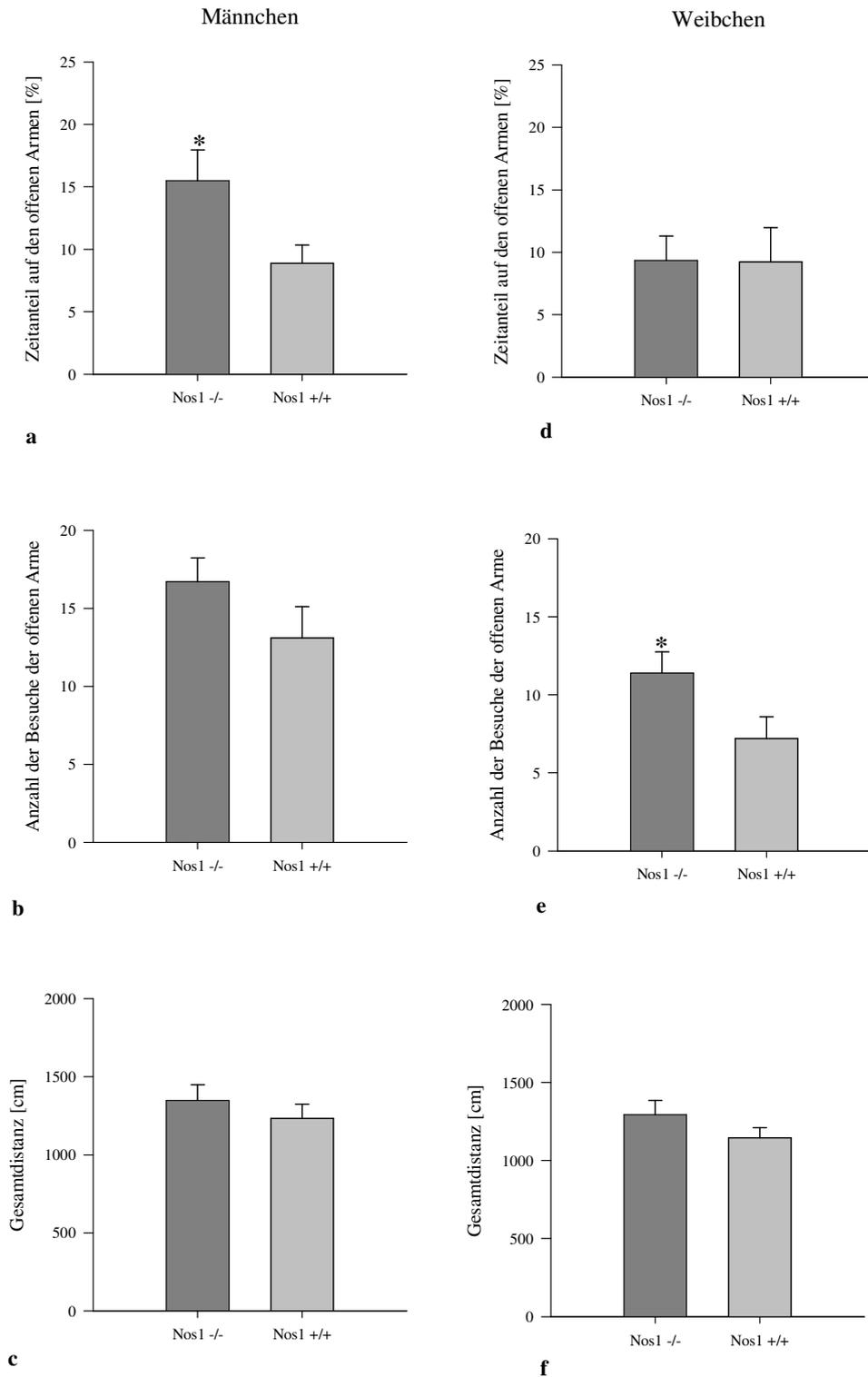
In Abbildungen 3.1a und 3.1b sind die gemittelten Werte dreier unabhängiger Experimente dargestellt. Hinsichtlich der Expression des 5-HTT sowie des DAT konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Student's t-Test  $p = 0,24$  und  $p = 0,37$ ).



**Abb. 3.1:** Ergebnisse der normalisierten mRNA Konzentration des DAT (a) und des 5-HTT (b) bei den *Nos1* kd Mäusen (*Nos1* -/-) im Vergleich zu Wildtyp Mäusen (*Nos1* +/+). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Student's t-Test  $p > 0,05$ ).

### 3.2 Untersuchung der Ängstlichkeit mittels des *Elevated Plus Maze*

Da zahlreiche Studien Hinweise für eine Rolle des nitrinergen Systems bei Angst-relevanten Verhaltensweisen geben (140,141) und verminderte Ängstlichkeit bzw. vermehrtes Risikoverhalten auch häufig bei Menschen mit ADHS gefunden wird, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich im *Elevated Plus Maze* Unterschiede zwischen den *Nos1* kd Mäusen und den Wildtypen in Bezug auf diese Eigenschaft zeigen. Hierbei wurden die Ergebnisse geschlechtergetrennt ausgewertet. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Zeit auf den offenen Armen, die Besuche der offenen Arme und die zurückgelegte Gesamtdistanz. Unterschiede in diesen Parametern zeigen eine veränderte Ängstlichkeit an; aus der zurückgelegten Gesamtdistanz ist ersichtlich, ob diese Unterschiede durch vermehrte motorische Aktivität zu erklären sind. Die weiblichen kd Mäuse (Abb. 3.2, d-f) besuchten signifikant häufiger die offenen Arme (Abb. 3.2e; Student's t-Test  $p = 0,02$ ), während die kd Männchen (Abb. 3.2, a-c) signifikant mehr Zeit auf den offenen Armen verbrachten (Abb. 3.2a; Student's t-Test  $p = 0,04$ ). Hinweise auf einen Unterschied in der motorischen Aktivität gab es nicht, da sich die zurückgelegte Gesamtdistanz nicht signifikant zwischen beiden Gruppen unterschied (Abb. 3.2c, f).



**Abb. 3.2:** Ergebnisse für die zurückgelegte Gesamtdistanz (c, f), Besuche auf den offenen Armen (b, e) und die verbrachte Zeit auf den offenen Armen (a, d) geschlechtergetrennt nach Männchen (a-c) und Weibchen (d-f) dargestellt. *Nos1* -/- bezeichnet die kd Mäuse, *Nos1* +/+ sind die Wildtypen.

### 3.3 Untersuchung des räumlichen Lernens und der Gedächtnisleistung mittels des COGITAT-Systems

Zur Evaluierung möglicher kognitiver Defizite wurden die Tiere in Hinblick auf ihr Lernvermögen und ihre Gedächtnisleistungen mithilfe des COGITAT-Systems geprüft. Hierbei müssen die Tiere ein bestimmtes Muster von Löchern erlernen, in denen sich Futter-Pellets befinden. Von der Vielzahl der messbaren Parametern sind für die hier untersuchte Problemstellung die Gesamtanzahl der Besuche (Gesamtanzahl der Ereignisse, bei denen die untere Lichtschranke durchbrochen wurde), Gesamtanzahl der gefressenen Pellets, der *working memory error* (Fehler im Arbeitsgedächtnis; wme) und der *reference memory error* (Fehler im Referenzgedächtnis; rme) betrachtet worden. Der Fehler im Arbeitsgedächtnis wird errechnet aus der Anzahl der Besuche bereits geleerter Löcher im Verhältnis zu allen Besuchen. Der Fehler im Referenzgedächtnis errechnet sich aus der Anzahl von Besuchen nicht belegter Löcher im Verhältnis zu allen Besuchen. Das Referenzgedächtnis bei Mäusen und Ratten ist dem deklarativen Gedächtnis, also dem Langzeitgedächtnis für bewusste oder explizite Wissensinhalte, beim Menschen vergleichbar. Das Arbeitsgedächtnis ist wie beim Menschen eine Form des Kurzzeitgedächtnisses.

#### 3.3.1 Ergebnisse der Kurzzeitversuche

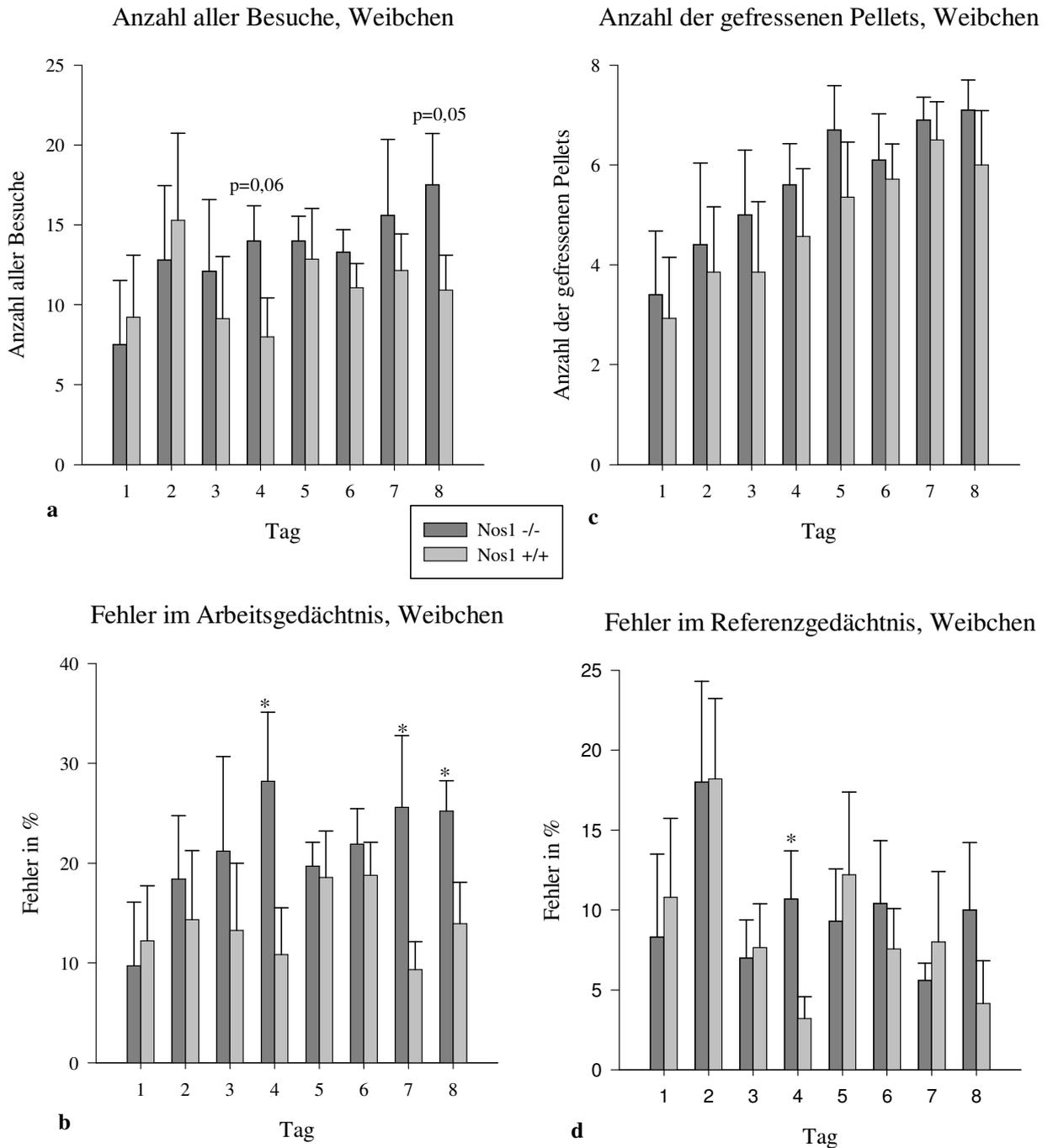
Die Knockdown Tiere fanden nominell mehr Pellets als die Wildtyp Tiere (Abb. 3.3c und 3.4c), allerdings war dies nicht signifikant unterschiedlich. Es zeigte sich aber, dass der Fehler im Arbeitsgedächtnis bei den kd Tieren bei den Männchen nominell (Abb. 3.4b) und bei den Weibchen sogar signifikant größer war (Abb. 3.3b, Student's t-Test Tag 4  $p = 0,03$ , Tag 7  $p = 0,02$ , Tag 8  $p = 0,04$ ). Dies konnte nicht nur durch ein vermehrtes Suchverhalten bzw. eine größere Anzahl an Gesamtbesuchen der Löcher erklärt werden, da sich dieser Parameter nicht signifikant bei den männlichen Tieren (Abb. 3.4a) und nur tendenziell bei den weiblichen Tieren (Abb. 3.3a, Student's t-Test Tag 4  $p = 0,06$ , Tag 8  $p = 0,05$ ) zwischen beiden Gruppen unterschied. Der Fehler im Referenzgedächtnis zeigte bis auf jeweils einen einzelnen Versuchstag (Tag 4 Student's t-Test  $p = 0,02$  bei den weiblichen Tieren und Tag 8  $p = 0,03$  bei den männlichen Tieren,

Abb. 3.3d bzw. Abb. 3.4d) keine signifikante Unterschiede zwischen Knockdown und Wildtyp Tieren.

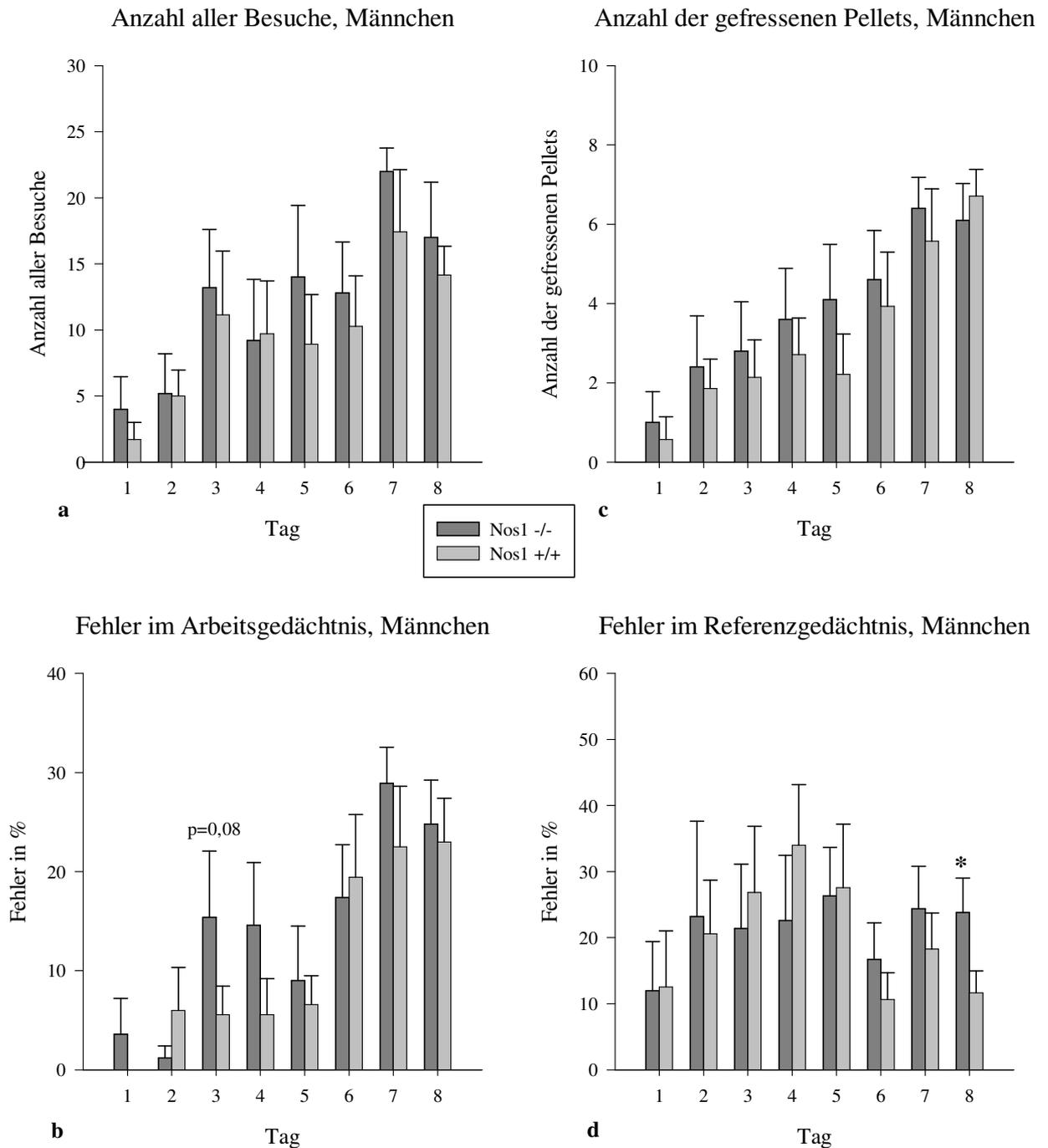
### 3.3.2 Ergebnisse der Langzeitversuche 1 und 2

Bei den weiblichen kd Mäusen zeigte sich ein tendenziell höherer Fehler im Arbeitsgedächtnis im Langzeitversuch 2 nach 7 Tagen Versuchspause (Abb. 3.6c, Student's t-Test  $p = 0,08$ ). In allen übrigen Parametern der Langzeitversuche wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (Abb. 3.5 und 3.6).

Bei den männlichen kd Mäusen zeigte sich ein signifikant höherer Fehler im Arbeitsgedächtnis im Langzeitversuch 1 nach 3 Tagen Versuchspause (Abb. 3.8a, Student's t-Test  $p = 0,03$ ). Dies konnte wiederum nicht nur durch ein vermehrtes Suchverhalten bzw. eine größere Anzahl an Gesamtbesuchen der Löcher erklärt werden, da sich dieser Parameter nicht signifikant bei den männlichen Tieren (Abb. 3.7b) zwischen beiden Gruppen unterschied. In den übrigen Parametern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den männlichen Tieren in den Langzeitversuchen (Abb. 3.7 und 3.8).

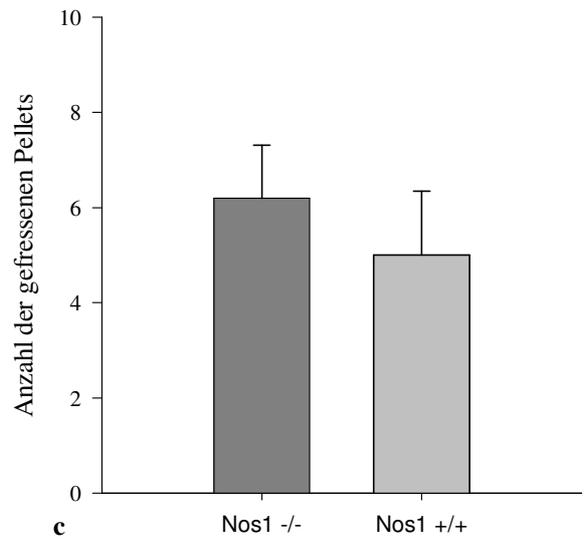
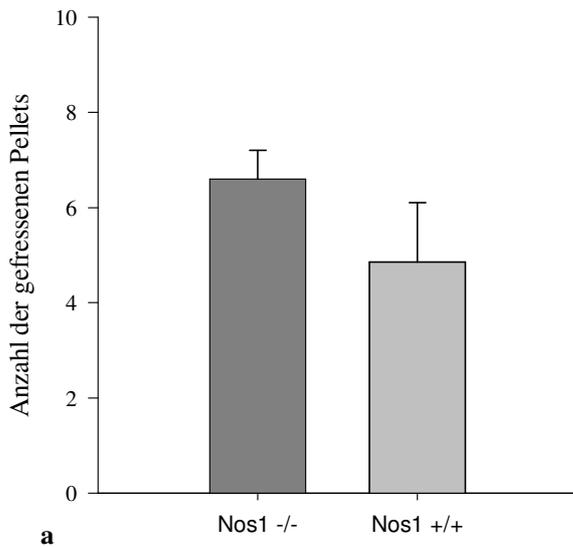


**Abb. 3.3:** Ergebnisse für das räumliche Lernvermögen weiblicher *Nos1* kd Tiere im Kurzzeitversuch. Anzahl aller Besuche (a), Fehler im Arbeitsgedächtnis (b), Anzahl der gefressenen Pellets (c), Fehler im Referenzgedächtnis (d). *Nos1* -/- bezeichnet die kd Mäuse, *Nos1* +/+ steht für die Wildtypen.

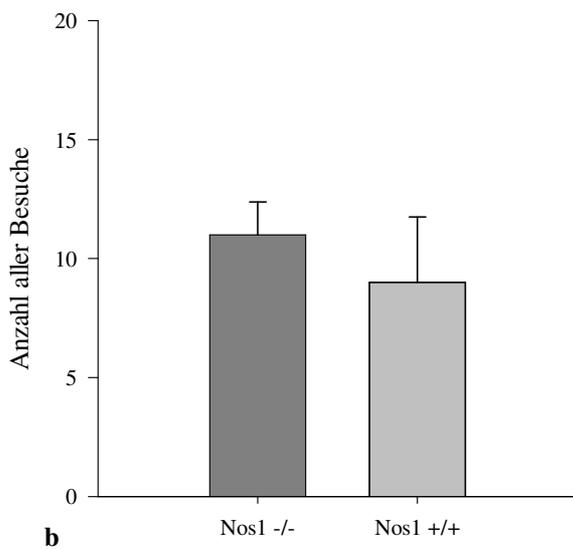


**Abb. 3.4:** Ergebnisse für das räumliche Lernvermögen männlicher *Nos1* kd Tiere im Kurzzeitversuch. Anzahl aller Besuche (a), Fehler im Arbeitsgedächtnis (b), Anzahl der gefressenen Pellets (c), Fehler im Referenzgedächtnis (d). *Nos1* -/- bezeichnet die kd Mäuse, *Nos1* +/+ steht für die Wildtypen.

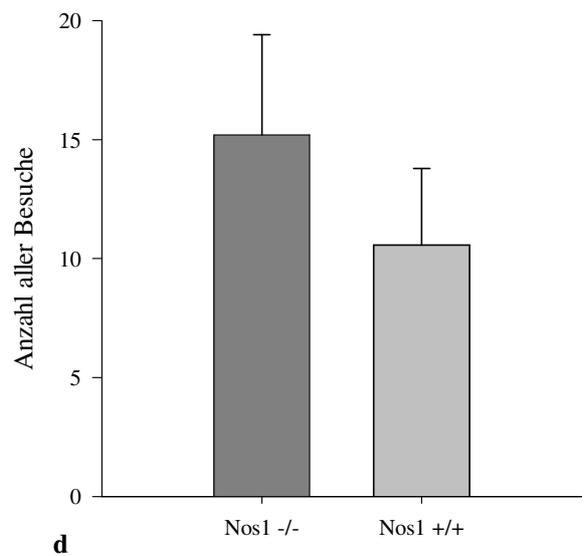
Anzahl der gefressenen Pellets, LZV 1, Weibchen Anzahl der gefressenen Pellets, LZV 2, Weibchen



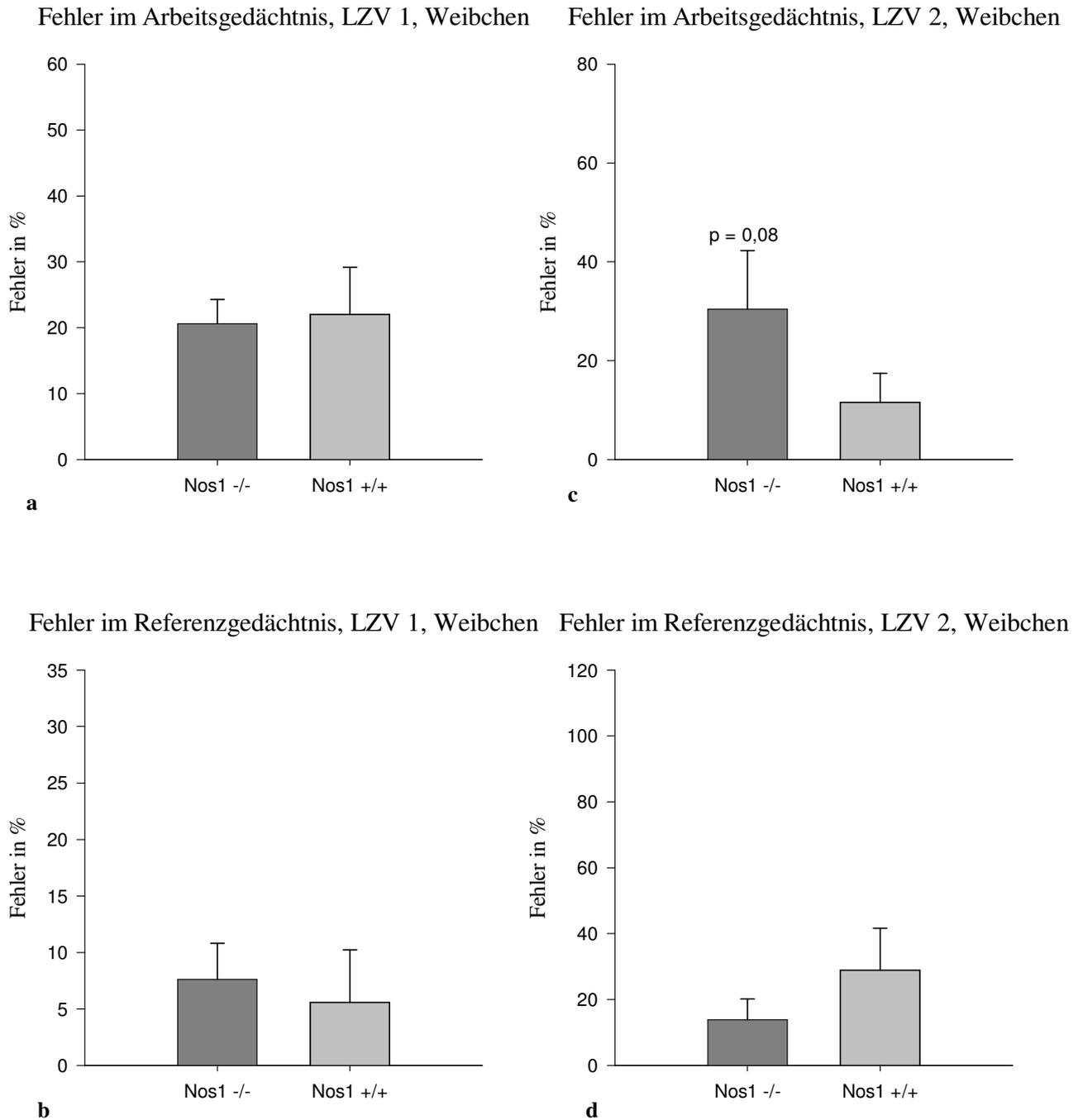
Anzahl aller Besuche, LZV 1, Weibchen



Anzahl aller Besuche, LZV 2, Weibchen

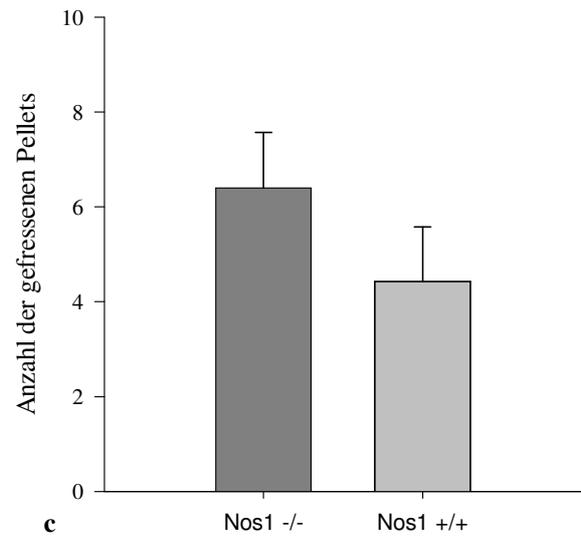
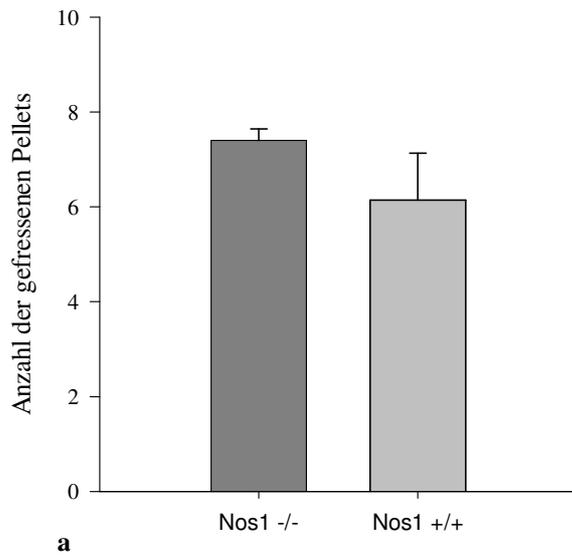


**Abb. 3.5:** Räumliches Lernvermögen weiblicher *Nos1* kd Tiere in den Langzeitversuchen 1 und 2 (LZV 1 und 2). Anzahl der gefressenen Pellets im LZV 1 (a), Anzahl aller Besuche im LZV 1 (b), Anzahl der gefressenen Pellets im LZV 2 (c), Anzahl aller Besuche im LZV 2 (d). Bei keinem der Parametern fanden sich hier signifikante Unterschiede ( $p > 0,05$  im Student's t-Test). *Nos1* -/- bezeichnet die kd Mäuse, *Nos1* +/+ steht für die Wildtypen.

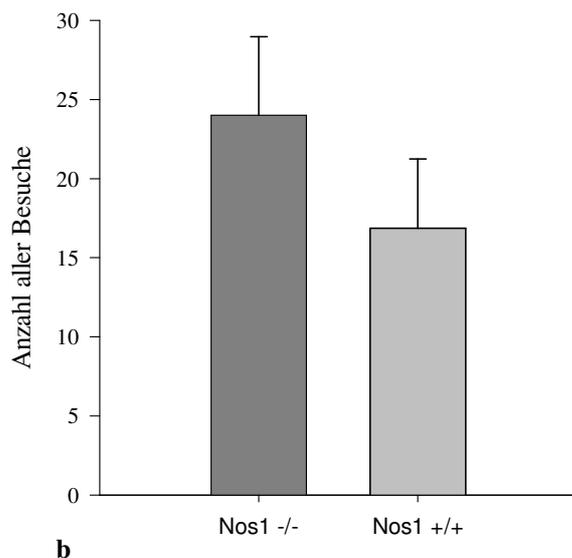


**Abb. 3.6:** Räumliches Lernvermögen weiblicher *Nos1* kd Tiere in den Langzeitversuchen 1 und 2 (LZV 1 und 2). Fehler im Arbeitsgedächtnis im LZV 1 (a), Fehler im Referenzgedächtnis im LZV 1 (b), Fehler im Arbeitsgedächtnis im LZV 2 (c), Fehler im Referenzgedächtnis im LZV 2 (d). *Nos1* -/- bezeichnet die kd Mäuse, *Nos1* +/+ steht für die Wildtypen.

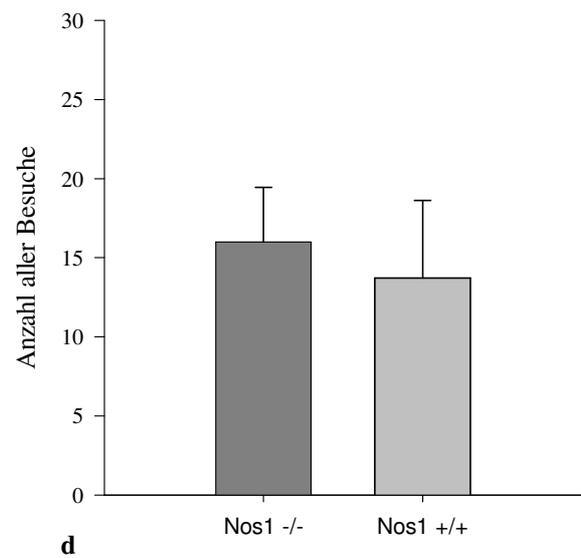
Anzahl der gefressenen Pellets, LZV 1, Männchen Anzahl der gefressenen Pellets, LZV 2, Männchen



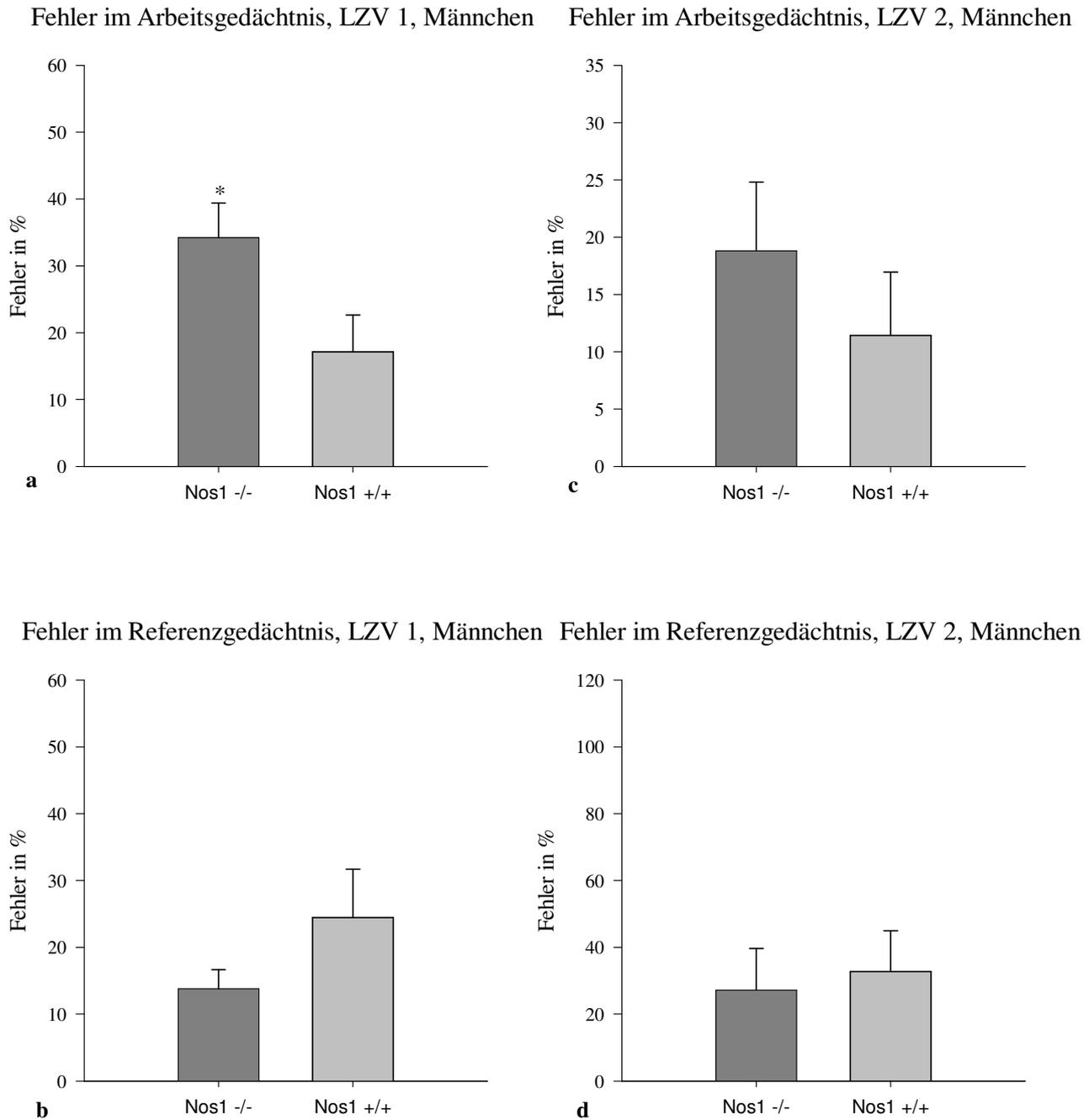
Anzahl aller Besuche, LZV 1, Männchen



Anzahl aller Besuche, LZV 2, Männchen



**Abb. 3.7:** Räumliches Lernvermögen männlicher *Nos1* kd Tiere in den Langzeitversuchen 1 und 2 (LZV 1 und 2). Anzahl der gefressenen Pellets im LZV 1 (a), Anzahl aller Besuche im LZV 1 (b), Anzahl der gefressenen Pellets im LZV 2 (c), Anzahl aller Besuche im LZV 2 (d). Bei keinem der Parametern fanden sich hier signifikante Unterschiede ( $p > 0,05$  im Student's t-Test). *Nos1* -/- bezeichnet die kd Mäuse, *Nos1* +/+ steht für die Wildtypen.



**Abb. 3.8.** Räumliches Lernvermögen männlicher *Nos1* kd Tiere in den Langzeitversuchen 1 und 2 (LZV 1 und 2). Fehler im Arbeitsgedächtnis im LZV 1 (a), Fehler im Referenzgedächtnis im LZV 1 (b), Fehler im Arbeitsgedächtnis im LZV 2 (c), Fehler im Referenzgedächtnis im LZV 2 (d). *Nos1* -/- bezeichnet die kd Mäuse, *Nos1* +/- steht für die Wildtypen.

## 4 Diskussion

In den vergangenen Jahren wurden große Fortschritte in der Aufklärung der physiologischen und pathophysiologischen Funktionen von NO und den NO-Synthasen erreicht. Gerade die Erforschung der Rolle der neuronalen Isoform der NOS führte zu interessanten Ergebnissen, die vermuten lassen, dass NOS-I eine Rolle bei verschiedenen psychiatrischen und neurodegenerativen Erkrankungen spielt (88,142). Dennoch sind viele Fragen immer noch offen, auch sind die physiologischen Aufgaben der NOS-I noch nicht abschließend geklärt. Insbesondere ergaben sich in verschiedenen Versuchen Hinweise, dass das nitrinerge System in Zusammenhang mit Funktionen der Aufmerksamkeit, Aktivität und des Gedächtnisses eine Rolle spielt (99,100,143).

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Phänotypisierung der *Nos1* kd Maus zu leisten. Zum einen ist die Rolle des NO in der Gehirnfunktion von Mensch und Tier immer noch unklar, und zum anderen zeigen frühere Untersuchungen der *Nos1* kd Mäuse ein teilweise inkonsistentes Bild, so dass noch weiterer Aufklärungsbedarf besteht, ob diese Tiere als Modell für spezifische neuropsychiatrische Störungen nützlich sein könnten. In der vorliegenden Arbeit im speziellen sollte dies durch die expressionsanalytische Untersuchung der monoaminergen Kerngebiete von *Nos1* kd Mäusen, zum anderen durch Untersuchung ihres Verhaltens vor allem in Bezug auf Ängstlichkeit und kognitive Fähigkeiten erreicht werden. Hierdurch sollte auch herausgefunden werden, ob es Hinweise gibt, dass die *Nos1* kd Maus möglicherweise als Tiermodell für zumindest einen Endophänotypen der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung fungieren kann.

### 4.1 Expression der monoaminergen Transmitter bei der *Nos1* kd Maus

Nicht nur in Versuchen mit *Nos1* Knockdown Mäusen, auch bei Experimenten mit NOS-Inhibitoren ergaben sich diverse Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung des nitrinergen und des serotonergen Systems. In *Nos1* kd Mäusen fand man eine Veränderung des serotonergen Systems im Sinne von hypofunktionalen 5-HT<sub>1A</sub>- und 5-

HT<sub>1B</sub>-Rezeptoren und einem verminderten frontalen Serotonin-Umsatz mit in Folge erhöhter Serotonin-Konzentration (40,42). Bei Versuchen mit NO-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel Effekte von serotonergen Antidepressiva (SSRIs) durch NOS-I-Inhibitoren verstärkt werden konnten. (95,144). Harkin et al. konnten auch Hinweise darauf finden, dass die antidepressiven Effekte der NOS-Inhibitoren über einen serotonergen Weg vermittelt werden, da bei Blockade des endogenen Serotonins die antidepressiven Effekte nicht mehr zu sehen waren (145). Außerdem fand man heraus, dass Paroxetin, ein selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer, die NOS inhibiert (146). Interessanterweise exprimiert die Mehrheit der serotonergen Neurone in den Raphekernen des Hirnstamms auch NOS-I (147). Die genaueren Mechanismen der Interaktion zwischen NO und Serotonin sind noch immer unklar. Eine Möglichkeit scheint die Beeinflussung der Aktivität von 5-HTT durch den second messenger des NO, cGMP, zu sein (148,149). Eine andere Möglichkeit wären direkte Protein-Protein-Interaktionen, S-Nitrosylierung des Serotonin-Transporters oder die gegenseitige Beeinflussungen der Expression des jeweiligen Enzyms. Da die Mechanismen der gegenseitigen Beeinflussung des serotonergen und nitrinergen Systems noch nicht genau bekannt sind, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob der Serotonin-Transporter (5-HTT), ein Schlüsselmolekül in der Regulation des serotonergen Systems, bei den *Nos1* kd Mäusen vermehrt oder vermindert exprimiert wird. Aus neueren Untersuchungen an Zellkulturen geht hervor, dass eine Koexpression von NOS-I und 5-HTT zu einer verminderten Expression von 5-HTT an der Zelloberfläche und somit auch zu einer geringeren Wiederaufnahme an Serotonin führt (150). Auch zeigte sich, dass die maximale Rate der Wiederaufnahme an Serotonin sowie die Expression des 5-HTT an der Zelloberfläche bei *Nos1* Knockdown Mäusen gesteigert war. Die Hemmung der Serotonin-Wiederaufnahme und die verminderte Expression von 5-HTT an der Zelloberfläche war allerdings weniger von der NOS-I Enzymaktivität abhängig, sondern eher durch eine Interaktion der carboxyterminalen PDZ-Domänen beider Proteine bedingt. Dieser Mechanismus scheint den inhibitorischen Effekt von NOS-I auf den Transport des 5-HTT zur Zelloberfläche zu vermitteln und kann als endogener SSRI-artiger Wirkmechanismus angesehen werden. Auf Genexpressionsebene scheint es jedoch keine gegenseitige, ggf. kompensatorische Regulation zu geben, da in der vorliegenden Arbeit mittels qRT PCR keine signifikanten Unterschiede zwischen den

Knockdown und den Wildtyp Mäusen in der Menge an 5-HTT mRNA im Hirnstamm festgestellt wurden.

Was das dopaminerge System anbelangt, gibt es ebenfalls Daten, die eine starke Interaktion mit dem nitrinergen System belegen. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass die Methamphetamin (METH)-induzierte dopaminerge Neurotoxizität in Swiss Webster Mäusen mittels des NOS-I-Inhibitors 7-NI abgemildert werden konnte. In Versuchen mit *Nos1* kd Mäusen zeigte sich ebenfalls, dass diese gegen die METH-induzierte dopaminerge Neurotoxizität geschützt waren (65). Auch bei Versuchen mit pharmakologischen Tiermodellen für das Parkinson-Syndrom zeigten sich sowohl *Nos1* kd Mäuse als auch Mäuse, die mit dem spezifischen NOS-I-Inhibitor 7-NI behandelt worden waren, geschützt gegen MPTP-induzierte Neurotoxizität (151,152). MPTP ist eine Substanz, welche zur Zerstörung nigrostriataler dopaminerge Neuronen führt und so ein Parkinson-Syndrom auch beim Menschen hervorruft. Hier wurde in einer immunhistochemischen Studie gefunden, dass die Immunreaktivität der Tyrosinhydroxylase und des DAT nach Gabe von MPTP signifikant im Striatum und in der Substantia nigra reduziert war. Bei Gabe von 7-NI zeigte sich ein protektiver Effekt hinsichtlich dieser Abnahme. Auch konnte nachgewiesen werden, dass im Striatum der Ratte eine NO Produktion durch elektrische Stimulation der Substantia nigra oder Gabe von Dopamin-D1-Rezeptoragonisten ausgelöst werden kann. Dies wiederum kann durch einen Dopamin-D2-Rezeptorabhängigen Mechanismus beeinflusst werden (153).

NO scheint also ein Modulator der Differenzierung und des Überlebens von dopaminerge Neuronen zu sein. Im Gegenzug konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die *Parkin*-Knockout Maus, ein Modelltier für hereditäre Parkinsonerkrankungen, resistent gegen die Neurotoxizität durch NO ist (154). In neueren Untersuchungen zeigte sich eine gesteigerte Dopamin D1-Signalübertragung in *Nos1* Knockout Mäusen (155). Bei in vivo Versuchen mit Ratten mittels Mikrodialyse von NOS-Inhibitoren wie L-NAME und 7-NINA wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Dopaminausschüttung beobachtet, welcher wiederum bei zusätzlicher Gabe des NO Vorläufers L-Arginin deutlich geringer war (156).

Eine weitere Rolle scheinen beide Transmittersysteme beim männlichen Sexualverhalten zu spielen. Sexualhormone regulieren die Freisetzung von Dopamin im medialen präoptischen Areal (MPOA) zum Teil dadurch, dass sie die Expression von NOS-I steigern. Die resultierend gesteigerte NO Produktion steigert wiederum die Dopaminfreisetzung. Glutamat scheint ebenfalls die Dopaminfreisetzung über den Weg einer vermehrten NO Produktion zu steigern. Dopamin wiederum ist ein wichtiger Botenstoff beim männlichen Sexualverhalten (157). Was nun die Mechanismen der Interaktion des nitrinergen mit dem dopaminergen System anbelangt, scheint die Inhibition des DAT durch von NOS-I produziertem NO einer der möglichen Mechanismen zu sein. Dies wurde schon vor einiger Zeit als neue Form der interneuralen Kommunikation beschrieben, als sog. nicht-synaptische, nicht-rezeptorvermittelte Interaktion (158). Deswegen nahmen wir an, dass bei der *Nos1* kd Maus auch eine kompensatorische Expressionsänderung des DAT zu finden wäre. Es zeigte sich jedoch in der vorliegenden Arbeit kein signifikanter Unterschied in der Expression des DAT zwischen den Wildtyp- und den *Nos1* kd-Mäusen. Interaktionen zwischen beiden Molekülen beinhalten daher eher direkte Protein-Protein-Interaktionen oder posttranslationale Prozesse, wie zum Beispiel S-Nitrosylierung.

#### **4.2 Ängstlichkeit der *Nos1* kd Maus**

Zur Symptomatik des ADHS gehören neben der Triade der Aufmerksamkeitsstörung, der motorischen Hyperaktivität und der Impulsivität unter anderem auch eine verminderte Ängstlichkeit und vermehrte Risikobereitschaft (159). Es gibt diverse Untersuchungen, die einen anxiolytischen Effekt verschiedener NOS-Inhibitoren zeigen und zwar sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen, sowohl durch systemische als auch durch lokale Gabe (93,115,140). Dies ließ bei den *Nos1* kd-Tieren einen vermindert ängstlichen Phänotyp erwarten. Ob eine derartige verminderte Ängstlichkeit bei Mäusen vorliegt, kann im *Elevated Plus Maze* festgestellt werden. In früheren Untersuchungen verbrachten die *Nos1* kd Mäuse mehr Zeit in den geschlossenen Armen oder es wurden keine Unterschiede zwischen den Tieren gefunden (46). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und *Nos1* kd Tieren

festgestellt werden. Die kd Mäuse verbrachten eine signifikant höhere Zeit auf den offenen Armen als auf den geschlossenen bzw. sie besuchten häufiger die offenen Arme, was auf eine verminderte Ängstlichkeit hindeutet, da dies nicht auf eine vermehrte allgemeine Aktivität zurückgeführt werden konnte. Eine neuere Untersuchung zeigte, dass die verminderte oder vermehrte Ängstlichkeit von *Nos1* kd Mäusen vom sozialem Kontext abhängig sein kann (160). Ebenfalls stark abhängig ist der Verhalten der Tiere in den verschiedenen Tests von der Beleuchtungsstärke des Versuchsaufbaus, die allerdings nur selten explizit in den Beschreibungen angegeben ist. Deswegen sind auch hier noch weitere Versuchsreihen unter standardisierten Bedingungen nötig, bei denen darüber hinaus auch das soziale Umfeld berücksichtigt wird.

### **4.3 Räumliches Lernen und Gedächtnis der *Nos1* kd Maus**

In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass das nitrinerge System eine Rolle bei Lernprozessen spielt. So lässt sich zum Beispiel mit dem unselektivem NOS-Inhibitor L-NAME eine bestimmte Form des Langzeitgedächtnisses der Honigbiene beeinträchtigen (52,161). Bei Versuchen mit Ratten im *8-Arm Radial Maze* konnte gezeigt werden, dass die Gabe von L-NAME das Arbeitsgedächtnis dieser Tiere verschlechterte (162). Allerdings hatte in dieser Untersuchung von Zou et. al 7-NI, welches funktional selektiv die NOS-I inhibiert, keinen verschlechternden Einfluss auf das Arbeitsgedächtnis. Im Gegensatz hierzu wurde in einer früheren Arbeit von Holscher et al. ein negativer Einfluss von 7-NI auf das Arbeits- und Referenzgedächtnis von Ratten im *8-Arm Radial Maze* beschrieben (68). Hinsichtlich des Langzeitgedächtnisses zeigt eine Untersuchung an Ratten- und Mäusegehirnen einen signifikanten Verlust der Langzeitpotenzierung nach Inhibition der NOS-I (163). Die Langzeitpotenzierung der synaptischen Plastizität gilt als neurophysiologischer Mechanismus für Lernprozesse und Gedächtnisbildung und kann als Modell für die Entstehung des Langzeitgedächtnisses betrachtet werden (164,165). Passend dazu gibt es Hinweise auf eine wichtige Rolle des nitrinergen Systems bei neurodegenerativen Prozessen wie der Alzheimer-Demenz. Limon et. al konnten zeigen, dass die Injektion von Beta-Amyloid zu einem Anstieg der Enzymaktivität der NOS-I und somit zu einer

vermehrten NO Produktion führte, auch war die räumliche Lernfähigkeit dieser Tiere beeinträchtigt (166). Die Beeinträchtigung des räumlichen Lernvermögens im *Object Location Test* durch L-NAME konnte in einer anderen Arbeit durch den NO-Donor Molsidomin aufgehoben werden (167). Aus den divergierenden Ergebnissen dieser Untersuchungen kann man den Schluss ziehen, dass sowohl eine zu große als auch eine zu kleine Menge an NO zu kognitiven Einschränkungen führen kann. Auch die *Nos1* kd Mäusen wurden bereits in Hinblick auf kognitive Einschränkungen untersucht und vor allem Defizite im räumlichen Lernen gefunden (46,50,162). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit versucht anhand eines automatisierten Lochbrett-systems, des COGITAT-Systems, welche bisher noch nicht bei Untersuchungen an Mäusen verwendet wurde, nachzuvollziehen. Der Vorteil dieses Systems liegt vor allem darin, dass räumliches Lernen in einer stressfreien Umgebung getestet werden kann; insbesondere der übliche *Morris Water Maze* Test bringt nämlich eine deutliche Belastung der Tiere mit sich.

Bei unseren ersten Untersuchungen fanden die kd Tiere beider Geschlechter entgegen der Hypothese nominell, aber nicht signifikant, mehr Pellets. Allerdings war auch die Fehlerquote der kd Tiere, bei den Weibchen sogar vor allem im Arbeitsgedächtnis signifikant, höher. Dies konnte nicht etwa alleine durch eine vermehrte Aktivität erklärt werden, da sich die Gesamtanzahl der Besuche von Löchern nicht signifikant zwischen beiden Gruppen unterschied. Auch in den Langzeitversuchen nach 3 und 7 Tagen Pause zeigten die kd Mäuse ein Defizit im Arbeitsgedächtnis, hier besonders deutlich bei den männlichen Tieren im Langzeitversuch 1, welches ebenfalls nicht durch allgemeines vermehrtes Besuchen von Löchern zu erklären war. Die Ergebnisse für den Fehler im Referenzgedächtnis wiesen jedoch nicht auf ein Defizit der kd Mäuse in diesem Bereich hin.

Wenngleich die erhaltenen Daten nicht vollständig konsistent sind, was vermutlich unter anderem auf die geringe Anzahl an Versuchstieren und die noch nicht optimal standardisierten Versuchsbedingungen zurückzuführen ist, so zeigten sich zumindest Hinweise auf eine kognitive Beeinträchtigung vor allem des Arbeitsgedächtnisses. Beim ADHS des Menschen werden auch besonders in der Aufnahme und Verarbeitung von

Informationen Defizite gesehen und somit auch im Arbeitsgedächtnis (168). Somit ist zumindest nicht ausgeschlossen, dass die *Nos1* kd Maus zumindest als ein Tiermodell für den vorwiegend unaufmerksamen Typus der ADHS dienen könnte. Schon länger gibt es entsprechend den Ansatz ADHS in Endophänotypen zu unterteilen. Hier schlagen zum Beispiel Castellanos und Tannock aus neurobiologischer Sicht drei Endophänotypen vor, bei denen als führendes neuropsychologisches Merkmal entweder Anomalien im Belohnungssystem, Defizite bei der zeitlichen Verarbeitung oder Störungen des Arbeitsgedächtnisses dienen könnten (169).

Befunde aus humangenetischen Studien geben Hinweise darauf, dass es sich bei ADHS um eine Störung mit hoher genetischer Heritabilität handelt, trotzdem wurden bisher aber keine klaren Risikogene gefunden bzw. konnten mögliche Kandidatengene häufig nicht repliziert werden. Dies dürfte einerseits die große Zahl der beteiligten Gene widerspiegeln (Locus-Heterogenität), andererseits die Variabilität der einzelnen Studien hinsichtlich der Phänotypdefinition, Stichprobengröße und Art der verwendeten genetischen Marker. Bezüglich des ADHS gibt es positive Assoziationsbefunde genetischer Polymorphismen in verschiedenen Genen des dopaminergen Systems wie DAT1, DRD1, DRD4, DRD5, COMT, MAO-B und des serotonergen Systems wie TPH1, TPH2 und 5-HTT (170). In unserer Arbeitsgruppe wurden darüber hinaus noch CDH13 und DIRAS2 als Risikogene beschrieben (171,172). Bezüglich der Assoziation von ADHS mit Polymorphismen im nitrinergen System gibt es eine Untersuchung, die zeigte, dass ein funktioneller Promotor-Polymorphismus von *NOS1* mit impulsiven Verhaltensweisen assoziiert ist. Die kurze Variante dieses Dinucleotid-Repeats kommt gehäuft bei Personen mit adultem ADHS und Cluster-B-Persönlichkeitsstörungen vor (98). Kognitive Defizite betreffend gibt es eine Studie, welche einen Einfluss eines *NOS1* Einzelbasenpolymorphismus (rs6490121) auf die Kognition untersuchte. Es zeigte sich, dass die homozygoten Träger dieses auch mit Schizophrenie assoziierten Risikoallels im Bereich des verbalen IQ und des Arbeitsgedächtnisses schlechter abschnitten als die Vergleichsgruppen (173). In einer früheren Untersuchung wurde bereits eine Assoziation eines *NOS1* Exon-1c-Promotorpolymorphismus mit Schizophrenie und Veränderungen der präfrontalen Hirnfunktion gefunden (6). NOS-I

könnte also unabhängig von verschiedenen psychiatrischen Störungen eine wichtige Rolle bei verschiedenen kognitiven Funktionen spielen.

In nachfolgenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe mit einer größeren Anzahl an Tieren desselben Mausstamms unter etwas geänderten Versuchsbedingungen (sechs Versuchsdurchläufe pro Tag) zeigten sich ebenfalls Hinweise auf kognitive Defizite der *Nos1* kd Mäuse. In diesen nachfolgenden Versuchen ergaben sich jedoch signifikante Unterschiede in anderen Parametern als zuvor (52). Die kd Tiere wiesen keine kürzer werdende Latenz bis zum Finden der Pellets auf und fanden auch signifikant weniger Pellets als die Wildtypen. Somit bestätigen und ergänzen diese Ergebnisse den Befund eines kognitiven Defizits bei den *Nos1* kd Mäusen.

Insgesamt erscheinen die vorliegenden Ergebnisse bei den Weibchen von Tag zu Tag stärker differierend als bei den Männchen, was an hormonellen Schwankungen liegen könnte, welche bei den vorliegenden Untersuchungen nicht gemessen worden waren. Aus zahlreichen Untersuchungen, auch beim Menschen, gibt es Hinweise, dass sich endogene Hormonschwankungen auf die kognitive Leistungsfähigkeit, insbesondere das räumliche Gedächtnis auswirken (174,175). Allerdings zeigen neuere Arbeiten mit Mäusen keinen Einfluss endogener Östradiol-Spiegeln auf die Leistung im *Morris Water Maze* bzw. *Object Placement Test*, die insbesondere das räumliche Gedächtnis prüfen (176,177). Bei zukünftigen Untersuchungen sollte dennoch die Phase des menstruellen Zyklus bei den weiblichen Tieren beachtet werden.

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe der qRT PCR kein signifikanter Unterschied in der Expression des 5-HTT und des DAT im Hirnstamm bzw. Striatum von *Nos1* kd Mäusen im Vergleich zu Wildtypen gefunden werden. Da aber zahlreiche Befunde die enge Interaktion dieser Transmittersysteme belegen, liegt der Mechanismus der gegenseitigen Beeinflussung wohl eher auf der Protein-Protein-Ebene bzw. es liegen posttranskriptionale und/oder posttranslationale Mechanismen wie S-Nitrosylierung vor.

Die *Nos1* kd Mäuse zeigten in ihrem Verhalten eine verminderte Ängstlichkeit, aber keine veränderte motorische Aktivität. Auch ergaben sich Hinweise auf kognitive Defizite, insbesondere im Bereich des Arbeitsgedächtnisses. Nachfolgende Studien unserer Arbeitsgruppe mit demselben Mausmodell bestätigten diese Daten und lieferten ebenfalls Hinweise für kognitive Defizite. Hier sollten noch weitere Tests unter standardisierten Bedingungen mit einer größeren Anzahl an Tieren erfolgen, um diese kognitiven Defizite noch genauer zu charakterisieren. Was die den behaviouralen Phänotyp zugrunde liegenden molekularen Mechanismen angeht, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden, dass diese Verhaltensmerkmale mit der Veränderung der Expression der monoaminergen Transmittertransporter DAT und 5-HTT einhergingen. In einer nachfolgenden Microarray-Analyse unserer Arbeitsgruppe konnte allerdings gezeigt werden, dass zahlreiche Gene bei den *Nos1* kd Mäusen hochreguliert sind, insbesondere sind hier zu erwähnen GABAerge Gene und das Glucokortikoid-Rezeptor-Gen. Diese Veränderungen könnten zumindest teilweise die beobachteten Verhaltensauffälligkeiten der *Nos1* kd Mäusen erklären (52).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass sich die *Nos1* kd Maus zumindest für einen Subtypus des ADHS, nämlich den überwiegend unaufmerksamen Typus, ein Tiermodell sein könnte bzw. für einen Endophänotypen nach Castellanos et. al mit hauptsächlich Defiziten im Arbeitsgedächtnis. Sicherlich sind aber weitere Untersuchungen notwendig, um dies abschließend zu evaluieren.

1. Baranano, D. E., Ferris, C. D., & Snyder, S. H. 2001, "Atypical neural messengers", *Trends Neurosci.*, vol. 24, no. 2, pp. 99-106.
2. Snyder, S. H. & Ferris, C. D. 2000, "Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance", *Am.J.Psychiatry*, vol. 157, no. 11, pp. 1738-1751.
3. Furchgott, R. F. a. Z. J. V. 1980, "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.", *Nature*, vol. 288, pp. 373-376.
4. Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., & Chaudhuri, G. 1987, "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 84, no. 24, pp. 9265-9269.
5. Dawson, V. L., Kizushi, V. M., Huang, P. L., Snyder, S. H., & Dawson, T. M. 1996, "Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice", *J.Neurosci.*, vol. 16, no. 8, pp. 2479-2487.
6. Reif, A., Herterich, S., Strobel, A., Ehlis, A. C., Saur, D., Jacob, C. P., Wienker, T., Topner, T., Fritzen, S., Walter, U., Schmitt, A., Fallgatter, A. J., & Lesch, K. P. 2006, "A neuronal nitric oxide synthase (NOS-I) haplotype associated with schizophrenia modifies prefrontal cortex function", *Mol.Psychiatry*, vol. 11, no. 3, pp. 286-300.
7. Reif, A., Strobel, A., Jacob, C. P., Herterich, S., Freitag, C. M., Topner, T., Mossner, R., Fritzen, S., Schmitt, A., & Lesch, K. P. 2006, "A NOS-III haplotype that includes functional polymorphisms is associated with bipolar disorder", *Int.J.Neuropsychopharmacol.*, vol. 9, no. 1, pp. 13-20.
8. Bernstein, H. G., Stanarius, A., Baumann, B., Henning, H., Krell, D., Danos, P., Falkai, P., & Bogerts, B. 1998, "Nitric oxide synthase-containing neurons in the human hypothalamus: reduced number of immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of depressive patients and schizophrenics", *Neuroscience*, vol. 83, no. 3, pp. 867-875.
9. Bredt, D. S. & Snyder, S. H. 1992, "Nitric oxide, a novel neuronal messenger", *Neuron*, vol. 8, no. 1, pp. 3-11.
10. Hevel, J. M., White, K. A., & Marletta, M. A. 1991, "Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein", *J.Biol.Chem.*, vol. 266, no. 34, pp. 22789-22791.
11. Forstermann, U., Schmidt, H. H., Pollock, J. S., Sheng, H., Mitchell, J. A., Warner, T. D., Nakane, M., & Murad, F. 1991, "Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types", *Biochem.Pharmacol.*, vol. 42, no. 10, pp. 1849-1857.

12. Bredt, D. S., Glatt, C. E., Hwang, P. M., Fotuhi, M., Dawson, T. M., & Snyder, S. H. 1991, "Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase", *Neuron*, vol. 7, no. 4, pp. 615-624.
13. Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M. F., Froehner, S. C., & Bredt, D. S. 1996, "Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains", *Cell*, vol. 84, no. 5, pp. 757-767.
14. Jaffrey, S. R. & Snyder, S. H. 1996, "PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase", *Science*, vol. 274, no. 5288, pp. 774-777.
15. Rodriguez-Crespo, I., Straub, W., Gavilanes, F., & Ortiz de Montellano, P. R. 1998, "Binding of dynein light chain (PIN) to neuronal nitric oxide synthase in the absence of inhibition", *Arch.Biochem.Biophys.*, vol. 359, no. 2, pp. 297-304.
16. McCauley, S. D., Gilchrist, M., & Befus, A. D. 2007, "Regulation and function of the protein inhibitor of nitric oxide synthase (PIN)/dynein light chain 8 (LC8) in a human mast cell line", *Life Sci.*, vol. 80, no. 10, pp. 959-964.
17. Lajoix, A. D., Badiou, S., Peraldi-Roux, S., Chardes, T., Dietz, S., Aknin, C., Tribillac, F., Petit, P., & Gross, R. 2006, "Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN) is a new regulator of glucose-induced insulin secretion", *Diabetes*, vol. 55, no. 12, pp. 3279-3288.
18. Xia, Y., Berlowitz, C. O., & Zweier, J. L. 2006, "PIN inhibits nitric oxide and superoxide production from purified neuronal nitric oxide synthase", *Biochim.Biophys.Acta*, vol. 1760, no. 9, pp. 1445-1449.
19. Fang, M., Jaffrey, S. R., Sawa, A., Ye, K., Luo, X., & Snyder, S. H. 2000, "Dexras1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON", *Neuron*, vol. 28, no. 1, pp. 183-193.
20. Xu, B., Wratten, N., Charych, E. I., Buyske, S., Firestein, B. L., & Brzustowicz, L. M. 2005, "Increased expression in dorsolateral prefrontal cortex of CAPON in schizophrenia and bipolar disorder", *PLoS.Med.*, vol. 2, no. 10, p. e263.
21. Brzustowicz, L. M., Simone, J., Mohseni, P., Hayter, J. E., Hodgkinson, K. A., Chow, E. W., & Bassett, A. S. 2004, "Linkage disequilibrium mapping of schizophrenia susceptibility to the CAPON region of chromosome 1q22", *Am.J.Hum.Genet.*, vol. 74, no. 5, pp. 1057-1063.
22. Mungrue, I. N., Bredt, D. S., Stewart, D. J., & Husain, M. 2003, "From molecules to mammals: what's NOS got to do with it?", *Acta Physiol Scand.*, vol. 179, no. 2, pp. 123-135.
23. Schmidt, H. H. 1994, "[NO, endogenous messenger and cell poison]", *Med.Monatsschr.Pharm.*, vol. 17, no. 6, pp. 168-185.

24. Feron, O., Saldana, F., Michel, J. B., & Michel, T. 1998, "The endothelial nitric-oxide synthase-caveolin regulatory cycle", *J.Biol.Chem.*, vol. 273, no. 6, pp. 3125-3128.
25. Oess, S., Icking, A., Fulton, D., Govers, R., & Muller-Esterl, W. 2006, "Subcellular targeting and trafficking of nitric oxide synthases", *Biochem.J.*, vol. 396, no. 3, pp. 401-409.
26. Mayer, B. & Werner, E. R. 1995, "In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide", *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, vol. 351, no. 5, pp. 453-463.
27. McMillan, K., Salerno, J. C., & Masters, B. S. 1996, "Nitric oxide synthases: analogies to cytochrome P450 monooxygenases and characterization of recombinant rat neuronal nitric oxide synthase hemoprotein", *Methods Enzymol.*, vol. 268, pp. 460-472.
28. Schmidt, H. H., Hofmann, H., Schindler, U., Shutenko, Z. S., Cunningham, D. D., & Feelisch, M. 1996, "No .NO from NO synthase", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 93, no. 25, pp. 14492-14497.
29. Rusche, K. M., Spiering, M. M., & Marletta, M. A. 1998, "Reactions catalyzed by tetrahydrobiopterin-free nitric oxide synthase", *Biochemistry*, vol. 37, no. 44, pp. 15503-15512.
30. Ishii, K., Chang, B., Kerwin, J. F., Jr., Wagenaar, F. L., Huang, Z. J., & Murad, F. 1991, "Formation of endothelium-derived relaxing factor in porcine kidney epithelial LLC-PK1 cells: an intra- and intercellular messenger for activation of soluble guanylate cyclase", *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, vol. 256, no. 1, pp. 38-43.
31. Stamler, J. S., Toone, E. J., Lipton, S. A., & Sucher, N. J. 1997, "(S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif", *Neuron*, vol. 18, no. 5, pp. 691-696.
32. Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P., & Snyder, S. H. 2001, "Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide", *Nat.Cell Biol.*, vol. 3, no. 2, pp. 193-197.
33. Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S. O., Marshall, H. E., & Stamler, J. S. 2005, "Protein S-nitrosylation: purview and parameters", *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, vol. 6, no. 2, pp. 150-166.
34. Huang, P. L., Dawson, T. M., Brecht, D. S., Snyder, S. H., & Fishman, M. C. 1993, "Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene", *Cell*, vol. 75, no. 7, pp. 1273-1286.
35. Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A., & Fishman, M. C. 1995, "Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase", *Nature*, vol. 377, no. 6546, pp. 239-242.

36. Laubach, V. E., Shesely, E. G., Smithies, O., & Sherman, P. A. 1995, "Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 92, no. 23, pp. 10688-10692.
37. Shankar, R. R., Wu, Y., Shen, H. Q., Zhu, J. S., & Baron, A. D. 2000, "Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance", *Diabetes*, vol. 49, no. 5, pp. 684-687.
38. Barouch, L. A., Harrison, R. W., Skaf, M. W., Rosas, G. O., Cappola, T. P., Kobeissi, Z. A., Hobai, I. A., Lemmon, C. A., Burnett, A. L., O'Rourke, B., Rodriguez, E. R., Huang, P. L., Lima, J. A., Berkowitz, D. E., & Hare, J. M. 2002, "Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms", *Nature*, vol. 416, no. 6878, pp. 337-339.
39. Nelson, R. J., Demas, G. E., Huang, P. L., Fishman, M. C., Dawson, V. L., Dawson, T. M., & Snyder, S. H. 1995, "Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase", *Nature*, vol. 378, no. 6555, pp. 383-386.
40. Nelson, R. J., Trainor, B. C., Chiavegatto, S., & Demas, G. E. 2006, "Pleiotropic contributions of nitric oxide to aggressive behavior", *Neurosci.Biobehav.Rev.*, vol. 30, no. 3, pp. 346-355.
41. Kriegsfeld, L. J., Eliasson, M. J., Demas, G. E., Blackshaw, S., Dawson, T. M., Nelson, R. J., & Snyder, S. H. 1999, "Nocturnal motor coordination deficits in neuronal nitric oxide synthase knock-out mice", *Neuroscience*, vol. 89, no. 2, pp. 311-315.
42. Chiavegatto, S. & Nelson, R. J. 2003, "Interaction of nitric oxide and serotonin in aggressive behavior", *Horm.Behav.*, vol. 44, no. 3, pp. 233-241.
43. Spanagel, R., Siegmund, S., Cowen, M., Schroff, K. C., Schumann, G., Fiserova, M., Sillaber, I., Wellek, S., Singer, M., & Putzke, J. 2002, "The neuronal nitric oxide synthase gene is critically involved in neurobehavioral effects of alcohol", *J.Neurosci.*, vol. 22, no. 19, pp. 8676-8683.
44. Feng, Q., Song, W., Lu, X., Hamilton, J. A., Lei, M., Peng, T., & Yee, S. P. 2002, "Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase", *Circulation*, vol. 106, no. 7, pp. 873-879.
45. Demas, G. E., Kriegsfeld, L. J., Blackshaw, S., Huang, P., Gammie, S. C., Nelson, R. J., & Snyder, S. H. 1999, "Elimination of aggressive behavior in male mice lacking endothelial nitric oxide synthase", *J.Neurosci.*, vol. 19, no. 19, p. RC30.
46. Weitzdoerfer, R., Hoeger, H., Engidawork, E., Engelmann, M., Singewald, N., Lubec, G., & Lubec, B. 2004, "Neuronal nitric oxide synthase knock-out mice show impaired cognitive performance", *Nitric.Oxide.*, vol. 10, no. 3, pp. 130-140.

47. Frisch, C., Dere, E., Silva, M. A., Godecke, A., Schrader, J., & Huston, J. P. 2000, "Superior water maze performance and increase in fear-related behavior in the endothelial nitric oxide synthase-deficient mouse together with monoamine changes in cerebellum and ventral striatum", *J.Neurosci.*, vol. 20, no. 17, pp. 6694-6700.
48. Bilbo, S. D., Hotchkiss, A. K., Chiavegatto, S., & Nelson, R. J. 2003, "Blunted stress responses in delayed type hypersensitivity in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase", *J.Neuroimmunol.*, vol. 140, no. 1-2, pp. 41-48.
49. Chiavegatto, S., Dawson, V. L., Mamounas, L. A., Koliatsos, V. E., Dawson, T. M., & Nelson, R. J. 2001, "Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 98, no. 3, pp. 1277-1281.
50. Kirchner, L., Weitzdoerfer, R., Hoeger, H., Url, A., Schmidt, P., Engelmann, M., Villar, S. R., Fountoulakis, M., Lubec, G., & Lubec, B. 2004, "Impaired cognitive performance in neuronal nitric oxide synthase knockout mice is associated with hippocampal protein derangements", *Nitric Oxide*, vol. 11, no. 4, pp. 316-330.
51. Salchner, P., Lubec, G., Engelmann, M., Orlando, G. F., Wolf, G., Sartori, S. B., Hoeger, H., & Singewald, N. 2004, "Genetic functional inactivation of neuronal nitric oxide synthase affects stress-related Fos expression in specific brain regions", *Cell Mol.Life Sci.*, vol. 61, no. 12, pp. 1498-1506.
52. Wultsch, T., Chourbaji, S., Fritzen, S., Kittel, S., Grunblatt, E., Gerlach, M., Gutknecht, L., Chizat, F., Golfier, G., Schmitt, A., Gass, P., Lesch, K. P., & Reif, A. 2007, "Behavioural and expressional phenotyping of nitric oxide synthase-I knockdown animals", *J.Neural Transm.Suppl* no. 72, pp. 69-85.
53. Dere, E., Souza Silva, M. A., Topic, B., Fiorillo, C., Li, J. S., Sadile, A. G., Frisch, C., & Huston, J. P. 2002, "Aged endothelial nitric oxide synthase knockout mice exhibit higher mortality concomitant with impaired open-field habituation and alterations in forebrain neurotransmitter levels", *Genes Brain Behav.*, vol. 1, no. 4, pp. 204-213.
54. Reif, A., Schmitt, A., Fritzen, S., Chourbaji, S., Bartsch, C., Urani, A., Wycislo, M., Mossner, R., Sommer, C., Gass, P., & Lesch, K. P. 2004, "Differential effect of endothelial nitric oxide synthase (NOS-III) on the regulation of adult neurogenesis and behaviour", *Eur.J.Neurosci.*, vol. 20, no. 4, pp. 885-895.
55. Kriegsfeld, L. J., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Nelson, R. J., & Snyder, S. H. 1997, "Aggressive behavior in male mice lacking the gene for neuronal nitric oxide synthase requires testosterone", *Brain Res.*, vol. 769, no. 1, pp. 66-70.
56. Le, R., I, Pothion, S., Mortaud, S., Chabert, C., Nicolas, L., Cherfouh, A., & Roubertoux, P. L. 2000, "Loss of aggression, after transfer onto a C57BL/6J

- background, in mice carrying a targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene", *Behav.Genet.*, vol. 30, no. 5, pp. 367-373.
57. Martinez-Lazcano, J. C., Perez-Severiano, F., Escalante, B., Ramirez-Emiliano, J., Vergara, P., Gonzalez, R. O., & Segovia, J. 2007, "Selective protection against oxidative damage in brain of mice with a targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene", *J.Neurosci.Res.*, vol. 85, no. 7, pp. 1391-1402.
  58. Gammie, S. C. & Nelson, R. J. 1999, "Maternal aggression is reduced in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice", *J.Neurosci.*, vol. 19, no. 18, pp. 8027-8035.
  59. Gammie, S. C., Huang, P. L., & Nelson, R. J. 2000, "Maternal aggression in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice", *Horm.Behav.*, vol. 38, no. 1, pp. 13-20.
  60. Gammie, S. C. & Nelson, R. J. 1999, "Maternal aggression is reduced in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice", *J.Neurosci.*, vol. 19, no. 18, pp. 8027-8035.
  61. Bird, D. C., Bujas-Bobanovic, M., Robertson, H. A., & Dursun, S. M. 2001, "Lack of phencyclidine-induced effects in mice with reduced neuronal nitric oxide synthase", *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 155, no. 3, pp. 299-309.
  62. Aricioglu, F., Paul, I. A., & Regunathan, S. 2004, "Agmatine reduces only peripheral-related behavioral signs, not the central signs, of morphine withdrawal in nNOS deficient transgenic mice", *Neurosci.Lett.*, vol. 354, no. 2, pp. 153-157.
  63. Itzhak, Y., Ali, S. F., Martin, J. L., Black, M. D., & Huang, P. L. 1998, "Resistance of neuronal nitric oxide synthase-deficient mice to cocaine-induced locomotor sensitization", *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 140, no. 3, pp. 378-386.
  64. Itzhak, Y., Martin, J. L., Black, M. D., & Huang, P. L. 1998, "The role of neuronal nitric oxide synthase in cocaine-induced conditioned place preference", *Neuroreport*, vol. 9, no. 11, pp. 2485-2488.
  65. Itzhak, Y., Gandia, C., Huang, P. L., & Ali, S. F. 1998, "Resistance of neuronal nitric oxide synthase-deficient mice to methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity", *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, vol. 284, no. 3, pp. 1040-1047.
  66. Klamer, D., Engel, J. A., & Svensson, L. 2005, "Effects of phencyclidine on acoustic startle and prepulse inhibition in neuronal nitric oxide synthase deficient mice", *Eur.Neuropsychopharmacol.*, vol. 15, no. 5, pp. 587-590.
  67. Chen, L., Majde, J. A., & Krueger, J. M. 2003, "Spontaneous sleep in mice with targeted disruptions of neuronal or inducible nitric oxide synthase genes", *Brain Res.*, vol. 973, no. 2, pp. 214-222.

68. Holscher, C., McGlinchey, L., Anwyl, R., & Rowan, M. J. 1996, "7-Nitro indazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat", *Learn.Mem.*, vol. 2, no. 6, pp. 267-278.
69. Holscher, C. & Rose, S. P. 1992, "An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick", *Neurosci.Lett.*, vol. 145, no. 2, pp. 165-167.
70. Rickard, N. S. & Gibbs, M. E. 2003, "Hemispheric dissociation of the involvement of NOS isoforms in memory for discriminated avoidance in the chick", *Learn.Mem.*, vol. 10, no. 5, pp. 314-318.
71. Haley, J. E., Wilcox, G. L., & Chapman, P. F. 1992, "The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation", *Neuron*, vol. 8, no. 2, pp. 211-216.
72. Huerta, C., Sanchez-Ferrero, E., Coto, E., Blazquez, M., Ribacoba, R., Guisasola, L. M., Salvador, C., & Alvarez, V. 2007, "No association between Parkinson's disease and three polymorphisms in the eNOS, nNOS, and iNOS genes", *Neurosci.Lett.*, vol. 413, no. 3, pp. 202-205.
73. Levecque, C., Elbaz, A., Clavel, J., Richard, F., Vidal, J. S., Amouyel, P., Tzourio, C., Alperovitch, A., & Chartier-Harlin, M. C. 2003, "Association between Parkinson's disease and polymorphisms in the nNOS and iNOS genes in a community-based case-control study", *Hum.Mol.Genet.*, vol. 12, no. 1, pp. 79-86.
74. Kuiper, M. A., Teerlink, T., Visser, J. J., Bergmans, P. L., Scheltens, P., & Wolters, E. C. 2000, "L-glutamate, L-arginine and L-citrulline levels in cerebrospinal fluid of Parkinson's disease, multiple system atrophy, and Alzheimer's disease patients", *J.Neural Transm.*, vol. 107, no. 2, pp. 183-189.
75. Heales, S. J., Bolanos, J. P., Stewart, V. C., Brookes, P. S., Land, J. M., & Clark, J. B. 1999, "Nitric oxide, mitochondria and neurological disease", *Biochim.Biophys.Acta*, vol. 1410, no. 2, pp. 215-228.
76. Bennett, B. M., Reynolds, J. N., Prusky, G. T., Douglas, R. M., Sutherland, R. J., & Thatcher, G. R. 2007, "Cognitive deficits in rats after forebrain cholinergic depletion are reversed by a novel NO mimetic nitrate ester", *Neuropsychopharmacology*, vol. 32, no. 3, pp. 505-513.
77. Anderson, K. L. & Itzhak, Y. 2003, "Inhibition of neuronal nitric oxide synthase suppresses the maintenance but not the induction of psychomotor sensitization to MDMA ('Ecstasy') and p-chloroamphetamine in mice", *Nitric.Oxide.*, vol. 9, no. 1, pp. 24-32.
78. Choi, D. W. 1988, "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system", *Neuron*, vol. 1, no. 8, pp. 623-634.
79. Buisson, A., Plotkine, M., & Boulu, R. G. 1992, "The neuroprotective effect of a nitric oxide inhibitor in a rat model of focal cerebral ischaemia", *Br.J.Pharmacol.*, vol. 106, no. 4, pp. 766-767.

80. Keilhoff, G., Bernstein, H. G., Becker, A., Grecksch, G., & Wolf, G. 2004, "Increased neurogenesis in a rat ketamine model of schizophrenia", *Biol.Psychiatry*, vol. 56, no. 5, pp. 317-322.
81. Keilhoff, G., Becker, A., Grecksch, G., Wolf, G., & Bernstein, H. G. 2004, "Repeated application of ketamine to rats induces changes in the hippocampal expression of parvalbumin, neuronal nitric oxide synthase and cFOS similar to those found in human schizophrenia", *Neuroscience*, vol. 126, no. 3, pp. 591-598.
82. Fatemi, S. H., Cuadra, A. E., El Fakahany, E. E., Sidwell, R. W., & Thuras, P. 2000, "Prenatal viral infection causes alterations in nNOS expression in developing mouse brains", *Neuroreport*, vol. 11, no. 7, pp. 1493-1496.
83. Bernstein, H. G., Grecksch, G., Becker, A., Holtt, V., & Bogerts, B. 1999, "Cellular changes in rat brain areas associated with neonatal hippocampal damage", *Neuroreport*, vol. 10, no. 11, pp. 2307-2311.
84. Jakob, H. & Beckmann, H. 1994, "Circumscribed malformation and nerve cell alterations in the entorhinal cortex of schizophrenics. Pathogenetic and clinical aspects", *J.Neural Transm.Gen.Sect.*, vol. 98, no. 2, pp. 83-106.
85. Bujas-Bobanovic, M., Bird, D. C., Robertson, H. A., & Dursun, S. M. 2000, "Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor", *Br.J.Pharmacol.*, vol. 130, no. 5, pp. 1005-1012.
86. Ramirez, J., Garnica, R., Boll, M. C., Montes, S., & Rios, C. 2004, "Low concentration of nitrite and nitrate in the cerebrospinal fluid from schizophrenic patients: a pilot study", *Schizophr.Res.*, vol. 68, no. 2-3, pp. 357-361.
87. Taneli, F., Pirildar, S., Akdeniz, F., Uyanik, B. S., & Ari, Z. 2004, "Serum nitric oxide metabolite levels and the effect of antipsychotic therapy in schizophrenia", *Arch.Med.Res.*, vol. 35, no. 5, pp. 401-405.
88. Bernstein, H. G., Bogerts, B., & Keilhoff, G. 2005, "The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review", *Schizophr.Res.*, vol. 78, no. 1, pp. 69-86.
89. Yu, Y. W., Chen, T. J., Wang, Y. C., Liou, Y. J., Hong, C. J., & Tsai, S. J. 2003, "Association analysis for neuronal nitric oxide synthase gene polymorphism with major depression and fluoxetine response", *Neuropsychobiology*, vol. 47, no. 3, pp. 137-140.
90. Selley, M. L. 2004, "Increased (E)-4-hydroxy-2-nonenal and asymmetric dimethylarginine concentrations and decreased nitric oxide concentrations in the plasma of patients with major depression", *J.Affect.Disord.*, vol. 80, no. 2-3, pp. 249-256.
91. Bernstein, H. G., Heinemann, A., Krell, D., Dobrowolny, H., Bielau, H., Keilhoff, G., & Bogerts, B. 2005, "Hypothalamic nitric oxide synthase in

- affective disorder: focus on the suprachiasmatic nucleus", *Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand)*, vol. 51, no. 3, pp. 279-284.
92. Jefferys, D. & Funder, J. 1996, "Nitric oxide modulates retention of immobility in the forced swimming test in rats", *Eur.J.Pharmacol.*, vol. 295, no. 2-3, pp. 131-135.
  93. Yildiz, F., Erden, B. F., Ulak, G., Utkan, T., & Gacar, N. 2000, "Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats", *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 149, no. 1, pp. 41-44.
  94. Naylor, G. J., Smith, A. H., & Connelly, P. 1987, "A controlled trial of methylene blue in severe depressive illness", *Biol.Psychiatry*, vol. 22, no. 5, pp. 657-659.
  95. Harkin, A., Connor, T. J., Burns, M. P., & Kelly, J. P. 2004, "Nitric oxide synthase inhibitors augment the effects of serotonin re-uptake inhibitors in the forced swimming test", *European Neuropsychopharmacology*, vol. 14, no. 4, pp. 274-281.
  96. Pall, M. L. 2007, "Nitric oxide synthase partial uncoupling as a key switching mechanism for the NO", *Med.Hypotheses*, vol. 69, no. 4, pp. 821-825.
  97. Selek, S., Savas, H. A., Gergerlioglu, H. S., Bulut, M., & Yilmaz, H. R. 2008, "Oxidative imbalance in adult attention deficit/hyperactivity disorder", *Biol.Psychol.*, vol. 79, no. 2, pp. 256-259.
  98. Reif, A., Jacob, C. P., Rujescu, D., Herterich, S., Lang, S., Gutknecht, L., Baehne, C. G., Strobel, A., Freitag, C. M., Giegling, I., Romanos, M., Hartmann, A., Rosler, M., Renner, T. J., Fallgatter, A. J., Retz, W., Ehlis, A. C., & Lesch, K. P. 2009, "Influence of functional variant of neuronal nitric oxide synthase on impulsive behaviors in humans", *Arch.Gen.Psychiatry*, vol. 66, no. 1, pp. 41-50.
  99. Grammatikopoulos, G., Pignatelli, M., D'Amico, F., Fiorillo, C., Fresiello, A., & Sadile, A. G. 2002, "Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthesis reduces hyperactivity and increases non-selective attention in the Naples High-Excitability rat", *Behav.Brain Res.*, vol. 130, no. 1-2, pp. 127-132.
  100. Aspide, R., Gironi Carnevale, U. A., Sergeant, J. A., & Sadile, A. G. 1998, "Non-selective attention and nitric oxide in putative animal models of Attention-Deficit Hyperactivity Disorder", *Behav.Brain Res.*, vol. 95, no. 1, pp. 123-133.
  101. Pall, M. L. & Bedient, S. A. 2007, "The NO", *Int.Tinnitus.J.*, vol. 13, no. 2, pp. 99-104.
  102. Oosthuizen, F., Wegener, G., & Harvey, B. H. 2005, "Nitric oxide as inflammatory mediator in post-traumatic stress disorder (PTSD): evidence from an animal model", *Neuropsychiatr.Dis.Treat.*, vol. 1, no. 2, pp. 109-123.

103. Musicki, B. & Burnett, A. L. 2006, "eNOS function and dysfunction in the penis", *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*, vol. 231, no. 2, pp. 154-165.
104. Vanderwinden, J. M., Mailleux, P., Schiffmann, S. N., Vanderhaeghen, J. J., & De Laet, M. H. 1992, "Nitric oxide synthase activity in infantile hypertrophic pyloric stenosis", *N.Engl.J.Med.*, vol. 327, no. 8, pp. 511-515.
105. Persson, K., Igawa, Y., Mattiasson, A., & Andersson, K. E. 1992, "Effects of inhibition of the L-arginine/nitric oxide pathway in the rat lower urinary tract in vivo and in vitro", *Br.J.Pharmacol.*, vol. 107, no. 1, pp. 178-184.
106. Persson, K., Igawa, Y., Mattiasson, A., & Andersson, K. E. 1992, "Inhibition of the arginine/nitric oxide pathway causes bladder hyperactivity in the rat", *Acta Physiol Scand.*, vol. 144, no. 1, pp. 107-108.
107. Andersson, K. E. & Alm, P. Neurogenic nitric oxide and the lower urinary tract. Nitric Oxide and the Peripheral Nervous System , 77-97. 2000.
108. Schmidt, H. H. & Walter, U. 1994, "NO at work", *Cell*, vol. 78, no. 6, pp. 919-925.
109. Guzik, T. J., Korbout, R., & Adamek-Guzik, T. 2003, "Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation", *J.Physiol Pharmacol.*, vol. 54, no. 4, pp. 469-487.
110. Duygulu, F., Evereklioglu, C., Calis, M., Borlu, M., Cekmen, M., & Ascioğlu, O. 2005, "Synovial nitric oxide concentrations are increased and correlated with serum levels in patients with active Behcet's disease: a pilot study", *Clin.Rheumatol.*, vol. 24, no. 4, pp. 324-330.
111. Djordjevic, V. B., Stankovic, T., Cosic, V., Zvezdanovic, L., Kamenov, B., Tasic-Dimov, D., & Stojanovic, I. 2004, "Immune system-mediated endothelial damage is associated with NO and antioxidant system disorders", *Clin.Chem.Lab Med.*, vol. 42, no. 10, pp. 1117-1121.
112. Lancaster, J. R., Jr. & Xie, K. 2006, "Tumors face NO problems?", *Cancer Res.*, vol. 66, no. 13, pp. 6459-6462.
113. Danson, E. J., Choate, J. K., & Paterson, D. J. 2005, "Cardiac nitric oxide: emerging role for nNOS in regulating physiological function", *Pharmacol.Ther.*, vol. 106, no. 1, pp. 57-74.
114. Kuhlencordt, P. J., Hotten, S., Schodel, J., Rutzel, S., Hu, K., Widder, J., Marx, A., Huang, P. L., & Ertl, G. 2006, "Atheroprotective effects of neuronal nitric oxide synthase in apolipoprotein e knockout mice", *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, vol. 26, no. 7, pp. 1539-1544.

115. Ignarro, L. J. 1989, "Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein", *Circ.Res.*, vol. 65, no. 1, pp. 1-21.
116. Radomski, M. W., Palmer, R. M., & Moncada, S. 1987, "Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium", *Lancet*, vol. 2, no. 8567, pp. 1057-1058.
117. Radomski, M. W., Palmer, R. M., & Moncada, S. 1990, "Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets", *Br.J.Pharmacol.*, vol. 101, no. 2, pp. 325-328.
118. Queen, L. R., Ji, Y., Xu, B., Young, L., Yao, K., Wyatt, A. W., Rowlands, D. J., Siow, R. C., Mann, G. E., & Ferro, A. 2006, "Mechanisms underlying beta2-adrenoceptor-mediated nitric oxide generation by human umbilical vein endothelial cells", *J.Physiol*, vol. 576, no. Pt 2, pp. 585-594.
119. Queen, L. R. & Ferro, A. 2006, "Beta-adrenergic receptors and nitric oxide generation in the cardiovascular system", *Cell Mol.Life Sci.*, vol. 63, no. 9, pp. 1070-1083.
120. Hingorani, A. D., Liang, C. F., Fatibene, J., Lyon, A., Monteith, S., Parsons, A., Haydock, S., Hopper, R. V., Stephens, N. G., O'Shaughnessy, K. M., & Brown, M. J. 1999, "A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK", *Circulation*, vol. 100, no. 14, pp. 1515-1520.
121. Miyamoto, Y., Saito, Y., Kajiyama, N., Yoshimura, M., Shimasaki, Y., Nakayama, M., Kamitani, S., Harada, M., Ishikawa, M., Kuwahara, K., Ogawa, E., Hamanaka, I., Takahashi, N., Kaneshige, T., Teraoka, H., Akamizu, T., Azuma, N., Yoshimasa, Y., Yoshimasa, T., Itoh, H., Masuda, I., Yasue, H., & Nakao, K. 1998, "Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension", *Hypertension*, vol. 32, no. 1, pp. 3-8.
122. Moncada, S. & Higgs, A. 1993, "The L-arginine-nitric oxide pathway", *N.Engl.J.Med.*, vol. 329, no. 27, pp. 2002-2012.
123. Shimasaki, Y., Yasue, H., Yoshimura, M., Nakayama, M., Kugiyama, K., Ogawa, H., Harada, E., Masuda, T., Koyama, W., Saito, Y., Miyamoto, Y., Ogawa, Y., & Nakao, K. 1998, "Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with myocardial infarction", *J.Am.Coll.Cardiol.*, vol. 31, no. 7, pp. 1506-1510.
124. Pinto, V. L., Brunini, T. M., Ferraz, M. R., Okinga, A., & Mendes-Ribeiro, A. C. 2008, "Depression and cardiovascular disease: role of nitric oxid", *Cardiovasc.Hematol.Agents Med.Chem.*, vol. 6, no. 2, pp. 142-149.
125. Chrapko, W. E., Jurasz, P., Radomski, M. W., Lara, N., Archer, S. L., & Le Melledo, J. M. 2004, "Decreased platelet nitric oxide synthase activity and

- plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder", *Biol.Psychiatry*, vol. 56, no. 2, pp. 129-134.
126. Kone, B. C. & Baylis, C. 1997, "Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney", *Am.J.Physiol*, vol. 272, no. 5 Pt 2, p. F561-F578.
  127. Grasemann, H. & Ratjen, F. 2002, "[Pulmonary metabolism of nitric oxide (NO) in patients with cystic fibrosis]", *Pneumologie*, vol. 56, no. 6, pp. 376-381.
  128. Kahn, N. N., Acharya, K., Bhattacharya, S., Acharya, R., Mazumder, S., Bauman, W. A., & Sinha, A. K. 2000, "Nitric oxide: the "second messenger" of insulin", *IUBMB.Life*, vol. 49, no. 5, pp. 441-450.
  129. Nakagawa, T., Sato, W., Glushakova, O., Heinig, M., Clarke, T., Campbell-Thompson, M., Yuzawa, Y., Atkinson, M. A., Johnson, R. J., & Croker, B. 2007, "Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy", *J.Am.Soc.Nephrol.*, vol. 18, no. 2, pp. 539-550.
  130. Zanchi, A., Moczulski, D. K., Hanna, L. S., Wantman, M., Warram, J. H., & Krolewski, A. S. 2000, "Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism", *Kidney Int.*, vol. 57, no. 2, pp. 405-413.
  131. Willner, P. 1984, "The validity of animal models of depression", *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 83, no. 1, pp. 1-16.
  132. Goos, L. M., Crosbie, J., Payne, S., & Schachar, R. 2009, "Validation and Extension of the Endophenotype Model in ADHD Patterns of Inheritance in a Family Study of Inhibitory Control", *Am.J.Psychiatry*.
  133. Prescott, C. A. & Gottesman, I. I. 1993, "Genetically mediated vulnerability to schizophrenia", *Psychiatr.Clin.North Am.*, vol. 16, no. 2, pp. 245-267.
  134. McPherson, M. J., Møller, S. G., & Moller, S. 2000, *PCR BIOS*.
  135. Wilson, K. & Walker, J. M. *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology*. Cambridge University Press. 6, 449-484. 2005.
  136. Wiedemann, C., Schulz, H. L., & Weber, B. H. F. Quantitative real-time PCR - a question of normalization. *BIOspektrum* 10[1], 99-102. 2004.
  137. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. 2002, "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes", *Genome Biol.*, vol. 3, no. 7, p. RESEARCH0034.1-research0034.11.
  138. Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. 1985, "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat", *J.Neurosci.Methods*, vol. 14, no. 3, pp. 149-167.

139. Heim, C., Pardowitz, I., Sieklucka, M., Kolasiewicz, W., Sontag, T., & Sontag, K. H. 2000, "The analysis system COGITAT for the study of cognitive deficiencies in rodents", *Behav.Res.Methods Instrum.Comput.*, vol. 32, no. 1, pp. 140-156.
140. Forestiero, D., Manfrim, C. M., Guimaraes, F. S., & de Oliveira, R. M. 2006, "Anxiolytic-like effects induced by nitric oxide synthase inhibitors microinjected into the medial amygdala of rats", *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 184, no. 2, pp. 166-172.
141. Nakashima, M. N., Ajiki, K., Nakashima, K., & Takahashi, M. 2003, "Possible role of nitric oxide in anxiety following transient cerebral ischemia in mice", *J.Pharmacol.Sci.*, vol. 91, no. 1, pp. 47-52.
142. Kuiper, M. A., Teerlink, T., Visser, J. J., Bergmans, P. L., Scheltens, P., & Wolters, E. C. 2000, "L-glutamate, L-arginine and L-citrulline levels in cerebrospinal fluid of Parkinson's disease, multiple system atrophy, and Alzheimer's disease patients", *J.Neural Transm.*, vol. 107, no. 2, pp. 183-189.
143. Varol, T. F., Guvenir, T., Tas, G., Cakaloz, B., & Ormen, M. 2006, "Nitric oxide levels in disruptive behavioral disorder", *Neuropsychobiology*, vol. 53, no. 4, pp. 176-180.
144. Akar, F. Y., Ulak, G., Mutlu, O., Komsuoglu, F. I., Erden, F., Utkan, T., & Gacar, N. 2007, "Neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole augment the effects of antidepressants acting via serotonergic system in the forced swimming test in rats", *Behavioural Pharmacology*, vol. 18, p. S18.
145. Harkin, A., Connor, T. J., Walsh, A., St John, N., & Kelly, J. P. 2003, "Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors", *Neuropharmacology*, vol. 44, no. 5, pp. 616-623.
146. Finkel, M. S., LaghrissiThode, F., Pollock, B. G., & Rong, J. 1996, "Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor", *Psychopharmacology Bulletin*, vol. 32, no. 3, p. 447.
147. Simpson, K. L., Waterhouse, B. D., & Lin, R. C. 2003, "Differential expression of nitric oxide in serotonergic projection neurons: neurochemical identification of dorsal raphe inputs to rodent trigeminal somatosensory targets", *J.Comp Neurol.*, vol. 466, no. 4, pp. 495-512.
148. Kaehler, S. T., Singewald, N., Sinner, C., & Philippu, A. 1999, "Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus", *Brain Res.*, vol. 835, no. 2, pp. 346-349.
149. Zhu, C. B., Hewlett, W. A., Francis, S. H., Corbin, J. D., & Blakely, R. D. 2004, "Stimulation of serotonin transport by the cyclic GMP phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil", *Eur.J.Pharmacol.*, vol. 504, no. 1-2, pp. 1-6.

150. Chanrion, B., Mannoury, I. C., Bertaso, F., Lerner-Natoli, M., Freissmuth, M., Millan, M. J., Bockaert, J., & Marin, P. 2007, "Physical interaction between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, vol. 104, no. 19, pp. 8119-8124.
151. Jenner, P. 1998, "Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease", *Mov Disord.*, vol. 13 Suppl 1, pp. 24-34.
152. Yokoyama, H., Takagi, S., Watanabe, Y., Kato, H., & Araki, T. 2008, "Role of reactive nitrogen and reactive oxygen species against MPTP neurotoxicity in mice", *J.Neural Transm.*, vol. 115, no. 6, pp. 831-842.
153. Sammut, S., Bray, K. E., & West, A. R. 2007, "Dopamine D2 receptor-dependent modulation of striatal NO synthase activity", *Psychopharmacology (Berl)*, vol. 191, no. 3, pp. 793-803.
154. Solano, R. M., Menendez, J., Casarejos, M. J., Rodriguez-Navarro, J. A., Garcia, d. Y., & Mena, M. A. 2006, "Midbrain neuronal cultures from parkin mutant mice are resistant to nitric oxide-induced toxicity", *Neuropharmacology*, vol. 51, no. 2, pp. 327-340.
155. Tanda, K., Nishi, A., Matsuo, N., Nakanishi, K., Yamasaki, N., Sugimoto, T., Toyama, K., Takao, K., & Miyakawa, T. 2009, "Abnormal social behavior, hyperactivity, impaired remote spatial memory, and increased D1-mediated dopaminergic signaling in neuronal nitric oxide synthase knockout mice", *Mol.Brain*, vol. 2, no. 1, p. 19.
156. Silva, M. T., Rose, S., Hindmarsh, J. G., & Jenner, P. 2003, "Inhibition of neuronal nitric oxide synthase increases dopamine efflux from rat striatum", *J.Neural Transm.*, vol. 110, no. 4, pp. 353-362.
157. Hull, E. M. & Dominguez, J. M. 2006, "Getting his act together: roles of glutamate, nitric oxide, and dopamine in the medial preoptic area", *Brain Res.*, vol. 1126, no. 1, pp. 66-75.
158. Kiss, J. P., Zsilla, G., & Vizi, E. S. 2004, "Inhibitory effect of nitric oxide on dopamine transporters: interneuronal communication without receptors", *Neurochem.Int.*, vol. 45, no. 4, pp. 485-489.
159. Krause, K. H., Krause, J., & Trott, G. E. 1998, "[Hyperkinetic syndrome (attention deficit-/hyperactivity disorder) in adulthood]", *Nervenarzt*, vol. 69, no. 7, pp. 543-556.
160. Workman, J. L., Trainor, B. C., Finy, M. S., & Nelson, R. J. 2008, "Inhibition of neuronal nitric oxide reduces anxiety-like responses to pair housing", *Behav.Brain Res.*, vol. 187, no. 1, pp. 109-115.
161. Dacher, M. & Gauthier, M. 2008, "Involvement of NO-synthase and nicotinic receptors in learning in the honey bee", *Physiol Behav.*

162. Zou, L. B., Yamada, K., Tanaka, T., Kameyama, T., & Nabeshima, T. 1998, "Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats", *Neuropharmacology*, vol. 37, no. 3, pp. 323-330.
163. Hopper, R. A. & Garthwaite, J. 2006, "Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation", *J.Neurosci.*, vol. 26, no. 45, pp. 11513-11521.
164. Sakimura, K., Kutsuwada, T., Ito, I., Manabe, T., Takayama, C., Kushiya, E., Yagi, T., Aizawa, S., Inoue, Y., Sugiyama, H., & . 1995, "Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit", *Nature*, vol. 373, no. 6510, pp. 151-155.
165. Deupree, D. L., Turner, D. A., & Watters, C. L. 1991, "Spatial performance correlates with in vitro potentiation in young and aged Fischer 344 rats", *Brain Res.*, vol. 554, no. 1-2, pp. 1-9.
166. Limon, I. D., Diaz, A., Mendieta, L., Chamorro, G., Espinosa, B., Zenteno, E., & Guevara, J. 2009, "Amyloid-beta(25-35) impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats", *Neurosci.Res.*, vol. 63, no. 2, pp. 129-137.
167. Pitsikas, N. 2009, "The nitric oxide (NO) donor molsidomine antagonizes scopolamine and L-NAME-induced performance deficits in a spatial memory task in the rat", *Behav.Brain Res.*, vol. 200, no. 1, pp. 160-164.
168. Armstrong, C. L., Hayes, K. M., & Martin, R. 2001, "Neurocognitive problems in attention deficit disorder. Alternative concepts and evidence for impairment in inhibition of selective attention", *Ann N.Y.Acad.Sci.*, vol. 931, pp. 196-215.
169. Castellanos, F. X. & Tannock, R. 2002, "Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes", *Nat.Rev.Neurosci.*, vol. 3, no. 8, pp. 617-628.
170. Renner, T. J., Gerlach, M., Romanos, M., Herrmann, M., Reif, A., Fallgatter, A. J., & Lesch, K. P. 2008, "[Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder]", *Nervenarzt*, vol. 79, no. 7, pp. 771-781.
171. Krause, J. & Krause, K.-H. 2005, *ADHS im Erwachsenenalter*, 2. Auflage edn, Schattauer Verlag.
172. Lesch, K. P., Timmesfeld, N., Renner, T. J., Halperin, R., Roser, C., Nguyen, T. T., Craig, D. W., Romanos, J., Heine, M., Meyer, J., Freitag, C., Warnke, A., Romanos, M., Schafer, H., Walitza, S., Reif, A., Stephan, D. A., & Jacob, C. 2008, "Molecular genetics of adult ADHD: converging evidence from genome-wide association and extended pedigree linkage studies", *J.Neural Transm.*, vol. 115, no. 11, pp. 1573-1585.
173. Donohoe, G., Walters, J., Morris, D. W., Quinn, E. M., Judge, R., Norton, N., Giegling, I., Hartmann, A. M., Moller, H. J., Muglia, P., Williams, H., Moskvina, V., Peel, R., O'Donoghue, T., Owen, M. J., O'Donovan, M. C., Gill, M., Rujescu,

- D., & Corvin, A. 2009, "Influence of NOS1 on verbal intelligence and working memory in both patients with schizophrenia and healthy control subjects", *Arch.Gen.Psychiatry*, vol. 66, no. 10, pp. 1045-1054.
174. Hausmann, M., Slabbekoorn, D., Van Goozen, S. H., Cohen-Kettenis, P. T., & Gunturkun, O. 2000, "Sex hormones affect spatial abilities during the menstrual cycle", *Behav.Neurosci.*, vol. 114, no. 6, pp. 1245-1250.
175. Hampson, E. & Kimura, D. 1988, "Reciprocal effects of hormonal fluctuations on human motor and perceptual-spatial skills", *Behav.Neurosci.*, vol. 102, no. 3, pp. 456-459.
176. Spencer, J. L., Waters, E. M., Milner, T. A., & McEwen, B. S. 2008, "Estrous cycle regulates activation of hippocampal Akt, LIM kinase, and neurotrophin receptors in C57BL/6 mice", *Neuroscience*, vol. 155, no. 4, pp. 1106-1119.
177. Talboom, J. S., Williams, B. J., Baxley, E. R., West, S. G., & Bimonte-Nelson, H. A. 2008, "Higher levels of estradiol replacement correlate with better spatial memory in surgically menopausal young and middle-aged rats", *Neurobiol.Learn.Mem.*, vol. 90, no. 1, pp. 155-163.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie Würzburg (Direktor Prof. Dr. med. J. Deckert) durchgeführt.

An erster Stelle sei hier Prof. Dr. med. A. Reif für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit gedankt. Zunächst fand ich in ihm einen Betreuer, der immer ein offenes Ohr hatte und stets bei Fragen zur Verfügung stand. Schließlich wurde er vom Betreuer zum Doktorvater, stand mir aber weiterhin zeitnah bei allen aufkommenden Fragen und Problemen zur Seite. Immer wusste er meine Motivation zu stärken und die Begeisterung für die Psychiatrie im Allgemeinen und die biologische Psychiatrie im Besonderen zu wecken. Dafür bin ich überaus dankbar.

Prof. Dr. med. K.-P. Lesch sei gedankt für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis in sehr kollegialer und freundlicher Atmosphäre gearbeitet haben zu dürfen.

Prof. Dr. med. C. Sommer sei für die unproblematische Übernahme des Koreferats herzlich gedankt.

Fr. Dipl.-Biol. S. Klein betreute den expressionsanalytischen Teil dieser Arbeit und vermittelte mir nicht nur viele Grundlagen wissenschaftlichen Arbeitens, sondern stand mir auch bei der Auswertung der Daten ausdauernd und hilfreich zur Seite.

Dr. Th. Wultsch stand mir bei der Nachbearbeitung und Auswertung der Verhaltensexperimente geduldig zur Seite, für die fachkundigen und kritischen Anmerkungen bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Dr. A. Schmitt war auch immer bereit, Schwierigkeiten bei den expressionsanalytischen Experimenten zu diskutieren und Lösungsansätze vorzuschlagen, auch dafür bin ich sehr dankbar.

T. Töpner und G. Ortega arbeiteten mich mit in die benötigten Labortechniken für die expressionsanalytischen Untersuchungen ein, zeigten viel Geduld und ich bedanke mich insbesondere für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor.

Ebenso danke ich meiner Familie und Schwiegerfamilie für ihr Verständnis und die motivierenden Worte während des Fertigstellungsprozesses der vorliegenden Arbeit.

Vor allem aber danke ich meinem Mann, Achim Schneider, für seine Geduld und liebevolle Unterstützung.

## Lebenslauf vom Sarah Kittel-Schneider

### Persönliche Daten

Geboren 25.08.1981 in Hamburg  
Nationalität Deutsch  
Familienstand verheiratet

### Berufsausbildung

seit August 2008 Assistenzärztin in der Weiterbildung zur Fachärztin für Psychiatrie, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie, Universität Würzburg

### Hochschulausbildung

April und Juni 2008 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (nach neuer ÄAppO) (Note 2,0)  
Juli/August 2003 Ärztliche Vorprüfung (nach alter ÄAppO) (Note 2,66)  
Oktober 2001 – Juni 2008 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

### Promotion

Oktober 2004 bis Mai 2010 Thema der Doktorarbeit: „Behaviorale und expressionsanalytische Phänotypisierung der *Nosl*-Knockdown-Maus“, Doktorvater Prof. Dr. Andreas Reif, Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie, Universität Würzburg

### Schulische Ausbildung

2001 Abitur (Note 1,2)  
1992 – 2001 Gymnasium Unterrieden, Sindelfingen

### Fortbildungen

Mai 2009 Microarray Training, IZKF Microarray Unit, Universität Würzburg  
März 2009 Prüfarztkurs, ZKS am Universitätsklinikum Würzburg

### Sonstiges

Oktober 2002 bis Juni 2008 Kassenwärtin des SEM (Studentenverband Ethik in der Medizin), Hochschulgruppe Würzburg  
2002 bis 2008 Mitglied des Arbeitskreises „Ethik in der Diskussion“ der Katholischen Hochschulgemeinde Würzburg  
Oktober 2001 bis Juni 2008 Aktives Mitglied der segmed eG (Studentische Einkaufsgenossenschaft Medizin), Hochschulgruppe Würzburg

Würzburg, 12.05.10

---

Sarah Kittel-Schneider