

**Aus dem Lehrstuhl für molekulare Psychiatrie
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. K. P. Lesch**



**Der Einfluss einer lebenslangen Defizienz in der
Serotoninsynthese auf die neuronale Aktivierung des
Hippocampus nach Furchtkonditionierungstraining**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von

**Elisabeth Thuy
aus Landsberg am Lech**

Würzburg, November 2015

Referentenblatt

Referent

Prof. Dr. med. K. P. Lesch

Korreferent

Prof. Dr. med. Esther Asan

Dekan

Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.2016

Die Promovendin ist Zahnärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Serotonin – Ein Überblick	1
1.1.1 Entdeckung, Verteilung und Funktion	1
1.1.2 Metabolismus von 5-HT	3
1.2 Das zentrale 5-HT System	5
1.2.1 Anatomie des serotonergen neuronalen Systems	5
1.2.2 Entwicklung des zentralen serotonergen Systems	7
1.3 Die zwei Tryptophan-Hydroxylase Isoformen TPH1 und TPH2	8
1.4 Die Rolle von 5-HT bei psychiatrischen Erkrankungen	9
1.4.1 5-HT und Depression	9
1.4.2 Angstzustände und angstbezogenes Verhalten.....	10
1.4.3 Neurale Kreisläufe angstbezogenen Verhaltens.....	11
1.5 Maus Modelle zentraler Serotonindefizite	13
1.5.1 Methoden für die Erzeugung von knockout Mäusen.....	13
1.5.2 Knockout Modelle für das 5-HT System.....	14
1.6 Der Hippocampus – Ein Überblick	15
1.6.1 Anatomie und adulte Neurogenese.....	15
1.6.2 Verschaltungen, funktionelle und neuropathologische Aspekte.....	17
1.7 Ziel dieser Arbeit	18

2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Reagenzien der Immunhistochemie.....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3 Materialien der Mausezucht und der Verhaltenstests	20
2.1.4 Puffer und Lösungen.....	21
2.1.5 Chemikalien und Stoffe	22
2.1.6 Geräte und Software	23
2.2 Knockout Mäuse	23
2.2.1 Der Furchtkonditionierungstest	23
2.2.2 Genotypenverteilung der Versuchstiere.....	24
2.3 Immunhistologie	24
2.3.1 Entnahme und Präparation der Mausgehirne	24
2.3.2 Beschichtung der SuperFrost® Plus Objektträger mit Gelatine	25
2.3.3 Schneiden der Mäusegehirne	26
2.3.4 Immunhistochemie	26
2.3.5 Prinzip der Fluoreszenz	27
2.3.6 Charakteristika der Fluorophore.....	28
2.3.7 Aufbau und Funktion des Fluoreszenzmikroskops	29
2.3.8 Fluoreszenzfilter	30
2.4 Indirekte Immunofluoreszenzfärbung.....	31
2.5 Statistische Methoden.....	32

3. Ergebnisse	33
3.1 Einteilung und Volumenanalyse des dorsalen Hippocampus	33
3.2 Unveränderte PV-ir Zelldichte nach Furchtkonditionierung.....	36
3.3 Starke Erhöhung der c-Fos Zelldichte im dorsalen Hippocampus nach Furchtkonditionierung bei <i>Tph2^{-/-}</i> Tieren	38
3.4 Doppelfärbung der Parvalbumin-/c-Fos-ir Zellen der <i>Tph2</i> KO Mäuse	41
3.5 Die granuläre Färbung	43
4. Diskussion	46
4.1 Furchtkonditionierung aktiviert Neurone im dorsalen Hippocampus	46
4.2 c-Fos tritt in zweierlei Erscheinungsformen auf.....	46
4.3 Bedeutung von 5-HT für die neuronale Aktivierung des dorsalen Hippocampus	47
4.4 c-Fos Erhöhung in der Unterregion des DG bei <i>Tph2^{-/-}</i> Tieren.....	50
4.5 Beeinflussung der adulten Neurogenese durch den 5-HT Mangel ...	53
4.6 Konklusion und Aussicht	55
5. Zusammenfassung	57
6. Anhang	59
6.1 Quellenverzeichnis	59
6.2 Abkürzungsverzeichnis	69
6.3 Abbildungsverzeichnis	72
6.4 Tabellenverzeichnis.....	74
6.5 Eigenständigkeitserklärung.....	75

1. Einleitung

1.1 Serotonin – Ein Überblick

1.1.1 Entdeckung, Verteilung und Funktion

Serotonin oder 5-Hydroxytryptamin (5-HT) ist ein monoaminerges Neurotransmitter und gehört wie die Katecholamine oder Histamin zur Gruppe der biogenen Amine. 5-HT kann in den enterochromaffinen Zellen des Darms, in den Blutplättchen und im zentralen Nervensystem (ZNS) nachgewiesen werden.

1930 wurde 5-HT erstmals in enterochromaffinen Zellen des Darms als eine Muskelkontraktionen auslösende Substanz entdeckt. Sie bekam den Namen Enteramin (Erspamer and Vialli 1937). Im Jahre 1948 konnte eine vaso-konstriktorische Substanz aus dem Blut isoliert werden, daher der Trivialname Serotonin (Rapport, Green et al. 1948, Rapport, Green et al. 1948). Maurice Rapport fand 1949 heraus, dass es sich dabei um die gleiche chemische Substanz handelte. Zwei Jahre später gab Maurice Rapport dem britischen Physiologen und Forscher John Gaddum 5-HT Proben für Nachweis und Messung. Es konnte nicht nur die Existenz von 5-HT im Gehirn, sondern auch eine antagonistische Wirkung von Lysergsäurediethylamid (LSD) auf 5-HT im peripheren Gewebe nachgewiesen werden. Gaddum folgerte eine mögliche stimmungsregulierende Wirkung von 5-HT (Green 2008).

Die Hauptmenge des menschlichen 5-HT Gehaltes befindet sich außerhalb des ZNS in den enterochromaffinen Zellen des Darms und in den Neuronen des enterischen Nervensystems, wo es intestinale Motilität bedingt. Ein weiterer beträchtlicher Anteil des peripheren 5-HT Gehaltes präsentiert sich in den Thrombozyten des Blutes, diese nehmen 5-HT bei der Passage intestinaler Gefäße auf. Hierbei ist die Substanz für Vasokonstriktion und Thrombozytenaggregation der primären Hämostase zuständig. Des Weiteren ist 5-HT als Ausgangsstoff des Melatonins, ein Hormon das den zirkadianen Rhythmus bestimmt, in der Zirbeldrüse zu finden. Als Gewebshormon wurde es bis heute in diversen weiteren peripheren Strukturen und Zellen mit mannigfaltigen Funktionen nachgewiesen (Tab. 1).

Nur eine kleine Menge des gesamten menschlichen 5-HT Gehaltes präsentiert sich im ZNS. Zudem stellen serotonerge Neurone nur eine kleine Fraktion aller

Neurone im Gehirn dar. Die Zellkörper der serotonergen Zellen sind vorzugsweise in der Raphe des Mittelhirns, des *Pons* und der *Medulla oblongata* lokalisiert. Von dort aus werden viele verschiedene Unterregionen des Gehirns angesteuert, was 5-HT zu dem am weitesten verbreiteten Neurotransmitter im Gehirn macht (Dahlström and Fuxe 1964). Das zentrale 5-HT System besitzt vielgestaltige Funktionen wie z. B. Nahrungsaufnahme, Regeneration, sensorische Verarbeitung, motorische Aktivität als auch emotionale Regulierung und Wahrnehmung.

Tabelle 1: Organe und Gewebe in denen 5-HT und/oder TPH-Protein oder -mRNA nachgewiesen werden konnten

Organ/Gewebe	Zell-Typen	Biomolekül	Quelle/Nachweis
Brustdrüse	Epithelzellen	5-HT/TPH	(Matsuda, Imaoka et al. 2004)
Gehirn	Raphe-Neurone Epiphyse	5-HT/TPH 5-HT/TPH	(Weber and Horita 1965)
Auge	retinale Zellen	5-HT/TPH	(Green and Beharse 1994)
gastrointestinaler Trakt	enterochromaffine Zellen	5-HT/TPH	(Weber and Horita 1965)
Niere	renale prox. Tubuli	5-HT/TPH	(Sole, Madapallimattam et al. 1986)
hämatopoetisches System	Thrombozyten Lymphozyten Makrophagen Mastzellen	5-HT/ <i>Tph</i> -mRNA 5-HT/TPH	(Finocchiaro, Arzt et al. 1988, Champier, Claustrat et al. 1997) (Finocchiaro, Arzt et al. 1988)
Pankreas	β -Zellen (Inselzellen)	5-HT/TPH	(Barbosa, Silva et al. 1998)
Hoden	Leydigzellen	5-HT	(Frungeri, Gonzalez-Calvar et al. 1999)

1.1.2 Metabolismus von 5-HT

5-HT wird in situ aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan in zwei Schritten synthetisiert. Zunächst wird Tryptophan, nach Aufnahme in die Zellen durch den großen neutralen Aminosäuretransporter, zu 5-Hydroxytryptophan durch die Tryptophan-Hydroxylase (TPH) hydroxyliert. Das Enzym bedarf bei dieser Reaktion molekularen Sauerstoff sowie das reduzierte Pterin Tetrahydrobiopterin (BH₄). Dann wird 5-Hydroxytryptophan durch die aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase zu 5-Hydroxytryptamin decarboxyliert. Dieses Enzym ist im Organismus ubiquitär vorzufinden und ist unter anderem auch an der Katecholaminbiosynthese beteiligt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Synthesekette des 5-HT ist hierbei die Hydroxylierung des Tryptophans.

Jedoch ist die TPH bei diesem Vorgang nur zur Hälfte mit ihrem Substrat gesättigt. Das lässt vermuten, dass die Erhöhung von Tryptophan auch eine Erhöhung der 5-HT Synthese bedingt. Ebenfalls beeinflussen Sauerstoff und BH₄ die Syntheserate. 5-HT wird dann durch den vesikulären Monoamintransporter 2 (Vmat2) in intrazelluläre Speichervesikel aufgenommen. In der Präsynapse wird 5-HT nach Ankunft eines Aktionspotentials in den synaptischen Spalt ausgeschüttet und aktiviert dort Subtypen der 5-HT Rezeptorfamilie. Diese Rezeptorfamilie umfasst 14 strukturell und pharmakologisch unterschiedliche Rezeptoren, welche in sieben Gruppen (5-HT₁ bis 5-HT₇) unterteilt sind (Barnes and Sharp 1999, Millan, Marin et al. 2008). Mit Ausnahme des 5-HT₃ Rezeptors welcher ein ionotroper Rezeptor ist, sind alle 5-HT Rezeptoren metabotropische G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR_s). 5-HT Rezeptoren sind sowohl prä- als auch postsynaptisch zu finden (Millan, Marin et al. 2008).

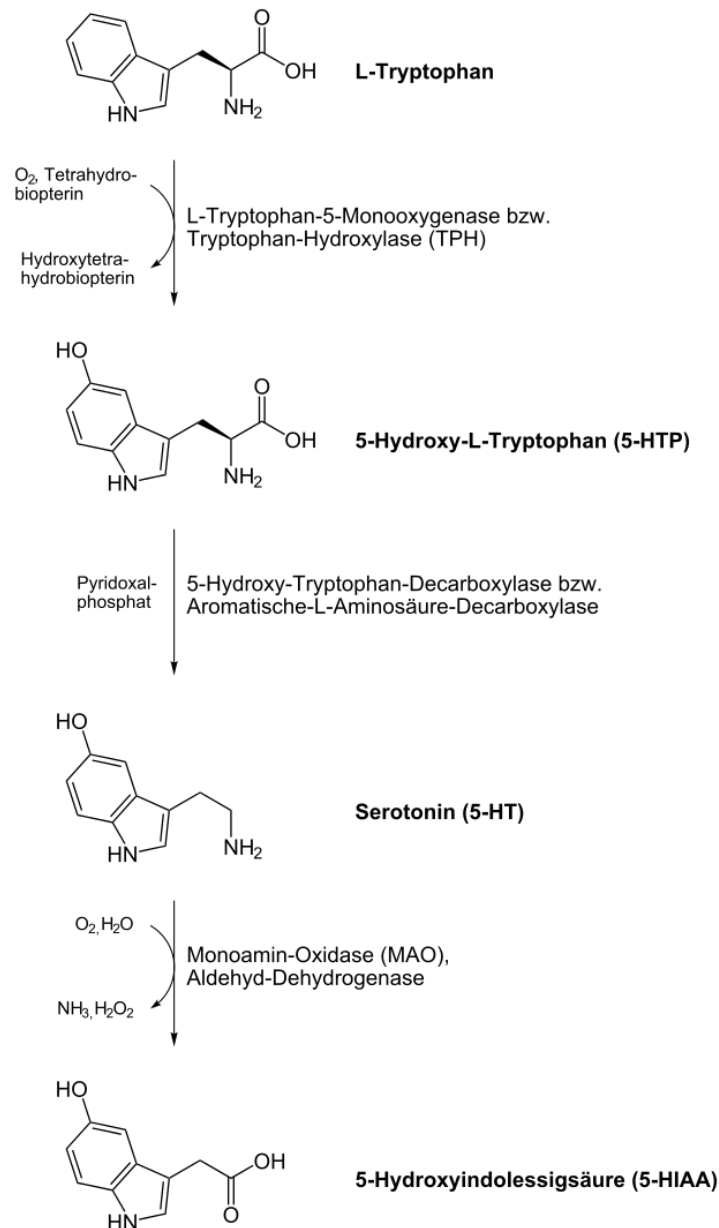


Abbildung 1: Metabolismus von 5-HT (http://de.wikipedia.org/wiki/Serotonin#media-viewer/Datei:Serotonin_Biosynthese.svg)

5-HT wird synthetisiert durch Hydroxylierung der Aminosäure Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP), katalysiert durch die Tryptophan-Hydroxylase (TPH). Das Enzym bedarf bei dieser Reaktion molekularen Sauerstoff (O_2) sowie das reduzierte Tetrahydrobiopterin. Es folgt die Decarboxylierung von 5-HTP zu 5-HT durch die aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC). 5-HT wird hauptsächlich zu 5-Hydroxyindoleessigsäure (5-HIAA) durch die Monoaminoxidase (MAO) und die Aldehyd-Dehydrogenase abgebaut.

Die Wiederaufnahme von 5-HT in die Präsynapse durch den 5-HT Transporter (5-HTT, SERT) beendet seine Wirksamkeit im synaptischen Spalt. In der Präsynapse wird 5-HT schließlich entweder in Speichervesikel aufgenommen oder abgebaut. Der Abbau von 5-HT erfolgt durch die Monoaminoxidase und die Aldehyd-Dehydrogenase zu seinem hauptsächlichen Produkt 5-Hydroxyindol-essigsäure (5-HIAA) (Abb. 1).

1.2 Das zentrale 5-HT System

1.2.1 Anatomie des serotonergen neuronalen Systems

Das serotonerge System des Säugers besteht aus verschiedenen Untersystemen. Diese sind zum einen das serotonerge enterische Nervensystem im Darm, das adrenomedulläre neuroendokrine serotonerge System, das periphere serotonerge System, was Gewebe ohne ausgesprochen starke 5-HT Innervation wie z. B. das Herz oder Blutgefäße beinhaltet und schließlich das ZNS, das am intensivsten untersuchte Untersystem (Murphy and Lesch 2008).

Retikuläre Neurone des Hirnstamms sind die phylogenetisch ältesten Nervenzellen des Gehirns und erhalten Informationen der Sinnesorgane. Die serotonergen Neurone des Säugergehirns sind hauptsächlich in der Raphe Region oder der sagittalen Mittellinie zu finden. Sie stellen nur eine kleine Fraktion der Gesamtneuronenzahl des Gehirns (ca. 300.000 der insgesamt 86 Milliarden Nervenzellen) (Baker, Halliday et al. 1991, Azevedo, Carvalho et al. 2009) dar. Die serotonergen Neurone können in zwei große Gruppen von Kernen eingeteilt werden. Zum einen die rostral gelegenen, die ins Vorderhirn projizieren, zum anderen caudal gelegene, deren Axone ins Rückenmark ziehen.

Die rostral im Stammhirn gelegene Gruppe beinhaltet vier Kerne:

1. der *caudale lineare Nucleus* (CLN; B8),
2. der *mediane raphe Nucleus* (MnR, *nucleus centralis superior*; B8, B5),
3. der *dorsale raphe Nucleus* (DR; B7, B6) und
4. Neurone der *supralemniscalen* Region (B9).

Die caudal in Pons und Medulla oblongata liegende Gruppe umfasst fünf Kerne:

1. der *Nucleus raphe obscurus* (NRO; B2),
2. der *Nucleus raphe pallidus* (NRPa; B1, B4),
3. der *Nucleus raphe magnus* (NRMa; B3),
4. Zellkörper in der *ventrolateralen Medulla*, der *laterale paragigantocelluläre Nucleus* (NPGN; B3) und die intermediären *retikulären Nuclei* (IRN; B1, B3),
5. Neurone der *Area postrema*.

Die serotonergen Neurone sind auf einer rostrocaudalen Achse in neun (B1-B9) Gruppen aufgeteilt (Dahlström and Fuxe 1964).

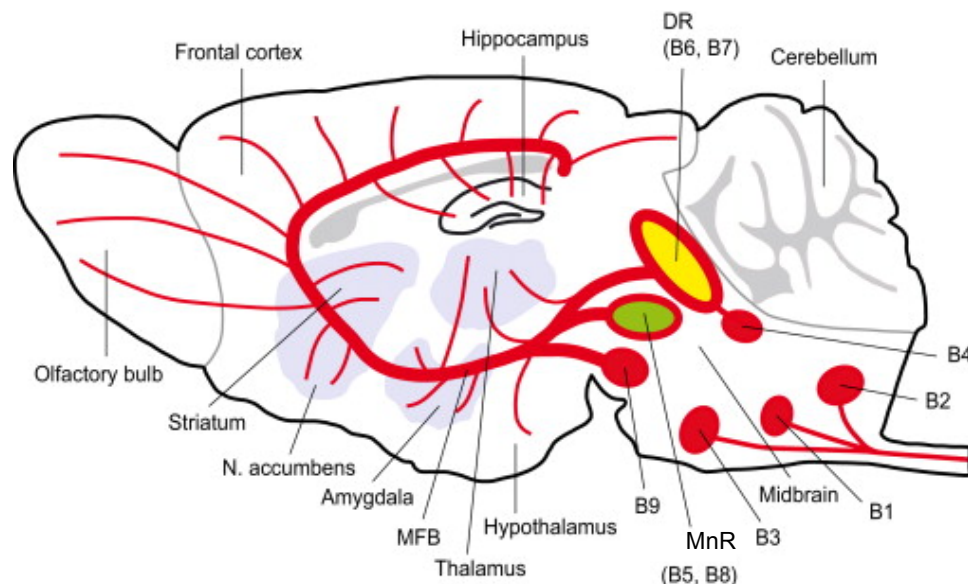


Abbildung 2: Das serotonerge System des Säugers (Lesch and Waider 2012)

Serotonerge Neurone sind im ZNS in neun Zellgruppen, benannt als B1-B9, angeordnet. Die eher caudalen Kerne projizieren hauptsächlich in das Rückenmark und in die Peripherie. Neurone der rostralen Gruppe teilen sich in den *dorsalen raphe Nucleus* (DR; B7, B6, gelb) und in den *medianen raphe Nucleus* (MnR, *nucleus centralis superior*; B8, B5, grün) auf. Sie übertragen Informationen ins Vorderhirn. DR: *dorsaler raphe Nucleus*, MFB: *medialer frontaler Faszikel*, MnR: *medianer raphe Nucleus*.

Der *dorsale raphe Nucleus* DR kann weiter unterteilt werden in einen rostralen, dorsalen (DRD), ventralen (DRV), interfaszikulären (DRI), ventrolateralen (DRVl) und caudalen (DRC) Teil (Baker, Halliday et al. 1990, Hornung 2003).

1.2.2 Entwicklung des zentralen serotonergen Systems

In der Maus entstehen zwischen dem 10. und 12. Embryonaltag die ersten Neurotransmitter synthetisierenden Neurone, die dann die Raphe Kerne bilden. Beim Primaten hingegen entstehen diese erst zwischen der 5. und 6. Gestationswoche (Levitt and Rakic 1982). Es werden schließlich zwei verschiedene Zellgruppen, eine rostrale und eine caudale, gebildet. In der frühen Entwicklungsphase, noch bevor die 5-HT Zellgruppen auftreten, ist das Hinterhirn entlang seiner antero-posterioren Achse in sieben bzw. acht Segmente (Rhombomere) aufgeteilt (Lumsden and Keynes 1989). Rhombomere (r) 1, 2 und 3 bilden den rostralen 5-HT Cluster, in der zweiten Entwicklungswelle ca. 1 - 2 Tage später, formen r5 - r8 den caudalen 5-HT Cluster. Getrennt werden sie durch r4, wo sich motorische Neurone entwickeln (Pattyn, Vallstedt et al. 2003). Die Grenze für die Entwicklung serotonerger Neurone nach rostral wird durch den Mittelhirn-Hinterhirn-Organisator (MHO) gesteuert (Kiyasova, Fernandez et al. 2011, Wurst and Bally-Cuif 2011). Alle serotonerger Neurone im ausgereiften *dorsalen raphe Nucleus* (DR; B6, B7) stammen von r1 ab, hingegen entstehen die Neurone im *medianen raphe Nucleus* (MnR; B5, B8) aus einer Mischung von Vorläuferzellen der Region r1, r2 und r3 (Abb. 3b, (Jensen, Farago et al. 2008)).

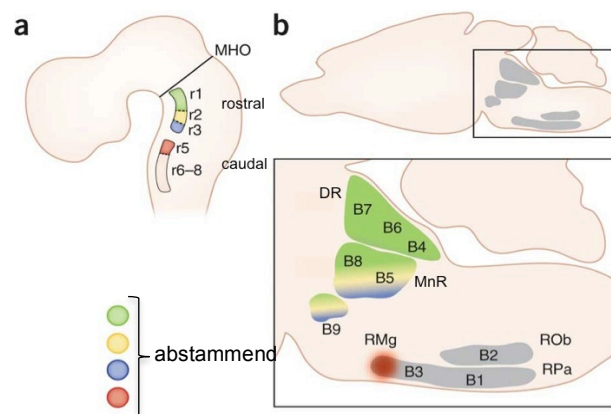


Abbildung 3: Entwicklung des zentralen serotonergen Systems (Deneris and Wyler 2012)

(a) Sagittales Schema der Hirnentwicklung. Es entstehen zwei verschiedene Zell-Cluster. Die rostrale Gruppe umfasst r1, r2 und r3, die caudale r5 bis r8. (b) Sagittale, schematische Darstellung des adulten Mittelhirns, des Pons und der Medulla. Der *dorsale raphe Nucleus* (DR; grün) wird gebildet aus r1. Die 5-HT Neurone des *medianen raphe Nucleus* (MnR; grün, gelb blau) entstehen aus r1, r2 und r3. MHO: Organisationszentrum für Mittel- und anteriores Hinterhirn, RMg: *raphe magnus*, ROb: *raphe obscurus*, RPa: *raphe pallidus*.

Spezifizierung und terminale Differenzierung der serotonergen Neurone werden durch eine Reihe von Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren bestimmt. Die Transkriptionsfaktoren lassen sich in zwei Gruppen untergliedern: Nkx2.2, Nkx6.1 und Mash1 erzeugen die 5-HT Vorläuferzellen, während Gata2, Gata3, Lmx1b und Pet1 die 5-HT Subtypenselektion und die terminale neuronale Differenzierung bedingen (Cordes 2005). Weitere wichtige Determinationsfaktoren sind der vom MHO erzeugte diffusionsfähige FGF (fibroblast growth factor) 8, FGF4 – gebildet vom Primitive Streak – sowie Sonic Hedgehog (Shh), produziert von der Bodenplatte („Floor Plate“) (Ye, Shimamura et al. 1998). Ab dem 11. Embryonaltag differenzieren sich in der Maus neurale Vorläufer der Rhombomere r1 - r7 zu serotonergen Neuronen. Dazu muss der Q50-ähnliche Transkriptionsfaktor Phox2b inhibiert werden (Alenina, Bashammakh et al. 2006). Ausnahmen sind dabei r1, aus welchem der dorsale Raphe gebildet wird und r4, welches Motoneurone anstatt serotonerge Neurone generiert. Damit aus den neuralen Vorläuferzellen serotonerge Neurone entstehen, werden verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiv. Zunächst Mash1 (Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktor) und Nkx2.2, welche in einer Kaskade Gata3 und Gata2 (GATA-Motiv-bindende Transkriptionsfaktoren) aktivieren. Diese wiederum aktivieren die für serotonerge Differenzierung notwendigen Faktoren Lmx1b (LIM-Homeobox-Transkriptionsfaktor) und Pet1 (ETS-Domänen-Transkriptionsfaktor). Dies führt zur Expression von spezifischen Genen des serotonergen Systems wie *TPH*, *AADC*, *Serotonin-Transporter (SERT)*, *vesikulärer Monoamin-Transporter (Vmat2)* und *5-HT-Rezeptoren* (Pattyn, Simplicio et al. 2004).

1.3 Die zwei Tryptophan-Hydroxylase Isoformen TPH1 und TPH2

Die Tryptophan-Hydroxylase (TPH) katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der 5-HT Synthese – die Hydroxylierung von Tryptophan (Fitzpatrick 1999). Lange Zeit wurde angenommen, dass TPH die einzige Isoform darstellt. Es konnte jedoch in *Tph* defizienten Mäusen weiterhin 5-HT im Gehirn nachgewiesen werden. Das führte zur Identifizierung einer zweiten TPH Isoform, die speziell im Gehirn exprimiert wird (Côté, Thévenot et al. 2003, Walther, Peter et al. 2003). Diese Isoform wurde TPH2 genannt und stimmt in 71% der Amino-

säuren mit der TPH1 Isoform überein (Walther and Bader 2003). TPH1 wurde somit als die periphere Isoform, hauptsächlich in Darm und in der Zirbeldrüse produziert, angenommen. Jedoch ergaben Studien uneinheitliche Ergebnisse, was die Verteilung der beiden Isoformen angeht. Beispielsweise konnte im Rattengehirn eine sehr geringe Menge von radioaktiv markierter *Tph1* m-RNA in der *dorsalen* und *medianen Raphe* nachgewiesen werden (Patel, Pontrello et al. 2004, Malek, Dardente et al. 2005). Schließlich ergab eine systematische Analyse der TPH1 und TPH2 Expression während der prä- und postnatalen Gehirnentwicklung der Maus TPH2 Expression in den *raphe nuclei*, in Fasern der Zirbeldrüse sowie im Intestinum. Hingegen konnte keine signifikante TPH1 Produktion in Mausgehirnen als auch in menschlichen adulten Gehirnen nachgewiesen werden. Das unterstreicht die Ansicht einer exklusiven Rolle von TPH2 bei der 5-HT Synthese im zentralen Nervensystem. (Gutknecht, Kriegebaum et al. 2009, Waider, Araragi et al. 2011).

1.4 Die Rolle von 5-HT bei psychiatrischen Erkrankungen

1.4.1 5-HT und Depression

Das serotonerge System beeinflusst sowohl emotionale als auch stressbezogene Reaktionen im Gehirn und ist damit an einer Vielzahl von neuropsychiatrischen Dysfunktionen bzw. Erkrankungen beteiligt wie z. B. affektive Störungen, Zwangs- und Angstzustände, Schlaf- und Essstörungen, Impulsivität, Aggression und Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS). Pharmakologische Studien bestätigen dies eindeutig, während der genetisch bedingte Anteil an diesen Fehlfunktionen kontrovers diskutiert wird (Kriegebaum, Gutknecht et al. 2012). Depression bekommt unter den genannten Krankheiten besondere Relevanz, da sie bis 2020 als die zweithäufigste Ursache für Arbeitsunfähigkeit angenommen wird (Murray and Lopez 1996). Darüber hinaus wird die Lebenszeit-Prävalenz von depressiven Schüben auf 14,6% und die 12-Monate- Prävalenz auf 5,5% geschätzt (Bromet, Andrade et al. 2011).

Bevor die Monoaminhypothese ihre Gültigkeit zugeschrieben bekam dominierte in den 1960er-Jahren, aufgrund der stimmungsaufhellenden Wirkung von Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmern, die Katecholaminhypothese (Schildkraut

1965). Bei der Monoaminhypothese wurde ein Mangel an 5-HT als auch an Noradrenalin ursächlich für depressive Erkrankungen angenommen. Die Rolle von 5-HT bei Depressionen hat sich dabei durch die selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI), die über eine Blockade des SERT wirken, weiter manifestiert. Indessen hat sich gezeigt, dass weniger die absolute Neurotransmittermenge, sondern vielmehr die Dichte und Sensitivität postsynaptischer 5-HT-Rezeptoren und Desensibilisierung präsynaptischer Autorezeptoren ursächlich sind. Die Annahme wird von der Wirklatenz antidepressiver Substanzen von 1-2 Wochen, bis der gewünschte stimmungsaufhellende Effekt eintritt, unterstrichen. 5-HT steht darüber hinaus in Wechselwirkung mit anderen Transmittersystemen im Gehirn, welche stark durch Umwelteinflüsse bestimmt werden können. Auch Stress scheint hier auf das serotonerge System zu wirken, sodass Depression letztendlich als ein multifaktorielles Ereignis von Gen x Umweltinteraktionen angesehen wird und eine eindeutige Ursache-Wirkungsbeziehung diese komplexe und heterogene Erkrankung nicht bewältigen kann (Kriegebaum, Gutknecht et al. 2012, Lesch and Waider 2012).

1.4.2 Angstzustände und angstbezogenes Verhalten

Angst kann als ein emotionaler Zustand kontinuierlich steigender vegetativer und verhaltensbezogener Erregung mit zunehmendem Vermeidungsverhalten verstanden werden (Lowry, Johnson et al. 2005). Abzugrenzen sind davon die natürliche, determinierte und auch essentiell notwendige Angst sowie Furcht. Unter Furcht kann die sofortige Reaktion auf eine Bedrohung oder gegenwärtige Gefahr verstanden werden. Sie hängt von dem Konkretum ab und flacht schnell nach dessen Wegfall ab. Im Gegensatz dazu wird Angst von weniger bestimmten sowie zu erwartenden Gefahren ausgelöst und kann als ein länger andauernder Zustand gesehen werden (Davis, Walker et al. 2010). Die hervorgerufenen Verhaltensmuster sowie die physiologischen Reaktionen sind transsituativ, d. h. nicht unbedingt mit Umweltreizen verknüpft (Maier and Watkins 2005). Angst- und Vermeidungsverhalten sind besonders charakteristisch für Situationen mit einem hohen Maß an Unsicherheit und Unberechenbarkeit. Die sogenannte Konflikt-Angst wird verbunden mit Situationen, bei de-

nen es zu einem belohnenden, aber auch möglichen negativen Ausgang kommen kann (Hale, Shekhar et al. 2012). Im Allgemeinen kann angstassoziiertes Verhalten als die Folge einer Art Risikobewertung über mögliche Situationsausgänge mit emotional bedeutendem Charakter angesehen werden.

1.4.3 Neurale Kreisläufe angstbezogenen Verhaltens

Angstzustände werden von miteinander kommunizierenden und verschalteten Vorder- und Hinterhirn-Regionen reguliert. Das angstassoziierte Verhalten in Form von Risikobewertung, Vermeidungsverhalten und Abschätzung der möglichen Konsequenzen und Ergebnisse bezieht eine Beteiligung neuraler Kreisläufe ein (Lowry, Johnson et al. 2005). Im Zuge der Angststörung kommt es häufig bei den Patienten zu depressiven Krankheitsbildern und damit zu einem siebenfach erhöhtem suizidalen Risiko im Vergleich zu gesunden Probanden. Die Vererbbarkeit der Angststörung liegt dabei nach Metaanalysen bei 48% (Hettema, Neale et al. 2001).

Unter den angstregulierenden zentralen Strukturen nimmt der Hippocampus eine vergleichende Aufgabe ein, z. B. werden tatsächliche Ergebnisse mit den erwartenden abgestimmt (Gray 1982). Der *mediale präfrontale Cortex (mPFC)* übernimmt die Verhaltenssuppression, ermittelt die Kontrollierbarkeit eines Stressfaktors und wirkt somit auf die Verhaltensantwort ein (Lacroix, Spinelli et al. 2000, Amat, Baratta et al. 2005). Der *Nucleus striae terminalis* (bed nucleus of the striae terminalis (BNST)) ist eine komplexe, heterogene limbische Struktur, die eine wichtige Aufgabe bei der Kontrolle von automatischen, neuroendokrinen und verhaltensbezogenen Aufgaben übernimmt. Zusätzlich verbindet sie limbische Vorderhirnstrukturen, Hypothalamus und Hirnstammregionen. Der anteriore Teil des Gyrus cinguli ist ebenfalls an der Entscheidungsfindung beteiligt. Er ordnet Aktionen deren Konsequenzen, die sowohl positiv als auch negativ sein können, zu (Rushworth, Walton et al. 2004). Schließlich gehört zum neuralen System angstbezogenen Verhaltens die Amygdala. Sie nimmt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle von Angstverhalten ein und ist für emotionale Bewertung, Analyse und Reproduzierbarkeit von Situationen zuständig (Lowry, Johnson et al. 2005, Hale, Shekhar et al. 2012).

Das serotonerge System spielt bei der Regulation von Angst und deren Pathogenese eine entscheidende Rolle. So konnte z. B. ein Längenpolymorphismus im MAO-A Gen mit einhergehender erhöhter funktioneller MAO-A Aktivität und daraus resultierendem schnelleren 5-HT Abbau mit Panikstörungen bei Frauen assoziiert werden (Deckert, Catalano et al. 1999). Im Zuge der Untersuchung von Angststörungen konnte eine verringerte Responsivität des 5-HT_{1A}-Rezeptors festgestellt werden (Lesch, Wiesmann et al. 1992). Im anterioren und posterioren Cingulum und in den Raphe-Nuclei wurde eine verringerte Bindung eines 5-HT_{1A}-Radioliganden bei Panikpatienten mittels PET entdeckt (Neumeister, Bain et al. 2004). Für die Behandlung dieser Patienten werden ebenfalls serotonerg wirksame Antidepressiva, ähnlich wie bei Depressionen eingesetzt. 5-HT_{1A}-KO Mäuse zeigen ein starkes Angstverhalten, eine 8-OH-DPAT (8-Hydroxy-2-di-n-propylaminotetralin) (5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonist) Injektion in die Rapheregion wirkt hierbei anxiolytisch, in den Hippocampus dagegen anxiogen (Lesch and Mossner 1999). Erhöhtes Angstverhalten könnte somit Folge verstärkter terminaler 5-HT Verfügbarkeit sein, wobei dieses auf dem Verlust des negativen Feedbacks durch Verminderung präsynaptischer 5-HT_{1A}-Autorezeptoren beruht (Parks, Robinson et al. 1998, Lesch and Mossner 1999, He, Sibille et al. 2001). Die Expression der 5-HT_{1A}-Rezeptoren am Anfang der postnatalen Entwicklung scheint somit wichtig für die Entstehung und Etablierung eines normalen Angstverhaltens zu sein (Gross, Zhuang et al. 2002).

Die Annahme eines fein verteilten, interagierenden und angstregulierenden Systems von Hirnstrukturen wurde durch Experimente mit c-Fos, einem frühen Genprodukt, untermauert. Die Induktion der c-Fos Expression spiegelt die funktionale Aktivität der Neurone im Gehirn wieder (Dragunow and Faull 1989). Immunhistochemische Färbungen von c-Fos werden üblicherweise als Nachweismethode neuraler Kreisläufe als Antwort auf spezifische Stimuli eingesetzt (Morgan and Curran 1991). Nach Exposition mit akutem Stress zeigt die *c-fos* mRNA 30 Minuten später einen spitzen Peak und fällt schließlich zwei Stunden später wieder ab (Cullinan, Herman et al. 1995). Der Anstieg der c-Fos Protein Expression läuft leicht verzögert ab und ist im besonderen Maße charakteristisch für angstassoziierte Hirnregionen zwei Stunden nach der Verabreichung

anxiogener Substanzen oder der Konfrontation mit angstauslösendem Verhalten (Silveira, Sandner et al. 1993, Singewald and Sharp 2000, Abrams, Johnson et al. 2005, Bouwknecht, Spiga et al. 2007, Hale, Shekhar et al. 2012). Messungen von c-Fos stellen somit eine hilfreiche Methode dar, Hirnregionen die durch Angststimuli aktiviert und gereizt wurden, zu identifizieren.

1.5 Maus Modelle zentraler Serotonindefizite

1.5.1 Methoden für die Erzeugung von knockout Mäusen

Konstitutive knockout (KO) Mäuse ermöglichen es, die Konsequenzen eines spezifischen Genverlustes auf den gesamten Organismus zu untersuchen und im Zuge der Entwicklung des Individuums einen physiologischen oder pathologischen Effekt zu erkennen. Konstitutive KO Mäuse werden durch Gen-Transfektion der embryonalen Stammzellen (ES) erzeugt. Nach der Integration der Zielsequenz in das Genom durch homologe Rekombination, werden die embryonalen Stammzellen in die Blastozyste eines anderen Mausstammes injiziert und in den Uterus einer Muttermaus eingepflanzt. Es werden die Chimäre, deren Keimzellen den modifizierten ES entstammen, mit einem Wildtyp (WT) gekreuzt. So können heterozygote (HET) KO Mäuse erzeugt werden, die durch weitere Verpaarung zu homozygoten KO Tieren führen. Jedoch können konstitutive KO Tiere einen letalen Phänotyp darstellen, wenn das Gen von entwicklungsbiologischer Bedeutung ist. Deshalb muss bei diesen Tieren auch die Möglichkeit der Kompensation in Betracht gezogen werden, da es mannigfaltige Funktionen eines Gens in unterschiedlichen Geweben oder Entwicklungsstadien gibt.

Im Gegensatz zum konstitutiven KO ermöglicht der konditionelle Knockout (cKO) die zeit- oder gewebsspezifische Inaktivierung eines Gens und umgeht damit die Problematik des konstitutiven KOs. Das gängigste Verfahren um cKO Tiere zu erzeugen ist das Cre-loxP System, ursprünglich im P1 Bakteriophagen entdeckt (Sternberg, Hamilton et al. 1981, Hoess, Ziese et al. 1982). Das Cre Enzym ist eine Rekombinase, die Spaltung als auch Neuverknüpfung von DNA zwischen spezifischen Basensequenzen (loxP) katalysiert. Soll nun aus der DNA eine bestimmte Sequenz heraus geschnitten werden, so muss diese zu-

erst gefloxed werden, d. h. vor und hinter die Sequenz wird die loxP Sequenz gesetzt. Es kommt zur Exzision wenn die beiden loxP Sequenzen gleichsinnig orientiert sind – zur Inversion wenn die genannten Sequenzen entgegengesetzt angeordnet sind. Mäuse, die mit loxP flankiert wurden, werden gepaart mit solchen, die Cre Rekombinase exprimieren, unter der Kontrolle eines zellspezifischen Promoters. So kann die resultierende Exzision genau in einem speziellen Gewebe oder Zelltyp durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit ist der induzierbare konditionelle KO. Dieser KO ermöglicht die Ausschaltung eines bestimmten Gens in einem bestimmten Entwicklungsstadium. Dieses Verfahren ist damit wesentlich differenzierter um eine Genfunktion und ihre Rolle bei der Pathogenese von Erkrankungen zu untersuchen. Diese Technik nutzt die ligandenabhängige Cre Rekombinase, die nur bei Vorhandensein des entsprechenden Liganden aktiv ist. Eine gängige Variante ist die Tamoxifen abhängige Rekombinase (Cre-ER^T), die an eine Liganden Bindungsstelle (LBD = ligand-binding domain) des humanen Estrogen Rezeptors bindet (Feil, Brocard et al. 1996). Cre-ER^T wird durch den synthetisch hergestellten Liganden Tamoxifen aktiviert, nicht aber durch das endogene Estradiol. Cre-ER^T liegt inaktiv im Zytoplasma vor. Wird Tamoxifen injiziert wandert Cre-ER^T in den Zellkern und schneidet dort die flankierte Zielsequenz (Metzger and Chambon 2001). Eine noch effizientere und sensitivere Tamoxifen abhängige Cre Rekombinase ist die Cre-ER^{T2} Rekombinase (Feil, Wagner et al. 1997). Die Generierung eines sowohl zeit- als auch gewebsspezifischen Knockouts kann durch die Verwendung einer ligandenabhängigen Cre Rekombinase, unter der Kontrolle eines gewebsspezifischen Promoters erfolgen.

1.5.2 Knockout Modelle für das 5-HT System

Mausmodelle mit einem zentralen 5-HT Defizit können sehr hilfreich sein Konsequenzen des Mangels zu analysieren. Ein lebenslanges Defizit kann durch gezielte Inaktivierung bestimmter für die Entwicklung der 5-HT Neurone notwendiger Transkriptionsfaktoren wie z. B. Lmx1b oder Pet-1 erreicht werden (Ding, Marklund et al. 2003, Liu, Maejima et al. 2010). Ein kompletter Knockout von Lmx1b führt zum perinatalen Tod, wohingegen solche Mäuse mit einem

lediglich zentral auftretenden Defizit überleben und keine scheinbaren entwicklungsassoziierten Beeinträchtigungen zeigen (Zhao, Scott et al. 2006). Verhaltensbezogene Konsequenzen des 5-HT Mangels werden mit Effekten wie Angst- und Furchtverhalten, aber auch erhöhter Aggressivität assoziiert.

Die natürlich auftretende Variante des 5-HT Defizits, die *Tph2* R439H knockin (KI) Maus, zeigt eine Punktmutation innerhalb des *Tph2* Gens. Das mutierte Genprodukt TPH2 führt in der Konsequenz zu einer verringerten 5-HT Synthese und einem geringeren Vorkommen im Gewebe. Diese Tiere zeigen ein erhöhtes Depressions-, Angst- und Aggressionsverhalten und können als natürliche Biomarker für 5-HT assoziierte Depression gesehen werden (Beaulieu, Zhang et al. 2008, Jacobsen, Siesser et al. 2012).

1.6 Der Hippocampus – Ein Überblick

1.6.1 Anatomie und adulte Neurogenese

Der Hippocampus zählt zu den evolutionär ältesten Hirnstrukturen, befindet sich beidseits im Temporallappen und ist zentraler Bestandteil des limbischen Systems. Er bildet den medialen Anteil des Telencephalons und ist Teil des Archicortex. Zu der *Formatio hippocampi* gehören der Gyrus dentatus (DG), das Cornu Ammonis (CA) und das Subiculum, der Gyrus stellt die Eingangsstation dar. Die Nervenzellkörper liegen im Stratum granulosum (Str. gr.). Hauptsächlich handelt es sich um erregende glutamaterge Körnerzellen, die ihre Dendriten in das aus innerer und äußerer Schicht bestehende Stratum moleculare (Str. mol.) entsenden. Des Weiteren sind im Str. gr. unterschiedliche Interneurone z. B. hemmende GABAerge Neurone zu finden. Das CA (Hippocampus proprius) ist vierschichtig aufgebaut und besteht aus Stratum oriens (Str. or.), das Nervenzellkörper enthaltende Stratum pyramidale (Str. pyr.), das breite Stratum radiatum (Str. rad.) und das schmale Stratum lacunosum-moleculare (Str. mol.). Im Str. pyr. finden sich hauptsächlich glutamaterge Pyramidenzellen die ihre Dendriten radial entsenden. Auch hier gibt es eine Vielzahl an verschaltenden Interneuronen. In der tangentialen Achse kann der Hippocampus proprius in CA1- CA3 anatomisch und funktional unterteilt werden. Das Subiculum stellt den Übergang in angrenzende Areale des Gyrus parahippocampalis dar. Zum

Seitenventrikel wird der Hippocampus proprius vom nervenfaserreichen Alveus (Muldenblatt) abgeschlossen (Hirsch 2000, Andersen, Morris et al. 2006).

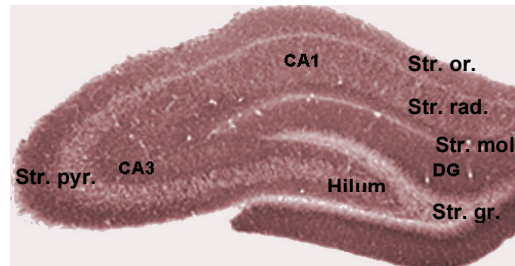


Abbildung 4: Histologisches Schnittbild des Hippocampus (<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ab/HippocampalRegions.jpg>)

CA (Cornu Ammonis)1, CA3, Gyrus dentatus (DG), Stratum granulosum (Str. gr.), Stratum pyramidale (Str. pyr.), Hilum, Stratum oriens (Str. or.), Stratum moleculare (Str. mol.) und Stratum radiatum (Str. rad.).

Eine besondere Bedeutung kommt dem DG zu, da er eine von nur insgesamt zwei Strukturen des Säugers ist, in denen adulte Neurogenese stattfindet (Kempermann, Kuhn et al. 1997, Cameron, Hazel et al. 1998, Kempermann 2002). Er erlangt die Fähigkeit zur fortgesetzten Neurogenese, indem eine neurogene Nische angelegt wird, aus der in den ersten vier Wochen postnatal mehr als 80% der Nervenzellen hervorgehen und in der auch im erwachsenen Alter die Nervenzellen gebildet werden können (Schlessinger, Cowan et al. 1975). Die Entstehung und Entwicklung dieser Nische wird durch diverse Signalmoleküle und Faktoren kontrolliert, im genauen Detail sind diese Vorgänge noch ungeklärt (Li, Siegel et al. 2011). Neben der Subgranularschicht des DG kann noch in der Subventrikularzone des lateralen Ventrikels die adulte Neurogenese stattfinden. Die neurogenen Progenitorzellen der genannten Strukturen zeigen Ähnlichkeit zu Astrozyten, deren neurogenes Verhalten durch intrinsische (genetische Signale) aber auch durch extrinsische Signale (z. B. Transmitter, Hormone, Wachstumsfaktoren) gesteuert werden. Auch pathologische Zustände wie Gehirnverletzungen, Epilepsie oder degenerative Erkrankungen beeinflussen das Verhalten der Zellen (Ming and Song 2005). Auch gibt es bereits eine Reihe von Verhaltensstudien, die einen direkten Zusammenhang zwischen adulter Neurogenese und der Hippocampusfunktion bei Lern- und Gedächtnisprozessen aufzeigen. Spezifisches Lernen stimuliert die Neurogenese

(Kempermann, Kuhn et al. 1998), ist diese beeinträchtigt kommt es zu defizitärem Lernverhalten bei den Tieren (Shors, Miesegaes et al. 2001).

1.6.2 Verschaltungen, funktionelle und neuropathologische Aspekte

Der Hippocampus ist über extrinsische Bahnen mit anderen Hirnregionen sowie über intrinsische Verschaltungen mit eigenen Regionen verknüpft. In der *Formatio hippocampi* beginnt die Verschaltung mit dem Str. mol. des DG, das cortikale Afferenzen als Eingangsstation empfängt. Hier werden Axone vom Cortex entorhinalis als Tractus perforans auf die distalen Dendriten erregender Körnerzellen, aber auch auf hemmende Interneurone (Vorwärtshemmung) verschaltet. Innerhalb des Str. gr. bewirken weitere Korbzellen durch Rückkopplung auf die Somata bzw. Axonhügel der Körnerzellen eine Rückwärtshemmung. Die proximalen Dendriten der Körnerzellen werden hingegen von erregenden Kommissuren- und Assoziationsfasern des Hilus aus der ipsi- bzw. kontralateralen *Formatio hippocampi* innerviert. Die Körnerzellen verschalten über ihre Axone, die Moosfasern, auf die Pyramidenzellen im inneren des Str. rad. der CA3 Region. Auch hier gibt es Vorwärts- wie Rückwärtshemmung. Von den CA3 Pyramidenzellen gehen glutamaterge Schaffer-Kollaterale, die den CA2 Sektor durchqueren und auf Pyramidenzellen in CA1 innervieren, ab. Auf der einen Seite verlassen durch den Alveus und die Fimbria teilweise die Axone der CA1 Pyramidenzellen den Hippocampus, auf der anderen Seite ziehen Kollaterale zu den Pyramidenzellen im Subiculum.

Es ergibt sich so aus der Erregungsausbreitung im Hippocampus eine trisynaptische Verschaltungskette, in der (A) glutamaterge Afferenzen aus dem entorhinalen Cortex die Körnerzellen im Str. gr. des DG aktivieren, (B) die Körnerzellen über die Moosfasern auf die Pyramidenzellen der CA3 Region verschalten und (C) die CA3 Pyramidenzellen über die Schaffer-Kollaterale die CA1 Pyramidenzellen ansteuern (Amaral and Witter 1989, Amaral and Witter 1995).

Der Hippocampus ist die zentrale Schaltstelle des limbischen Systems und erhält zumeist vorverarbeiteten Input von allen Sinnesmodalitäten. Er hat Verbindungen zum Hypothalamus, den Septumkernen und dem Gyrus cinguli, sodass er Einfluss auf das endokrine, viszerale und emotionale Geschehen hat. De-

pressionen sowie chronisch emotionaler Stress bzw. Traumata können mit reduziertem Volumen der Hippocampusformation in Verbindung gebracht werden (Videbech and Ravnkilde 2004, Warner-Schmidt and Duman 2006). Darüber hinaus kommt der Hirnstruktur, durch ihre Verbindung zu kognitiven Arealen des Neocortex eine wichtige Stellung für höhere Hirnleistung bei der Gedächtniskonsolidierung zu. Er übernimmt hierbei die Generierung, während die Speicherung der Information an verschiedenen anderen Stellen in der Großhirnrinde stattfindet. So zeigen z. B. Patienten mit beidseits zerstörten Hippocampi eine anterograde Amnesie, alte Erinnerungen bleiben jedoch meist erhalten. Weitere mit dem Hippocampus in Verbindung gebrachte Erkrankungen sind Demenz und Epilepsie. Eine epilepsiechirurgische einseitige Entfernung des Formatio hippocampi bietet die Möglichkeit medikamentös unbeherrschbare Anfälle zu behandeln. Rauschtrinken bei Heranwachsenden wird zudem als massive Störung bei der Entwicklung des Hippocampus gesehen, sodass es im Erwachsenenalter zu Vergesslichkeit und eingeschränktem räumlichen Orientieren kommen kann (Taffe, Kotzebue et al. 2010).

1.7 Ziel dieser Arbeit

Da das serotonerge System bei einer Vielzahl an neuropsychiatrischen Erkrankungen eine Rolle spielt, bieten Tiermodelle mit gezielter Inaktivierung von Genen eine gute Möglichkeit Entstehung von Dysfunktionen und Erkrankungen zu verstehen. Diesbezüglich sind Mausmodelle mit gezieltem zentralnervösen 5-HT Mangel hilfreich. Eine komplette Ausschaltung von 5-HT ist dabei nur durch den konstitutiven KO möglich.

Die Versuche die in dieser Dissertation dargestellt werden sollen die Folgen des zentralen Mangels von 5-HT für die Funktion neuronaler Netzwerke beleuchten, die für emotionale Verarbeitungsprozesse, unter anderem das Furchtlernen, von entscheidender Bedeutung sind. Wegen seiner zentralen Rolle im Kontext abhängigen Lernen steht der dorsale Hippocampus im Fokus der Aufmerksamkeit dieser Arbeit. Um herauszufinden, welchen Einfluss das Fehlen von 5-HT auf die Aktivität hippocampaler Neurone besitzt, wurden konstitutive *Tph2* KO Mäuse furchtkonditioniert. Die Aktivität des Hippocampus

soll dann mittels des neuronalen „immediate-early-gene“ c-Fos analysiert werden. Es wurde gezeigt, dass 5-HT einen gezielten Effekt auf glutamaterge und GABAerge Neurone ausübt. Eine große Gruppe der GABAergen Neurone des Hippocampus stellen die Parvalbumin-immunoreaktiven (ir) GABAergen Interneurone dar. Diese exprimieren serotonerge Rezeptoren (Gulyas, Megias et al. 1999) und regulieren direkt räumliches Lernen (Donato, Rompani et al. 2013). Daher steht die Analyse der konditionierungsabhängigen Aktivität der Parvalbumin-ir Neurone bei den verschiedenen Genotypen im Mittelpunkt der Arbeit.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien der Immunhistochemie

Antikörper

Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG	Invitrogen
Alexa Fluor® 555 goat anti-rabbit IgG	Invitrogen
Anti-c-Fos rabbit polyclonal Antikörper	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Parvalbumin monoclonal Antikörper (made in mouse)	swant

Andere Reagenzien

4',6-diamino-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen
Blocklösung I/II	eigene Herstellung
Citratpuffer	eigene Herstellung
Normal goat Serum (NGS) (Ziege)	Vector Laboratories
Normal horse Serum (NHS) (Pferd)	Vector Laboratories
Tris buffered saline (TBS)	eigene Herstellung

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

10 ml Einmalspritze	BD
Deckplättchen (24×60mm)	A. Hartenstein
Parafilm	Pechiney
SuperFrost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck

2.1.3 Materialien der Mausezucht und der Verhaltenstests

Standardfutter	ssniff
Furchtkonditionierungsbox	eigene Herstellung

2.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für die Gehirnpräparation

Fixierlösung I	4% Paraformaldehyd 4% NaAc pH 6,5 mit 10% Essigsäure	eigene Herstellung
Fixierlösung II	4% Paraformaldehyd 2,6% Na ₂ CO ₃ 2,7% NaHCO ₃ (+ 0,02% Glutaraldehyd) pH 11,0 mit NaOH (1N)	eigene Herstellung
Paraformaldehyd	4% Paraformaldehyd in PBS	eigene Herstellung
Saccharose Lösung	10%/20% D(+)Saccharose in PBS	eigene Herstellung

Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie

Blocklösung I/II	5% bzw. 2% Normal goat/horse Serum 0,25% Triton X-100 1 g BSA (bovine serum albumin) in Tris buffered saline (TBS)	eigene Herstellung
Citratpuffer	10mM Citronensäure pH 6,0 mit NaOH (1N) in ddH ₂ O	eigene Herstellung
Gelatinelösung 3%	Gelatine aus Schweinehaut 0,5% Chromium(III)potassiumsulfat in ddH ₂ O	eigene Herstellung
TBS (Tris buffered saline)	100mM Tris 150mM NaCl pH 7,5 mit HCl (5M)	eigene Herstellung

2.1.5 Chemikalien und Stoffe

4',6-diamino-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Chromium(III)potassiumsulfat	Fluka
Citronensäure	AppliChem
Cryo-Gel	Leica
Cryofect	Leica
Essigsäure	Roth
Fluorogel	Electron Microscopy Sciences
Gelatine aus Schweinehaut	Fluka
Glutaraldehyd	AppliChem
Methylenblau	AppliChem
Natriumazetat ($C_2H_3NaO_2$)	Merck
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck
Natronlauge (NaOH) (1N)	Merck
Natronlauge (NaOH) (5M)	AppliChem
Normal goat Serum (NGS) (Ziege)	Vector Laboratories
Normal horse Serum (NHS) (Pferd)	Vector Laboratories
Paraformaldehyd	Roth
Phosphat buffered saline (PBS, 10x)	Lonza
RNAse freies Wasser	Merck
D(+)Saccharose	AppliChem
TissueTek	Leica
Tris	Roth
Triton X-100	Sigma-Aldrich

2.1.6 Geräte und Software

CellSens Dimension	Olympus
Cryostat CM1950	Leica
Eppendorf Pipette 10/100/1000/5000 µl	Eppendorf
GraphPad Prism Version 6.0	GraphPad Software
Heizplatte IKAMAG® RCT	IKA
ImageJ	National Institutes of Health
Microsoft Office 2011 for Mac	Microsoft
Olympus IX 81 Mikroskop	Olympus
Spin-Vortex MICROSPIN FV-2400	Lab4you

2.2 Knockout Mäuse

2.2.1 Der Furchtkonditionierungstest

Der Furchtkonditionierungs (fear conditioning) -Test wird eingesetzt, um die Fähigkeit eines Tieres zu analysieren einen konditionierten Stimulus mit einem unkonditionierten Stimulus zu verknüpfen, was eine Form von Lernen und Gedächtnis darstellt. Die klassische Konditionierung basiert auf der Ausbildung einer Assoziation zwischen der negativen Erfahrung (milder elektrischer Schock kombiniert mit einem Tonsignal) und dem Kontext, in dem die Erfahrung gemacht wurde (Kontext-Gedächtnis). Die Ausbildung des Furchtgedächtnisses der Tiere kann dabei an der Dauer der Angststarre (freezing) auf den konditionierten Stimulus (Ton oder Kontext) abgelesen werden. Ton- und Kontext-Gedächtnis finden dabei zur gleichen Zeit statt.

In diesem Versuch wurde dazu ein automatisiertes Verfahren angewendet (TSE Systems Inc., Bad Homburg, Deutschland). Die Versuchsbox wurde mit einem konstanten Licht von 100 lux beleuchtet. Für den Konditionierungsvorgang (Tag 0) wurden die Mäuse in den Versuchsbereich gesetzt. Zwei Minuten (baseline) durften die Mäuse die neue Umgebung erkunden, ehe ihnen 20s lang ein 80dB, 4kHz Ton (auditorischer Reiz, konditionierter Stimulus, CS) geboten wurde. Während der letzten zwei Sekunden des Tons bekamen die Tiere einen 0,6mA starken elektrischen Schock (unkonditionierter Stimulus, US). Nach 60s wurde der CS-US Versuch je zweimal wiederholt.

2.2.2 Genotypenverteilung der Versuchstiere

Konstitutive *Tph2* KO Mäuse wurden durch Gentransfektion embryonaler Stammzellen erzeugt. Die Chimären wurden mit Wildtypen zu homologen KO Mäusen gezüchtet. Die *Tph2*^{-/-} Mäuse zeigen eine signifikante Reduktion des zentralen 5-HT Gehaltes (Gutknecht, Waider et al. 2008). Tabelle 2 zeigt die Untersuchungsgruppen (fünf Tiere/Untersuchungsgruppe). Die basale Kontrollgruppe bestand aus unkonditionierten Tieren aller drei Genotypen.

Tabelle 2: Einteilung der Untersuchungstiere beim Furchtkonditionierungstest

Geschlecht	Genotyp	Konditionierung
♂	-/-	nicht-konditioniert
♂	+/-	nicht-konditioniert
♂	+/+	nicht-konditioniert
♂	-/-	furchtkonditioniert
♂	+/-	furchtkonditioniert
♂	+/+	furchtkonditioniert

2.3 Immunhistologie

2.3.1 Entnahme und Präparation der Mausgehirne

Vorsichtige und schnelle Präparation als auch Fixierung der Gehirne sind wichtig, um das Gewebe zu erhalten und immunhistochemische Färbungen zu ermöglichen. Das gebräuchlichste Fixationsmaterial ist Paraformaldehyd (PFA). Die normale Konzentration beträgt 4%, in Lösung depolymerisiert PFA zu Formaldehyd. Der Fixationsprozess basiert auf der Fähigkeit des Formaldehyds Proteine zu denaturieren. Glutaraldehyd kann für die stärkere Denaturierung und damit Fixierung zugesetzt werden. Die Mäuse wurden zwei Stunden nach Furchtkonditionierung mit Isofluranen anästhesiert und das Gewebe anschließend mit einer transkardialen Perfusion fixiert. Zu diesem Zweck wurde der Bauchraum bis zur Brust geöffnet und das Herz dargestellt. Das letale Fixiermittel wurde direkt in den linken Ventrikel appliziert, um durch die Zirkulation in den kompletten Körper zu gelangen. Der rechte Vorhof wurde eröffnet, um das Blut ablaufen zu lassen. Die Mäuse wurden entweder zehn

Minuten ausschließlich mit der Fixierlösung II, welche Glutaraldehyd enthält, oder mit Fixierlösung I in Kombination mit Fixierlösung II perfundiert. Der Perfusion folgend wurden die Mäuse für die Entnahme des Gehirns dekapitiert. Anschließend wurde die Schädeldecke am Os parietale mit Scheren geöffnet und ein Schnitt entlang der Sutura sagittalis bis zum Os nasale gesetzt. Es folgten zwei Schnitte von der sagittalen Sutur bis zum Os temporale. Der Nasenknochen wurde durchtrennt und zwei Inzisionen vom Foramen magnum zum Os temporale beidseits angelegt. Die Schädeldecke wurde dann vorsichtig mit einer Zange entfernt. Es erfolgte die Entnahme und erneute Fixierung des Gehirns in Fixierlösung II ohne Glutaraldehyd 18-24 Stunden bei einer konstanten Temperatur von 4°C. Um die Gehirne vor Gefrierschäden zu schützen wurden sie in 10% und 20% Saccharose Lösung für 18-24 Stunden inkubiert und dann in 2-Methylenbutan auf Trockeneis eingefroren. Schließlich wurden sie bei - 80°C aufbewahrt.

2.3.2 Beschichtung der SuperFrost® Plus Objektträger mit Gelatine

Um sicher zu gehen, dass sich die Schnitte nicht während des Färbeprozesses insbesondere während der Antigenpenetration von den Objektträgern lösen, wurden die SuperFrost® Plus Träger zuvor mit Gelatine beschichtet. Diese Technik nutzt den Vorteil des Chrom(III)Ions mit dem Sauerstoffatom der Carboxylgruppe von Proteinen und dem Siliziumdioxid des Glases sechs feste, kovalente Verbindungen einzugehen. In einer wässrigen Gelatinelösung vernetzen sich Chrom(III)Ionen mit Gelatinemolekülen und verbinden sich später mit Glas und Proteinen. So wird eine Fixierung erreicht und die Haftung verbessert. Für die Beschichtung der Träger wurde eine wässrige Lösung aus Gelatine und Chromium(III)potassiumsulfat, ein Chrom(III)Ionen Salz hergestellt. Die Schlitten wurden mit Objektträgern beschickt und für ca. 30 Sekunden in die 40-50°C- warme Lösung getaucht. Auf Papier wurden die Objektträger über Nacht getrocknet und dabei durch Abdecken vor Staub und Verunreinigungen geschützt.

2.3.3 Schneiden der Mäusegehirne

Um die Gehirne mit dem Cryostat in 30 µm Schnitte zu schneiden, wurden diese auf dem Trägerplättchen mittels Cryogel in allen drei Raumebenen senkrecht aufgebockt, die Schnitte auf die mit Gelatine beschichteten Objektträger übertragen und schließlich bei - 80°C gelagert. Beim Schneiden war darauf zu achten, dass die Präparate eine Temperatur von ca. - 20°C hatten. Ferner dass es zu keinem Einschluss von Luftblasen kam und dass die Schnitte symmetrisch geschnitten wurden. Zur Überprüfung wurden Schnellfärbungen mit Methylblau eingesetzt und die Ausrichtung der Präparate gegebenenfalls korrigiert.

2.3.4 Immunhistochemie

Immunhistochemie wurde entwickelt um Proben bzw. Gewebe mit immunchemischen Methoden zu untersuchen. Eine Methode stellt dabei die Fluoreszenzfärbung und -bildgebung dar. Vorteile bestehen in der hohen Spezifität und Auflösung, in dem starkem Kontrast bei dunkler Umgebung sowie in der quantitativen Bewertbarkeit. Je mehr Substrat markiert wurde, desto stärker wird das eingehende Signal. In Abbildung 5 wird die indirekte Immunfluoreszenzmethode dargestellt. Ein unbeladener primärer Antikörper bindet spezifisch an ein einzelnes Epitop des gesuchten Proteins (monoclonal) oder an mehrere Epitope (polyclonal) des gesuchten Proteins, während der sekundäre Antikörper gegen den konstanten Teil des primären Antikörpers gerichtet ist. An dem sekundären Antikörper ist der fluoreszierende Farbstoff gebunden durch den nach Anregung die Fluoreszenz ermittelt wird. Ein zusätzlicher Vorteil besteht somit auch in der Signalamplifikation, da mehrere sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden können. Im Gegensatz zu der indirekten Nachweismethode bedarf die direkte Methode keinen zweiten Antikörper, da der Marker an dem Primären gebunden ist. Neben der Möglichkeit des gebundenen Fluorochroms kann an den Antikörper auch ein Enzym gebunden sein, das nach Zugabe eines Substrats eine einfärbende Enzym-Substrat-Reaktion auslöst. Z. B. kann als Chromogen DAB eingesetzt werden. Es bildet bei der Umsetzung des Peroxids durch sein Enzym Peroxidase einen braunen Farbniederschlag.

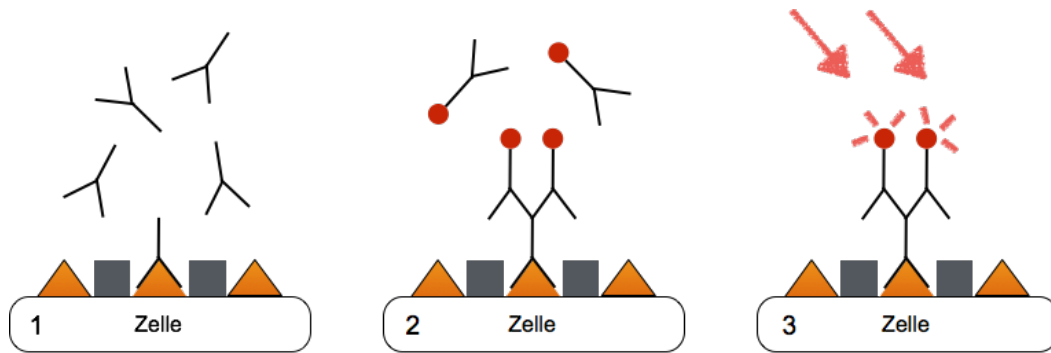


Abbildung 5: Indirekte Immunfluoreszenzmethode (eigene Graphik)

1. Primärer Antikörper bindet an das Epitop des Zielproteins. 2. Der sekundäre Antikörper, der den fluoreszierenden Farbstoff trägt, bindet an den primären Antikörper. 3. Durch Anregung mit Licht kommt es zur Fluoreszenz.

2.3.5 Prinzip der Fluoreszenz

Fluoreszenz ist eine Art von Lumineszenz und beschreibt die Fähigkeit bestimmter Substanzen bei Bestrahlung mit Licht ein Photon zu absorbieren und damit kurzfristig in einen angeregten, energetisch höheren Zustand überzugehen (s_2 oder s_1). Das angeregte Elektron kehrt zeitnah in das niedrigste s_1 -Niveau zurück, wobei die Energie als Schwingungsenergie (-wärme oder -relaxation) frei wird. Daraufhin geht das Elektron vom s_1 -Zustand in den Grundzustand (s_0) in der Regel unter Emission von Photonen über (Abb. 6). Es gilt die Stokes'sche Regel, dass das ausgesandte Licht energetisch niedriger ist, als das Absorbierte. Die maximalen Wellenlängen driften auseinander (Abb. 7).

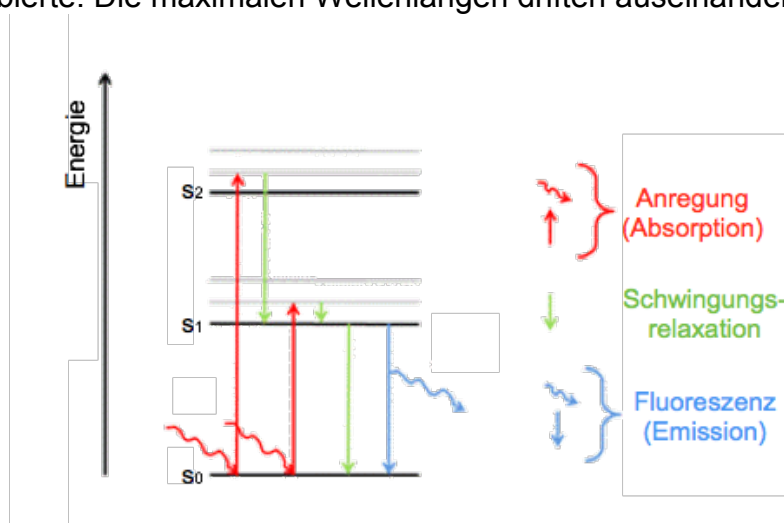


Abbildung 6: Elektronenübergänge bei Absorption und Emission von Licht (Bröckel)

Das Elektron geht von s_0 in s_1 oder s_2 über und kehrt unter Abgabe von Schwingungsrelaxation und Fluoreszenz in den Grundzustand zurück.

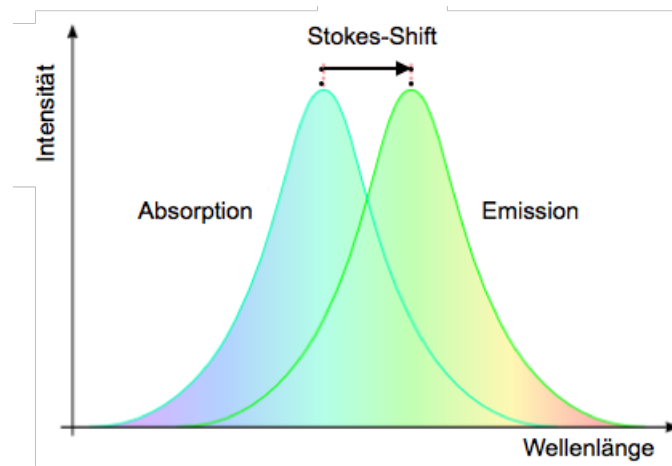


Abbildung 7: Stokes Shift als Grundprinzip der Fluoreszenz (Niedermayr)

Stokes Shift führt zu dem Energieverlust zwischen absorbiertem und emittiertem Licht.

2.3.6 Charakteristika der Fluorophore

Das Auftreten von natürlichen Molekülen, die Autofluoreszenz zeigen, ist selten. Die überwiegende Mehrheit organischer Proben ist nicht in der Lage Fluoreszenzlicht zu emittieren und muss mit spezifischen Detektorsystemen verknüpft werden. Synthetische Fluorophore sind meistens mit organischen aromatischen Verbindungen mit einem planaren, konjugierten π -System verbunden. Die Elektronen überlappen in den Molekülorbitalen und sind nicht einem einzigen Atom zuzuordnen. Sie können durch das Absorbieren von Photonen angeregt werden und schließlich mit den verknüpften Makromolekülen (z. B. Protein) durch Abgabe der Photonen detektiert werden. Die Farbstoffe haben bestimmte Charakteristika und werden hinsichtlich ihrer Absorption und Fluoreszenzeigenschaften einschließlich der spektralen Profile der maximalen Wellenlängen von Absorption und Emission katalogisiert. Das verwendete Alexa Fluor 488 (bzw. 555) hat sein Adsorptionsmaximum bei 495 nm (bzw. 555 nm) und sein Emissionsmaximum bei 519 nm (bzw. 565 nm) und strahlt daher in grüner (bzw. roter) Farbe. Um maximale Fluoreszenz zu erreichen werden die Proben mit der Wellenlänge der maximalen Absorption bestrahlt und die Emission wird mit maximaler Wellenlänge des Emissionsspektrums detektiert.

2.3.7 Aufbau und Funktion des Fluoreszenzmikroskops

Für die Bildgebung wurde ein motorisiertes invertiertes Fluoreszenzmikroskop von Olympus (IX 81) verwendet. Es besteht aus der Lichtquelle, diversen Spektralfiltern, einem dichroitischen Spiegel und einem Detektor, was das menschliche Auge oder eine Kamera sein kann (Abb. 8). Die Hauptfunktion des Mikroskops ist die Darstellung der mit Fluorochromen markierten Proben. In dieser Arbeit wurden die Bilder mit cellSens Dimension, eine von Olympus entwickelte Software, ver- und bearbeitet.

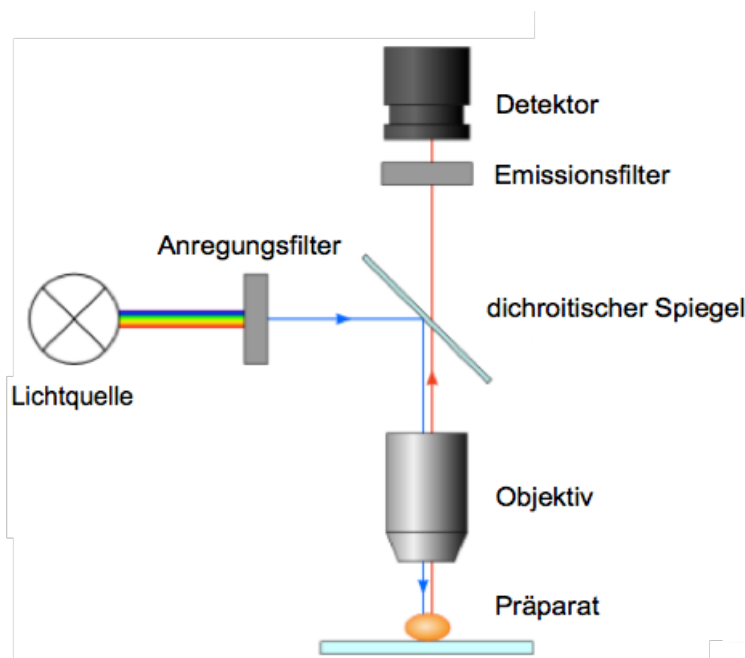


Abbildung 8: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops (Niedermayr)

Licht trifft gefiltert auf den dichroitischen Spiegel, der nur kurzwelligeres Licht als λ_k reflektiert. Das Emissionslicht kommt gefiltert im Detektor an. Mit der blauen Linie wird der Weg des exzitatorischen Lichtes, mit der roten Linie der Weg des Emissionslichtes, beschrieben.

Der Lichtstrahl aus der Lichtquelle trifft auf den Anregungsfilter, welcher die spezifische Anregungswellenlänge herausfiltert. Der Strahl trifft anschließend auf den dichroitischen Spiegel, der eine kritische Wellenlänge λ_k zwischen Absorptions- und Emissionswellenlänge aufweist. Nur die Wellenlängen die kleiner sind als λ_k werden reflektiert, alle anderen werden durchgelassen. Das kürzerwellige Licht wird somit durch das Objektiv konzentriert und trifft auf das fluoreszierende Präparat. Das konzentrierte Emissionslicht passiert aufgrund der län-

gerwelligen Eigenschaften den Spiegel und wird durch den Emissionsfilter von dem verbleibenden exzitatorischen Licht getrennt. Im Detektor erscheint die spezifische Emissionsfarbe.

2.3.8 Fluoreszenzfilter

Ein perfekt abgestimmtes Filtersystem ermöglicht hohe Kontraste auf dunklem Hintergrund und eine bestmögliche Bildgebung. Deshalb ist die Auswahl dessen so wichtig. Das Emissions- und Absorptionsspektrum von Alexa Fluor 488 liegt nahe beieinander und überlappt sogar in einem Wellenlängenbereich von 490 nm - 540 nm. Der eingebrachte Anregungsfilter (blaue Linie) stimmt in einem großem Wellenlängenbereich mit dem Spektrum des Anregungslichtes überein, sodass nur diese Wellenlängen den Filter passieren. Der dichroitische Spiegel (grüne Linie) reflektiert den Bereich von 400 nm – 460 nm des exzitatorischen Lichtes (blaues Feld), da $\lambda_k = 460$ nm. Das Emissionslicht wird aufgrund der Wellenlänge von > 515 nm durchgelassen. Der Emissionsfilter lässt den Bereich > 515 nm passieren und gewährleistet den Nachweis von fluoreszierendem Licht zwischen 515 nm und 600 nm.

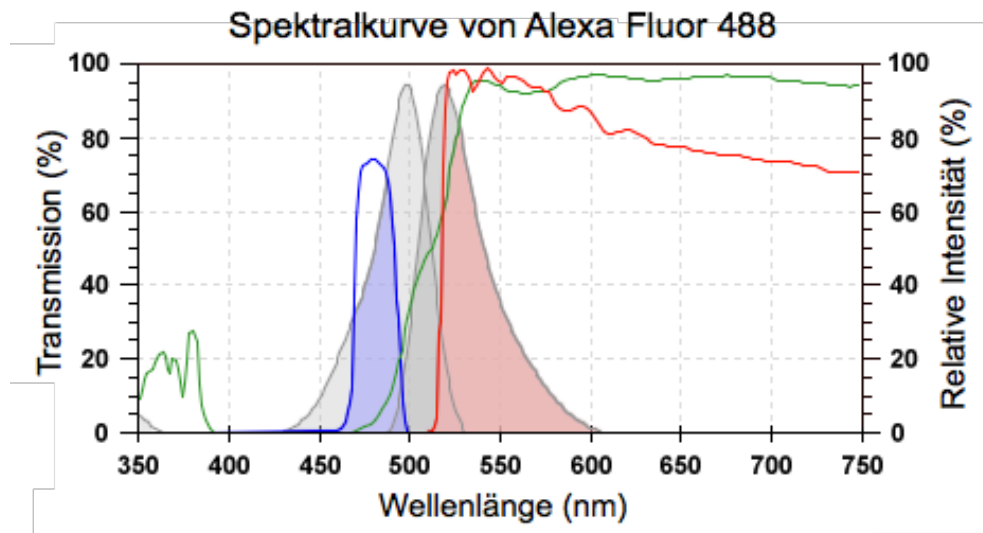


Abbildung 9: Zusammenspiel eines Fluoreszenzfiltersystems (Parry-Hill, Fellers et al.)

Der blaue Bereich zeigt den Wellenlängenbereich, der den Anregungsfilter passiert. Das rote Feld gibt den aufgefangenen fluoreszierenden Bereich wieder. Hellgrau hinterlegt ist das Absorptionsspektrum, dunkelgrau das Emissionsspektrum. Zwischen 490 nm und 540 nm überlappen die beiden Spektren.

2.4 Indirekte Immunofluoreszenzfärbung

Im Kontext dieser Arbeit wurde das folgende Protokoll für den Nachweis von Parvalbumin bzw. c-Fos im Gehirn bzw. den Gewebeschnitten der Maus verwendet. Es handelt sich um eine doppelt-immunhistochemische Färbung (c-Fos und Parvalbumin).

- Auftauen der Schnitte bei Raumtemperatur (RT).
- Die Träger mit den Gewebeschnitten wurden in 70°C heißen Citratpuffer (pH 6,0) unter Kontrolle zehn Minuten bis zur Endtemperatur von ca. 85°C erhitzt.
- Abkühlen auf ca. 40-50°C.
- Drei Waschschrte in TBS je fünf Minuten.
- Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurden die Schnitte mit ca. 300µl Blockpuffer I (NGS), für 60 Minuten bei RT geblockt.
- Inkubation mit den Primärantikörpern (in Blocklösung I) über Nacht bei 4°C. Inkubation der Negativkontrollen nur mit Blocklösung I.
- Drei Waschschrte in TBS je fünf Minuten am Folgetag.
- Inkubation mit den fluoreszierenden Zweitantikörpern (in Blocklösung II) 90 Minuten im Dunkeln bei RT.
- Drei Waschschrte in TBS je fünf Minuten.
- Um die Zellkerne anzufärben wurden die Schnitte mit 300µl DAPI-Lösung für zehn Minuten inkubiert (in TBS 1:500 gelöst). DAPI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die DNA inkorporiert und sich an bestimmten Bindungsstellen anhaftet. Sein Emissionsmaximum liegt bei 461 nm.
- Nach dreimaligem Waschen zu je fünf Minuten in TBS wurden die Schnitte mit Fluorogel und Deckplättchen abgedeckt.
- Die Schnitte wurden mit einem motorisierten, invertierten Fluoreszenzmikroskop von Olympus (IX 81) untersucht.

Tabelle 3: Antikörper, die für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet wurden

Antikörper	Spezies	Verdünnung
anti-rabbit Alexa Fluor® 555	made in goat	1:400
anti-mouse Alexa Fluor® 488	made in goat	1:400
anti-c-Fos	made in rabbit	1:500
anti-Parvalbumin	made in mouse	1:500

2.5 Statistische Methoden

Die Bilder wurden mit einem Olympus IX 81 Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Ab dem Bregma -1,34 wurden Übersichtsaufnahmen des dorsalen Hippocampus erstellt. Für die Auswertung wurde ImageJ (Fiji) verwendet. Der dorsale Hippocampus wurde dabei in drei Unterregionen (DG, CA1 und CA3) unterteilt und in den jeweiligen Unterregionen die c-Fos-, Parvalbumin-immunoreaktiven (ir) und doppelgefärbten Zellen gezählt. Für die Berechnung des Volumens wurde die Fläche des dorsalen Hippocampus bzw. seiner Unterregionen mit dem Serienabstand von 180 μm (es wurden sechs Serien a 30 μm geschnitten) multipliziert. Das Volumen (mm^3) wurde in Relation zur absoluten Zellzahl gesetzt, sodass die Zelldichte ermittelt wurde.

$$\text{Zelldichte [n/mm}^3\text{]} = \text{Zellzahl [n]} / \text{Volumen [mm}^3\text{]}$$

In den Analysen wurde der Mittelwert der gesuchten Zelldichte aus den fünf Mäusen der jeweiligen Untersuchungsgruppe ermittelt. Die Graphiken im Ergebnisteil dieser Arbeit zeigen den Mittelwert plus den Standardfehler (SEM). Die Daten wurden mit dem Programm GraphPad Prism visualisiert und analysiert. Hierbei wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (= two way ANOVA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Einteilung und Volumenanalyse des dorsalen Hippocampus

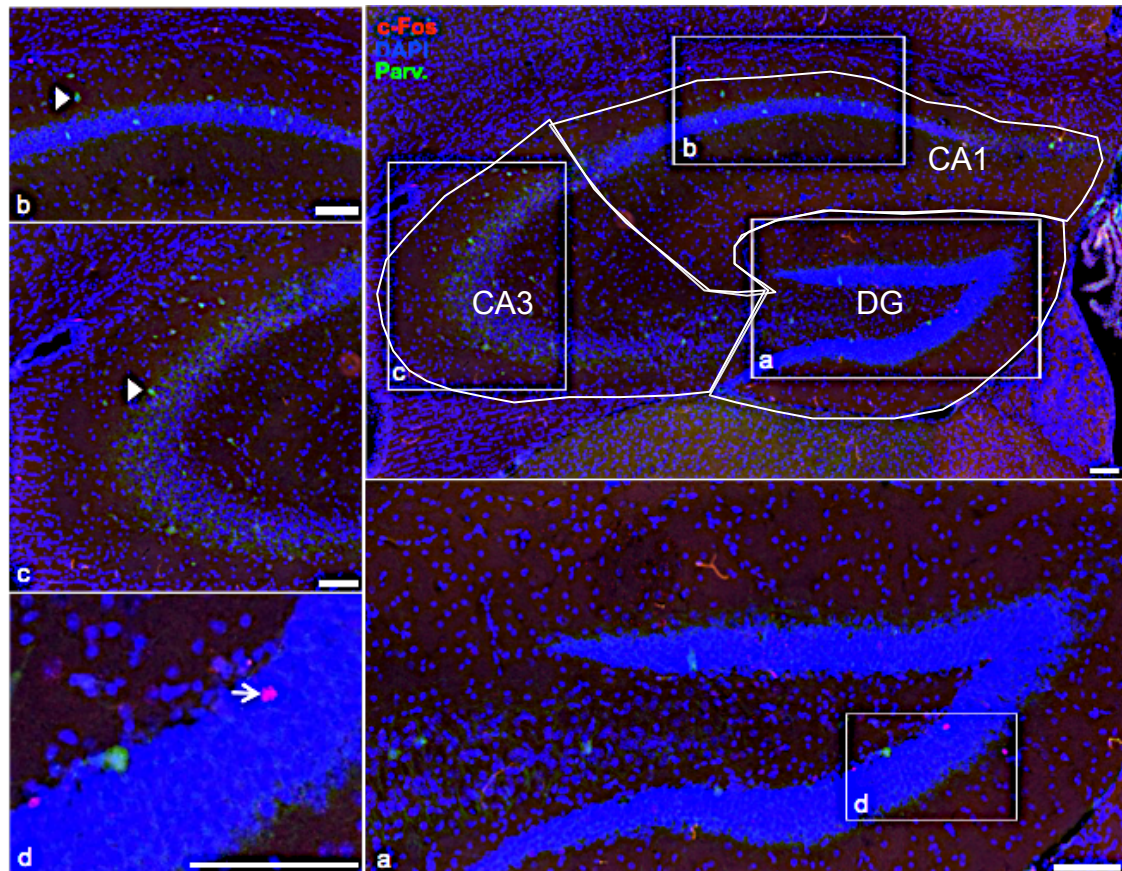


Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung von Parvalbumin bzw. c-Fos einer nicht-konditionierten *Tph2*^{+/+} Maus

Übersichtsaufnahme des dorsalen Hippocampus einer nicht-konditionierten *Tph2*^{+/+} Maus bei Bregma -1,70. Der Pfeil zeigt eine c-Fos immunoreaktive (ir) Zelle im Gyrus dentatus (DG) (a) und (d). In Cornu Ammonis (CA)1 (b) und CA3 (c) ist mit der Pfeilspitze eine Parvalbumin-ir Zelle gekennzeichnet. Die Zellkerne sind blau gefärbt (DAPI). Maßstab: 100 μ m.

Die Übersichtsaufnahme des dorsalen Hippocampus (Abb. 10) zeigt exemplarisch Ausschnitte der drei Unterregionen, DG (Abb. 10a, d), CA1 (Abb. 10b) und CA3 (Abb. 10c). Die Vergrößerung (Abb. 10a) bzw. (d) zeigt am Pfeil eine c-Fos immunoreaktive (ir) Zelle. In (b) ist eine Parvalbumin-ir Zelle (grün) an der Pfeilspitze dargestellt. (c) zeigt die Vergrößerung der Unterregion CA3 und ebenfalls eine Parvalbumin-ir Zelle (Pfeilspitze).

Um den Einfluss einer 5-HT Defizienz auf die Expression von c-Fos und Parvalbumin im dorsalen Hippocampus nach der Furchtkonditionierung festzustellen, wurden erwachsene, männliche *Tph2*^{-/-} Mäuse (n = 5/Gruppe) mittels Immundoppel-Fluoreszenz Färbung mit *Tph2*^{+/-} und *Tph2*^{+/+} Tieren verglichen. Die DAPI Färbung wurde zur Visualisierung der Zellkerne eingesetzt.

Bei der c-Fos Färbung fiel neben der erwarteten nukleären Färbung eine granuläre Färbung auf. Bei der nukleären Färbung ist der Zellkern homogen rot gefärbt (Abb. 11 Pfeil), diese Zellen wurden im folgenden als c-Fos-ir bezeichnet. Die granuläre Färbung zeigt sich hingegen diffus versprengt (Abb. 11 Pfeilspitze), diese granuläre Färbung wurde im Folgenden separat behandelt. Um eine quantitative Aussage über die Anzahl der entsprechenden immunoreaktiven Zellpopulationen zu bekommen, wurde die jeweilige Zelldichte im dorsalen Hippocampus ausgewertet. Diese errechnet sich aus der Zellzahl pro Volumen. Das Volumen des dorsalen Hippocampus mit seinen Unterregionen war zwischen den einzelnen Gruppen nicht verändert (Abb. 12). Daher korreliert die dargestellte Zelldichte direkt mit den Zellzahlen der einzelnen Färbungen (siehe Kap. 2.5).

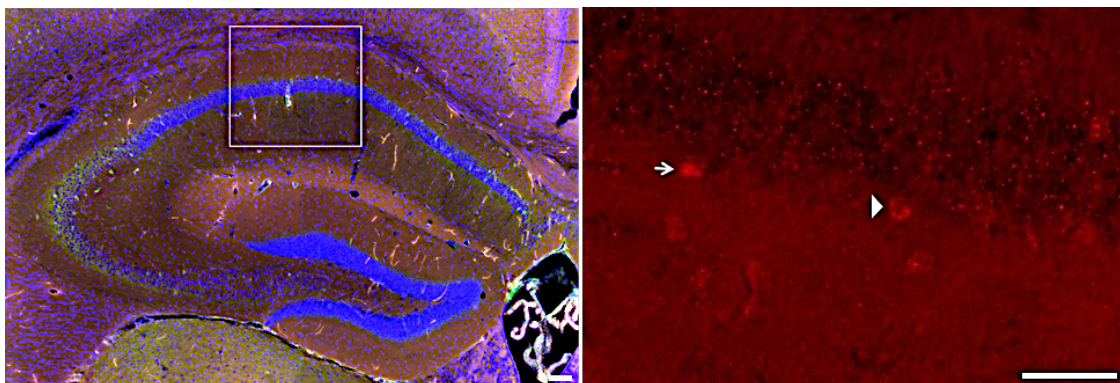


Abbildung 11: Darstellung der c-Fos Färbungen bei einer nicht-konditionierten *Tph2*^{-/-} Maus

Die Darstellung rechts zeigt einen Ausschnitt der Unterregion Cornu Ammonis (CA)1 vergrößert. Es wird nur der rote c-Fos Kanal gezeigt. Ersichtlich sind die zwei unterschiedlichen c-Fos Färbungen: die nukleäre Färbung ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Der Kern ist homogen rot gefärbt. Die granuläre Färbung (Pfeilspitze) hingegen ist durch einzelne kleine rote Versprengungen im Zelleib gezeichnet. Maßstab: 100 µm, Bregma -1,70.

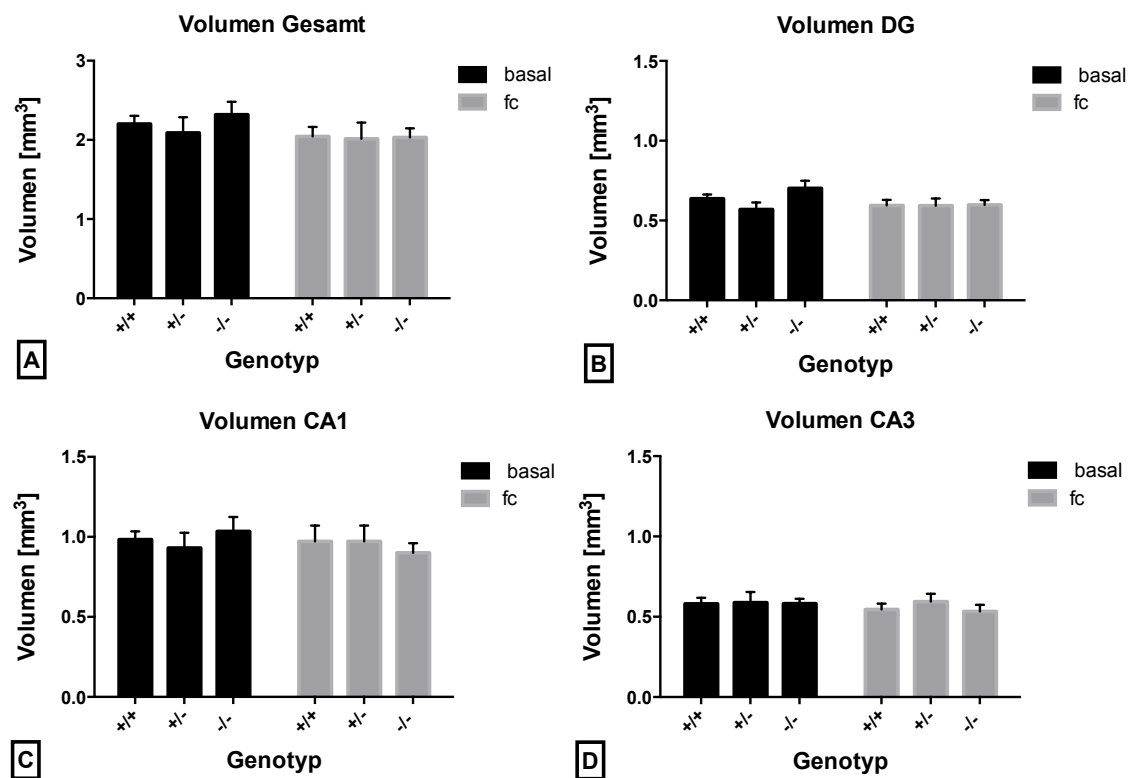


Abbildung 12: Darstellung des Volumens des dorsalen Hippocampus und seiner Unterregionen DG, CA1 und CA3.

Das Volumen im gesamten dorsalen Hippocampus sowie in den Unterregionen Gyrus dentatus (DG), Cornu Ammonis (CA)1 und CA3. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Genotypen im Volumen des dorsalen Hippocampus bzw. seiner Unterregionen festgestellt werden. Mittelwert + SEM (Standardfehler).

3.2 Unveränderte PV-ir Zelldichte nach Furchtkonditionierung

Im Nachfolgenden wurde eine Färbung gegen Parvalbumin untersucht. Sie soll Rückschlüsse auf die Anzahl dieser Untergruppe der GABAergen Interneurone in Abhängigkeit des *Tph2* Genotyps geben.

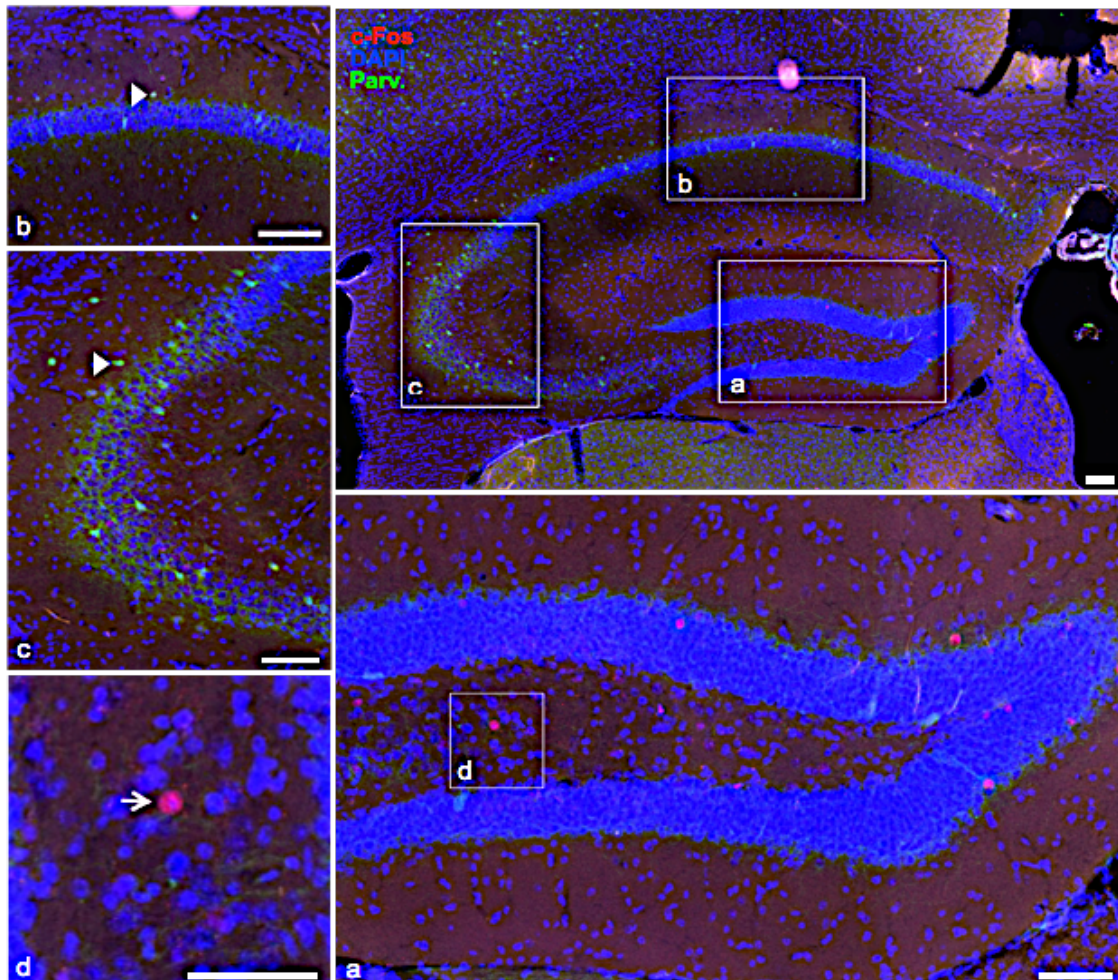


Abbildung 13: Aufnahme des dorsalen Hippocampus bei einer konditionierten *Tph2*^{+/+} Maus

Übersichtsaufnahme des dorsalen Hippocampus einer konditionierten *Tph2*^{+/+} Maus bei Bregma -1,70. Die Pfeile zeigen Immunfluoreszenzfärbung von c-Fos im Gyrus dentatus (DG) (a) und (d), die Pfeilspitzen Parvalbumin (GABAerge Interneurone) in Cornu Ammonis (CA)1 (b) und CA3 (c). Die Zellkerne sind blau gefärbt (DAPI). Maßstab: 100 μm (a) bis (c); 50 μm in (d).

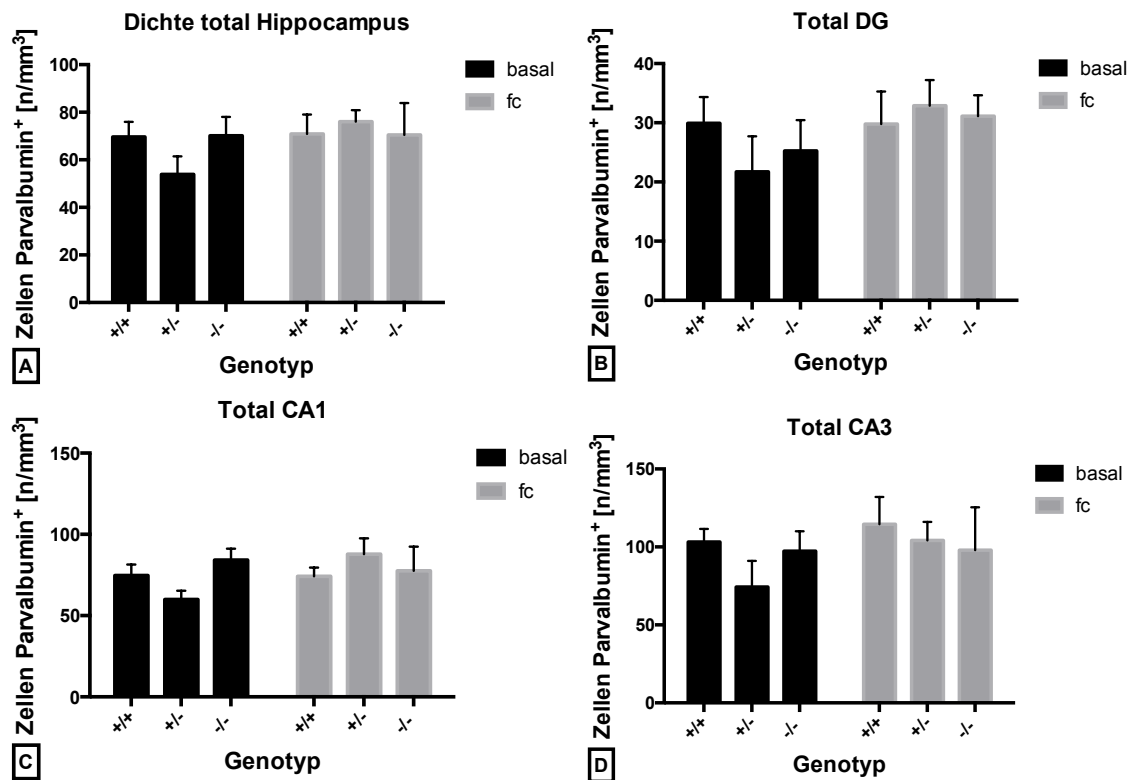


Abbildung 14: Darstellung der Dichte der Parvalbumin-ir Zellen im gesamten dorsalen Hippocampus sowie in den Unterregionen DG, CA1 und CA3

Die Graphiken zeigen die Untergruppe der GABAergen Interneurone im gesamten dorsalen Hippocampus sowie in den Unterregionen Gyrus dentatus (DG), Cornu Ammonis (CA) 1 und CA3, die mit Parvalbumin angefärbt werden konnten. Es konnte für keine Region ein Konditionierungs- oder Genotypeneffekt festgestellt werden. Mittelwert + SEM (Standardfehler).

Abbildung 14 zeigt die statistische Auswertung der Parvalbumin-ir Färbung. Weder im gesamten dorsalen Hippocampus (Abb. 14A) noch in den einzelnen Unterregionen (Abb. 14B-D) offenbarte die zweifaktorielle Varianzanalyse signifikante Unterschiede. Konditionierungs- oder Genotypeneffekt waren nicht zu beobachten, es konnte außerdem keine Interaktion festgestellt werden ($p > 0,05$). Weder der Genotyp noch die Konditionierung scheinen Einfluss auf die Zelldichte der Parvalbumin-ir Zellen gehabt zu haben.

3.3 Starke Erhöhung der c-Fos Zelldichte im dorsalen Hippocampus nach Furchtkonditionierung bei *Tph2*^{-/-} Tieren

Als eines der bestuntersuchten „immediate early genes“ wurde die Fluoreszenzfärbung der c-Fos-ir Zellen im gesamten dorsalen Hippocampus sowie in den einzelnen Unterregionen untersucht.

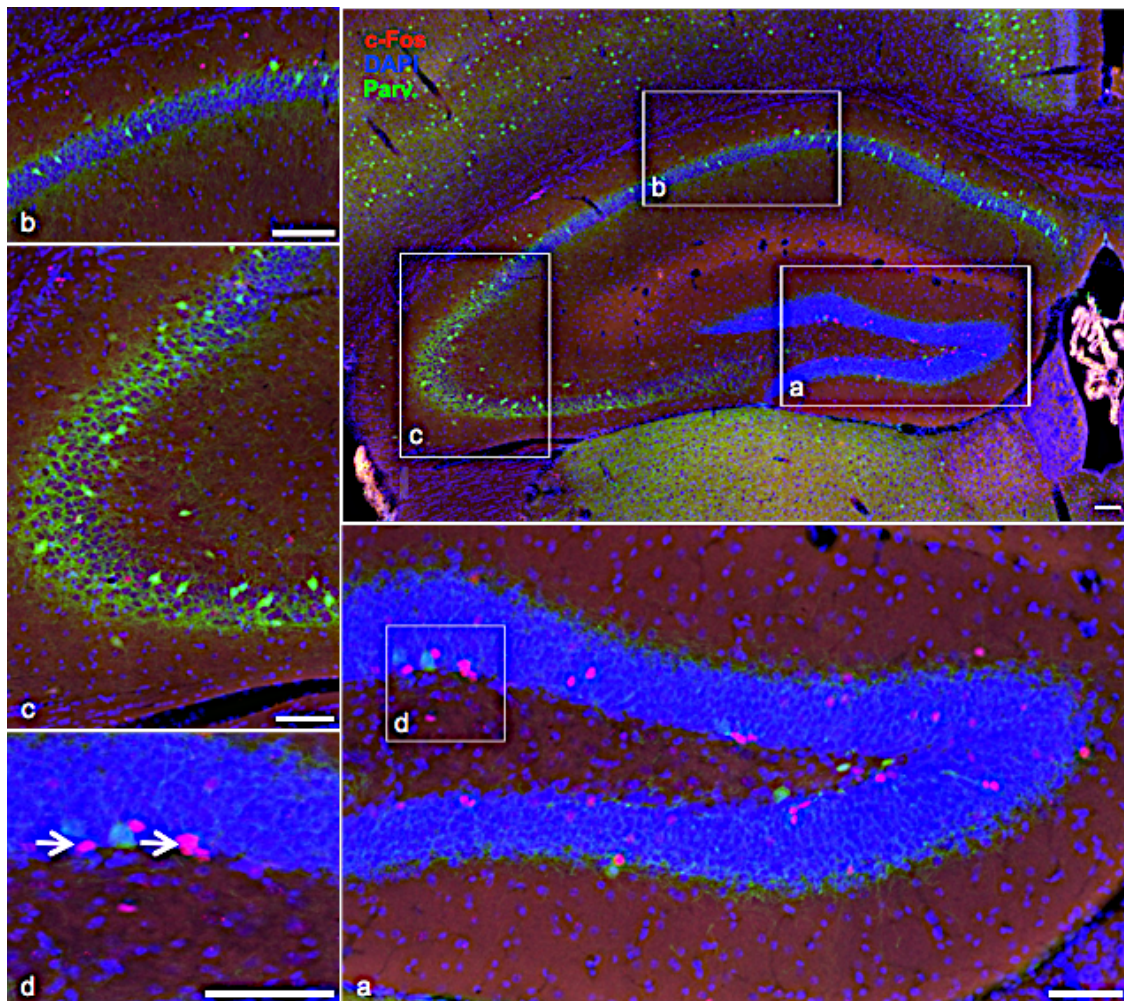


Abbildung 15: Immunofluoreszenzfärbung von c-Fos einer konditionierten *Tph2*^{-/-} Maus
 Dargestellt ist eine konditionierte *Tph2*^{-/-} Maus. (a) zeigt einen Ausschnitt der Unterregion Gyrus dentatus (DG), (b) aus Cornu Ammonis (CA)1 und (c) aus CA3. (d) zeigt die Unterregion DG nochmals vergrößert. In jeder Unterregion sind deutlich die rot gefärbten c-Fos-ir Zellen (Pfeile) ersichtlich. Maßstab: 100 μ m (a) bis (c); 50 μ m in (d), Bregma: -1,70.

Abbildung 15 zeigt die Färbung der c-Fos-ir Zellen einer konditionierten *Tph2^{-/-}* Maus. Der blaue DAPI Kanal wurde zur Visualisierung der Zellkerne eingesetzt. Die Parvalbumin-ir Zellen sind im grünen Kanal ersichtlic. Jede Unterregion wurde separat vergrößert (Abb. 15a-d). Auffallend viele c-Fos-ir Zellen sind in der Unterregion DG erkennbar, beispielhaft mit Pfeilen gekennzeichnet (Abb. 15d). Die c-Fos-ir Zellen konzentrieren sich auf das Str. gr., die Körnerzellschicht im DG. In der Unterregion CA1 finden sich die c-Fos-ir Zellen hauptsächlich im Str. or. bzw. am Rand des Str. rad. wieder.

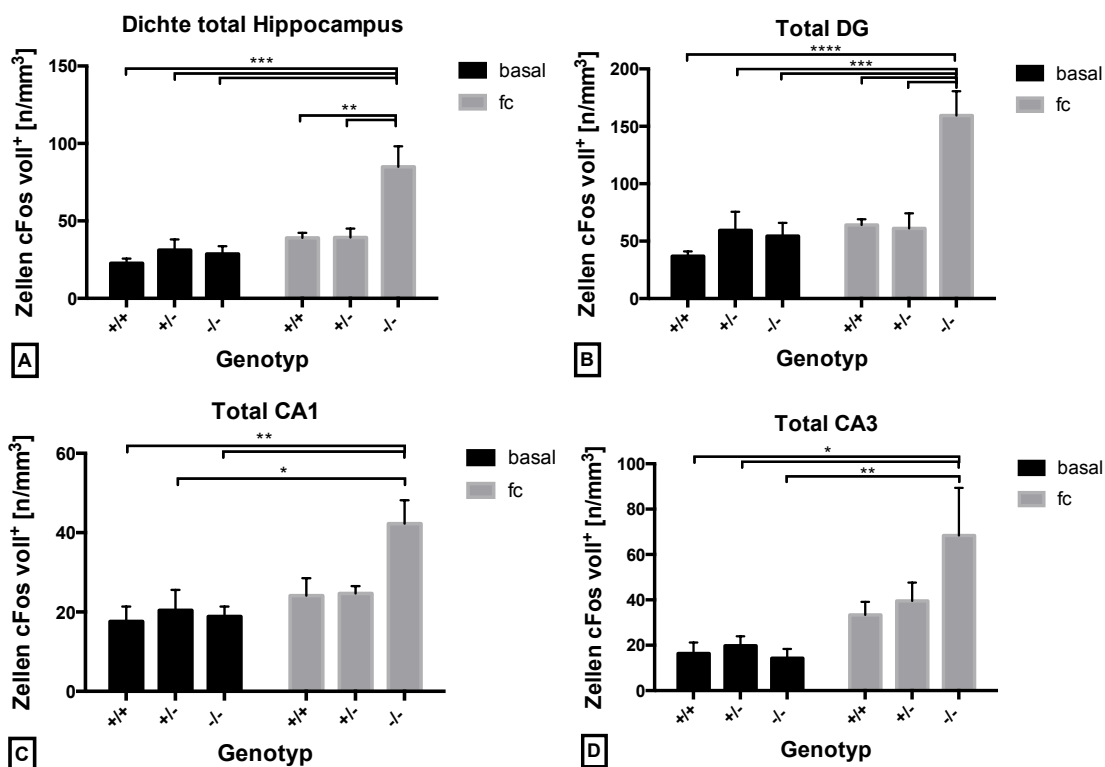


Abbildung 16: Darstellung der vollen c-Fos Zelldichte im gesamten dorsalen Hippocampus, DG, CA1 und CA3

Die Abbildung zeigt die Zelldichte der vollen c-Fos-ir Zellen im gesamten dorsalen Hippocampus sowie in den Unterregionen Gyrus dentatus (DG), Cornu Ammonis (CA)1 und CA3. Im gesamten dorsalen Hippocampus (A) setzte sich die Gruppe der konditionierten $-/-$ Tiere mit einem signifikanten Unterschied von $*** p < 0,001$ bzw. $** p < 0,01$ prägnant von den restlichen Untersuchungsgruppen ab. Es zeigte sich sowohl ein genereller Konditionierungseffekt – als auch ein Genotypeneffekt. Das Zusammenspiel der Furchtkonditionierung im speziellen bei den KO Mäusen führte zur signifikanten Erhöhung der Zellzahl und damit zur Interaktion. Die Graphik für den Bereich des DG (B) zeigt das gleiche Ergebnis wie bei (A), in CA1 (C) kam es zu keiner Interaktion, jedoch konnte ein Konditionierungseffekt mit $** p < 0,01$ festgestellt

werden. In CA3 (D) kam es ebenfalls zu dem genannten Konditionierungseffekt. Mittelwert + SEM (Standardfehler). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Abbildung 16 zeigt die Zelldichte der c-Fos-ir Zellen im gesamten dorsalen Hippocampus sowie in den Unterregionen DG, CA1 und CA3. Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab eine Genotyp \times Konditionierungs-Interaktion mit $F_{(2,24)} = 6,632$, $p = 0,005$ für den gesamten dorsalen Hippocampus (Abb. 16A). Es ergab sich ein Genotypeneffekt mit $p = 0,003$ und gleichzeitig ein genereller Konditionierungseffekt mit $F_{(1,24)} = 21,76$, $p < 0,001$. Wie bei der absoluten Zellzahl setzte sich die Zelldichte der konditionierten $Tph2^{-/-}$ Gruppe mit einem mindestens doppelt so großen Wert prägnant von den restlichen konditionierten Tieren und den nicht-konditionierten Kontrolltieren ab ($Tph2^{-/-}$ vs. $Tph2^{+/-}$ $p < 0,001$). Die durchschnittliche Zelldichte betrug 84,9 Zellen auf einen mm^3 . Die Unterregion DG (Abb. 16B) zeigte ebenfalls eine Genotyp \times Konditionierungs-Interaktion ($F_{(2,24)} = 8,226$, $p = 0,002$). Die Konditionierung bedingte gleichzeitig die Erhöhung der Zelldichte ($F_{(1,24)} = 16,98$, $p < 0,001$). Die durchschnittliche Zelldichte für den konditionierten $Tph2^{-/-}$ Genotyp in der Unterregion DG betrug 159,5 Zellen/ mm^3 und wies somit einen weit höheren Wert als im gesamten dorsalen Hippocampus auf. In der Unterregion CA1 (Abb. 16C) konnte weder Genotyp \times Konditionierungs-Interaktion, noch Genotypeneffekt festgestellt werden. Jedoch war auch hier der Konditionierungseffekt ($F_{(1,24)} = 11,11$, $p = 0,003$) feststellbar. Die Konditionierung der Tiere scheint in dieser Unterregion eine Erhöhung der c-Fos-ir Zellen unabhängig vom Genotyp bewirkt zu haben. Die Zelldichte an c-Fos-ir Zellen des konditionierten $Tph2^{-/-}$ Genotyps war mit 42,3 Zellen/ mm^3 die geringste im gesamten dorsalen Hippocampus. In der Unterregion CA3 (Abb. 16D) konnte ebenfalls nur ein genereller Konditionierungseffekt mit $F_{(1,24)} = 13,88$, $p = 0,001$ nachgewiesen werden. Genotyp- oder Interaktionseffekt konnten nicht gezeigt werden. Hier war die Zelldichte des konditionierten $Tph2^{-/-}$ Genotyps mit 68,4 Zellen/ mm^3 deutlich geringer als der Durchschnittswert des gesamten dorsalen Hippocampus und unterstrich damit die signifikanten Ergebnisse der Unterregion DG.

3.4 Doppelfärbung der Parvalbumin-/c-Fos-ir Zellen der *Tph2* KO Mäuse

Für die Darstellung der Auswirkung des Furchtlernens einer c-Fos Aktivierung von Parvalbumin-ir Zellen eignet sich die Immunfluoreszenzdoppelfärbung besonders gut, da sich bei dieser Methode auf einem Gehirnschnitt sowohl die Proteine in separaten Kanälen, als auch gemeinsam in einem Bild darstellen lassen.

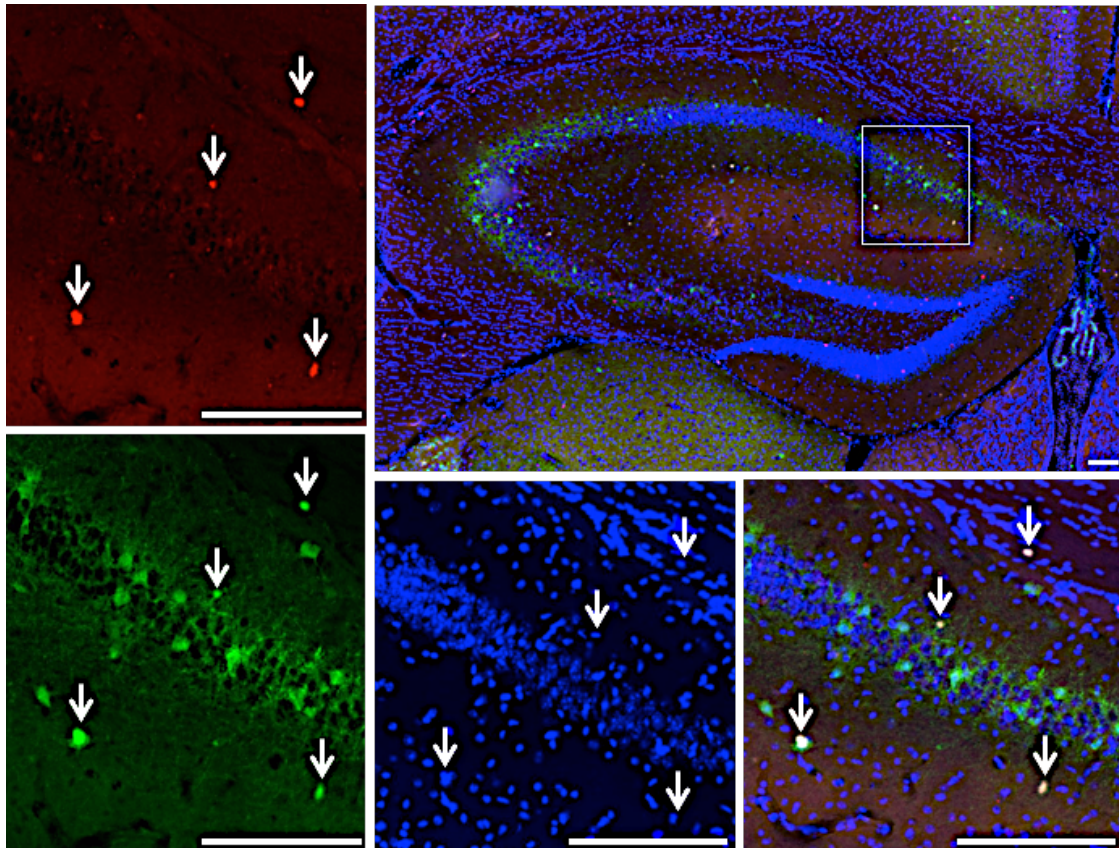


Abbildung 17: Immunfluoreszenzfärbung eines konditionierten *Tph2*^{+/-} Tieres mit separater Darstellung des c-Fos, Parvalbumin und DAPI Kanals

Die Bilder zeigen eine c-Fos/Parvalbumin Immunfluoreszenzdoppelfärbung. Vergrößert dargestellt ist ein Ausschnitt aus Cornu Ammonis (CA)1. Die vier c-Fos-ir bzw. Parvalbumin-ir Zellen sind jeweils mit Pfeilen gekennzeichnet. Durch die Überlagerung ergibt sich das Bild von gelb gefärbten Zellen. Maßstab: 100 μ m, Bregma: -1,34.

In Abbildung 17 ist eine solche Parvalbumin/c-Fos Doppelfärbung einer konditionierten *Tph2*^{+/-} Maus dargestellt. Die Ausschnitte zeigen die Vergrößerung der Kanäle des untersuchten Gebietes aus CA1. In der Übersichtsaufnahme ergab sich durch die Überlagerung der PV-ir Zellen (grün) und der c-Fos-ir Zellen (rot) eine gelbe Färbung. In *Tph2*^{+/-} Tieren wurden c-Fos-/Parvalbumin-ir

Zellen vermehrt in der Pyramidenzellschicht der CA1 (Abb. 17) und CA3 Region, aber auch vereinzelt im Str. rad. gefunden.

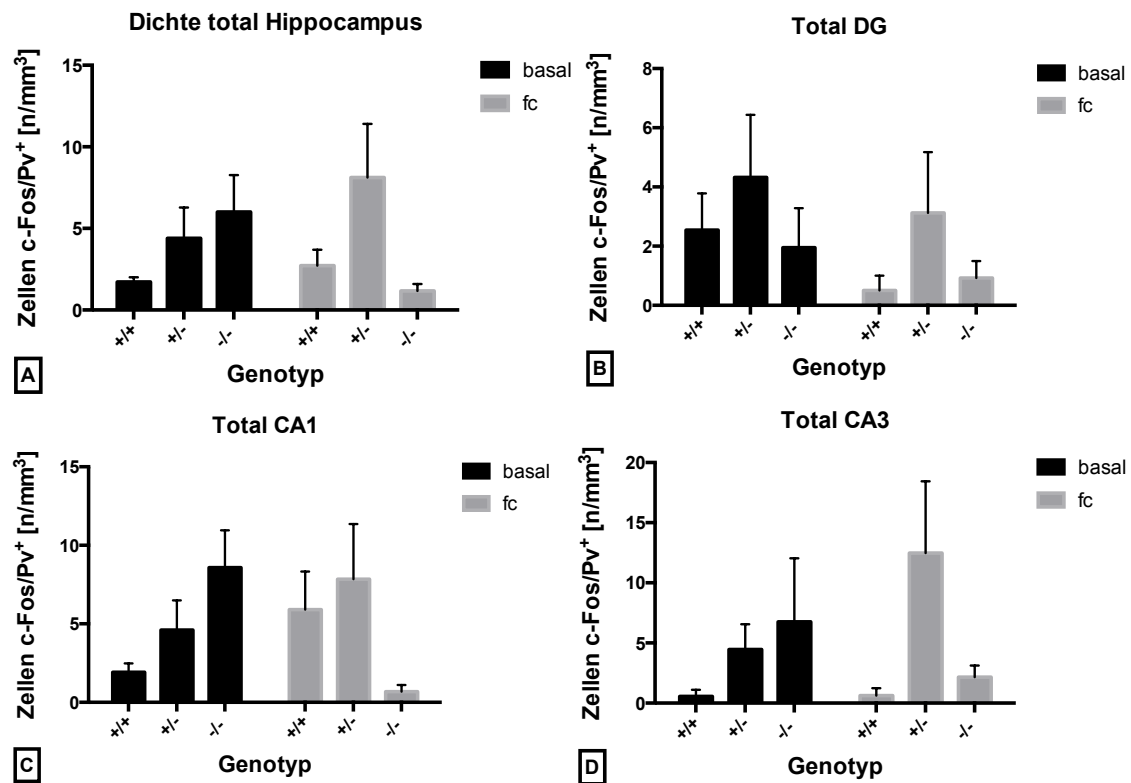


Abbildung 18: Darstellung der Zelldichte der Parvalbumin/c-Fos doppelgefärbten Zellen im gesamten dorsalen Hippocampus sowie in den Unterregionen DG, CA1 und CA3

Die vier Graphen zeigen die Zelldichten der Parvalbumin/c-Fos Doppelfärbung im gesamten dorsalen Hippocampus und den drei jeweiligen Unterregionen Gyrus dentatus (DG), Cornu Ammonis (CA)1 und CA3. Es konnte in keiner Unterregion bzw. im gesamten dorsalen Hippocampus ein signifikanter Unterschied zwischen den nicht-konditionierten und den konditionierten Tieren festgestellt werden. Mittelwert + SEM (Standardfehler).

Abbildung 18 zeigt die Zelldichte der Parvalbumin/c-Fos doppelgefärbten Zellen im gesamten dorsalen Hippocampus sowie in den drei Unterregionen. Dazu wurden die nukleären c-Fos-ir/PV-ir Zellen ausgewertet. Im dorsalen gesamten Hippocampus (Abb. 18A) war eine Tendenz zu einer Genotypeneffekt x Konditionierungs-Interaktion ($F_{(2,24)} = 2,77, p = 0,082$) zu beobachten, die jedoch nach Korrektur auf multiples Testen im Post-hoc Test keine signifikanten Unterschiede ergab. Gleiches gilt für die CA1 Unterregion ($F_{(2,24)} = 4,77, p = 0,012$) wo die Interaktion in der ANOVA sogar Signifikanz-Niveau erreicht. In

den Unterregionen DG ($F_{(2,24)} = 0,07$, $p = 0,93$), und CA3 ($F_{(2,24)} = 1,76$, $p = 0,19$) konnten keine Signifikanzen (Abb. 18B-D) nachgewiesen werden.

3.5 Die granuläre Färbung

Im Nachfolgenden wurden die granulären c-Fos-ir Zellen mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse untersucht.

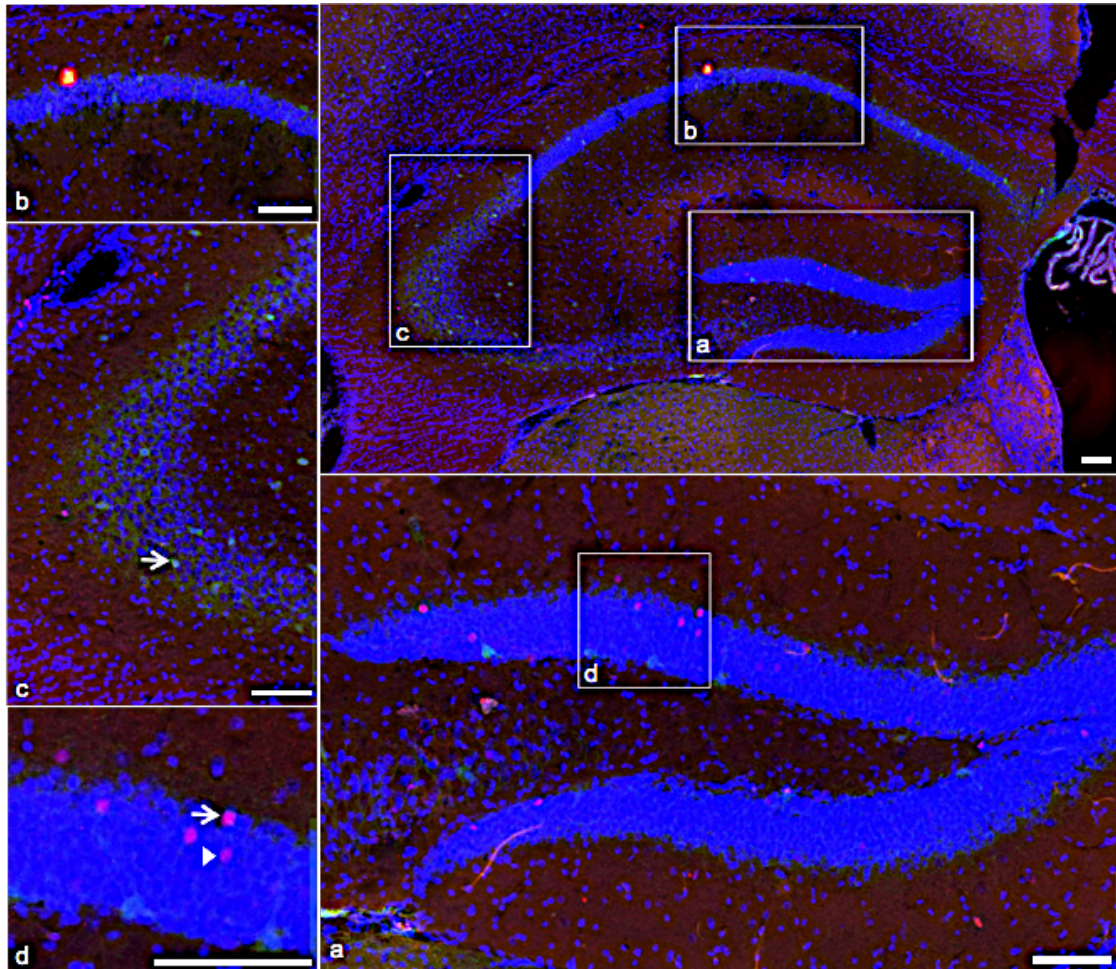


Abbildung 19: Immunofluoreszenzfärbung von c-Fos einer nicht-konditionierten *Tph2*^{-/-} Maus

Die Abbildung zeigt eine nicht-konditionierte *Tph2*^{-/-} Maus. (a) zeigt einen Ausschnitt der Unterregion Gyrus dentatus (DG), (b) aus Cornu Ammonis (CA)1 und (c) aus CA3. (d) zeigt die Unterregion DG nochmals vergrößert. In (c) ist eine Parvalbumin-ir Zelle mit einem Pfeil gekennzeichnet, in (d) mit dem Pfeil eine c-Fos-ir Zelle bzw. mit der Pfeilspitze eine granuläre c-Fos-ir Zelle. Maßstab: 100 µm (a) bis (c); 50 µm in (d), Bregma: -1,70.

Abbildung 19 zeigt die Färbung der c-Fos- und Parvalbumin-ir Zellen einer nicht-konditionierten *Tph2*^{-/-} Maus (Abb. 19a-d). Es ist deutlich ersichtlich, dass

der nicht-konditionierte *Tph2*^{-/-} Genotyp im Vergleich zu seinem konditionierten Pendant (Abb. 15) weniger c-Fos-ir Zellen zeigt. Besonders hervorzuheben ist dabei die Unterregion DG (Abb. 19a, d vs. Abb. 15a, d).

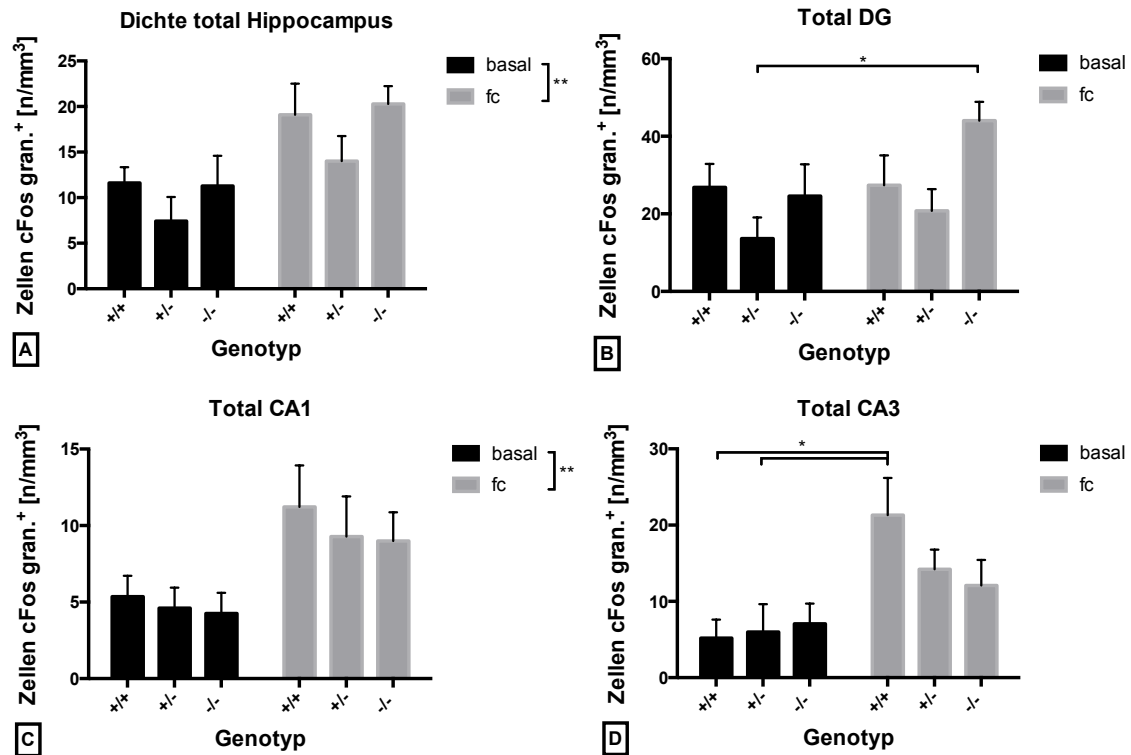


Abbildung 20: Darstellung der Zelldichte der granulären c-Fos-ir Zellen im gesamten dorsalen Hippocampus sowie in den Unterregionen DG, CA1 und CA3

Die Abbildung zeigt die Zelldichten der granulären c-Fos-ir Zellen. Im gesamten dorsalen Hippocampus (A), als auch in den Unterregionen Cornu Ammonis (CA)1 (C) und CA3 (D) war der generelle Konditionierungseffekt nachweisbar. Die furchtkonditionierten Tiere wiesen eine signifikant höhere granuläre c-Fos Zelldichte auf als ihre nicht-konditionierten Vergleichstiere. Daneben war in der Unterregion DG (B) ein Genotypeneffekt festzustellen. Die granuläre c-Fos Zelldichte wurde durch die Behandlung der Tiere bzw. durch den jeweiligen Genotyp beeinflusst. Es kam zu keiner Interaktion. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Mittelwert + SEM (Standardfehler).

Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab bei der Zelldichte der granulären c-Fos-ir Zellen im gesamten dorsalen Hippocampus (Abb. 20A) einen generellen Konditionierungseffekt ($F_{(1,24)} = 12,07$, $p = 0,002$). Interaktionseffekte waren nicht zu beobachten. Im DG (Abb. 20B) konnte ein Genotypeneffekt mit $F_{(2, 24)} = 3,57$, $p = 0,0440$ festgestellt werden. Dabei zeigte der Post-hoc Test, dass die Zelldichte der konditionierten *Tph2*^{-/-} Tiere im Vergleich zu den nicht-

konditionierten *Tph2^{+/-}* Tieren erhöht war ($p = 0.035$). In den Unterregionen CA1 und CA3 (Abb. 20C, D) war jeweils, ebenso wie im gesamten dorsalen Hippocampus, ein genereller Konditionierungseffekt nachweisbar. In CA1 ergab sich eine Beeinflussung durch die Konditionierung mit $F_{(1,24)} = 10,03$, $p = 0,004$, in CA3 mit $F_{(1,24)} = 12,70$, $p = 0,002$. In den beiden Unterregionen ergab die Statistik keine Tendenzen.

4. Diskussion

4.1 Furchtkonditionierung aktiviert Neurone im dorsalen Hippocampus

Das Ziel dieser Dissertation war die Charakterisierung konstitutiver *Tph2* KO Mäuse nach dem Furchtkonditionierungstest mit dem besonderen Blick auf neuronale Aktivierung.

Bei *Tph2* KO Tieren wurde ein verstärktes Furchtlernen festgestellt (Gutknecht, Popp et al. 2015). Diese Dissertation zeigt, dass Furchtkonditionierung die Anzahl der *c-Fos*-ir Zellen im gesamten dorsalen Hippocampus und bei genauerer Betrachtung in der Unterregion des DG der 5-HT defizienten *Tph2* Mäuse signifikant erhöhte. Die beiden anderen Unterregionen wiesen bezüglich der *c-fos* Aktivierung ebenfalls eine Erhöhung der Zellzahl nach Furchtkonditionierung bei den KO Mäusen auf.

Dies zeigt, dass der dorsale Hippocampus in einem neuen unbekanntem Kontext aktiviert wurde. 5-HT scheint hierbei einen per se inhibitorischen Einfluss gehabt zu haben. Fiel dieser weg, kam es zu einer deutlich verstärkten Aktivierung der Zellen in CA1 sowie der Körnerzellen in der Körnerzellschicht des DG.

Im Falle der Subgruppe der PV-produzierenden GABAergen inhibitorischen Interneurone wurden keine signifikanten Unterschiede beobachtet. Es scheint so zu sein, dass durch die Furchtkonditionierung keine weiteren PV-ir Interneurone angeregt wurden, was schließlich zu keiner veränderten Aktivität führte.

4.2 c-Fos tritt in zweierlei Erscheinungsformen auf

Interessanterweise konnten zwei unterschiedliche Erscheinungsformen der *c-Fos* Färbung festgestellt werden. Zum einen die nukleäre Färbung, zum anderen die granuläre Färbung. Die granuläre Färbung stellte sich dabei als diffus versprengte Färbung im Zellleib dar. Die nukleäre Färbung ist dadurch gekennzeichnet, dass der Kern homogen rot gefärbt war.

Als eines der bestuntersuchten *immediate early genes* stellt *c-fos* einen modulierenden Transkriptionsfaktor dar. Nach Translation und Rückkehr in den Zellkern bildet es mit Mitgliedern der Jun-Familie Heterodimere. Dieser so gebil-

der Activating Protein- (AP-1) Bindungskomplex kann als zelluläres Protein an die Promotorregion vieler Gene der DNA binden und somit die Transkription der Gene, aber auch von *c-fos* selbst, aktivieren oder inhibieren. Nach 30 Minuten erreicht die *c-fos* mRNA einen Konzentrationshöhepunkt und fällt schließlich mit einer Halbwertszeit von ca. 12 Minuten wieder ab (Morgan and Curran 1991). Die Transkription von *c-fos* selbst wird durch multiple Signalwege gesteuert und beeinflusst. Eine Reihe von Stimuli physiologischer aber auch nicht-physiologischer Art können eine mRNA Produktion in diversen Hirnregionen verursachen. Dazu gehören mitunter Neurotransmitter, Stress sowie Schmerzreize oder weitere sensorische Reize. Die Induktion der c-Fos Expression spiegelt also die funktionale Aktivität der Neurone im Gehirn wieder. Die Produktion des c-Fos Proteins ist dabei nach ca. 60-180 Minuten maximal (Dragunow and Faull 1989). Die Metabolisierung des c-Fos Proteins kann ebenso wie die Bildung unterschiedlich rasch erfolgen. Die granuläre Färbung könnte in dem Zusammenhang auf sich bereits im Abbau befindliches Protein hindeuten welches sich in Vakuolen (Lysosomen) befindet. Der Anti-c-Fos Antikörper ist außerdem ein unspezifischer Antikörper der neben den c-Fos Proteinen auch Jun-Proteine der Jun-Familie färbt. Eine daraus resultierende granuläre Färbung ist denkbar (Morgan and Curran 1991). Für die c-Fos-ir/PV-ir-Doppelmarkierungen wurden nur die nukleären c-Fos-ir/PV-ir Zellen ausgewertet, da nur die aktiven PV-ir Interneurone analysiert werden sollten.

4.3 Bedeutung von 5-HT für die neuronale Aktivierung des dorsalen Hippocampus

Der Hippocampus wird von zwei vorherrschenden Neuronentypen mit unterschiedlichen Transmittersystemen gebildet: Die Interneurone lassen sich nach morphologischen, neurochemischen und physiologischen Klassen differenzieren. Sie benutzen Gamma-Amino-Buttersäure (GABA) als inhibitorischen Neurotransmitter. Nach neurochemischen Aspekten werden Neuropeptide und calciumbindende Proteine unterschieden. Zu der Gruppe der Neuropeptide im Hippocampus gehören Somatostatin- und Cholecystokin-positive Interneurone, zu der Gruppe der calciumbindenden Proteine Calretinin-, Calbindin- und

die in dieser Dissertation untersuchten Parvalbumin-positiven Interneurone (Maccaferri and Lacaille 2003). 2/3 der Interneurone präsentieren sich dabei im Hippocampus proprius, während 1/3 im DG zu finden ist. Das Verhältnis von Interneuronen zu Körner- bzw. Pyramidenzellen kommt in der gesamten hippocampalen Formation auf ca. 6:100, mit einem signifikanten Unterschied zwischen dem Bereich des Ammonshorns („Cornu Ammonis (CA)“) mit 9,5:100 und dem DG mit 2,8:100. Dieser insgesamt geringe Anteil der hemmenden Interneurone lässt erkennen, dass auch nur ein begrenzter Verlust der GABAergen Neurone eine funktionelle Auswirkung auf den ganzen Hippocampus haben kann (Czeh, Abraham et al. 2013). Daneben gibt es noch die glutamatergen Körnerzellen des DG und die ebenfalls glutamatergen Pyramidenzellen der CA Unterregionen. Glutamat fungiert hier als exzitatorischer Neurotransmitter. Neben diesen Neuronentypen sind noch weitere Zelltypen im Hippocampus zu finden, z. B. die zu den Gliazellen zählenden Astrozyten sowie Mikrogliazellen. Mit Aufgaben wie Ernährung, Isolation und Schutz der Neuronen sind sie von großer Wichtigkeit.

Da c-Fos ein genereller Marker der Aktivität von Neuronen ist (Dragunow and Faull 1989), im Hippocampus jedoch vornehmlich glutamaterge als auch in GABAergen Neuronen als Transkriptionsfaktor aktiv ist, ist es möglich, dass ein großer Anteil der c-Fos-ir sowohl die glutamatergen Körnerzellen als auch Pyramidenzellen in der CA1 Region aktiviert. Gleichzeitig scheinen jedoch auch GABAerge Zellen durch Kontextkonditionierung aktiv zu werden. Informationen der limbischen Strukturen werden unter der Kontrolle des GABAergen Netzwerkes verarbeitet, sodass das inhibitorische System mit der Pathogenese von Angst und affektiven Störungen assoziiert werden kann (Lydiard 2003, Puig and Gullledge 2011). *In vitro* und *in vivo* Studien haben einen morphogenen Effekt von 5-HT auf die Etablierung und Differenzierung der GABAergen Neurone gezeigt, so z. B. kann 5-HT in der späten embryonalen Entwicklung die Migration der GABA Zellen mittels des 5-HT₆-Rezeptors beeinflussen (Gaspar, Cases et al. 2003, Riccio, Potter et al. 2009). Waider et al. zeigten 2012 mit einer Studie die Einflüsse der gezielten Inaktivierung der zentralen 5-HT Synthese auf das GABAerge System unter anderem im Hippocampus. Wie in der

genannten Studie soll in dieser Dissertation der dorsale Hippocampus betrachtet werden, da dorsaler und ventraler Teil des Hippocampus miteinander verbunden sind, aber funktionell als separate Untereinheiten in verschiedenen neuronalen Netzwerken agieren. Es gibt Nachweise dafür, dass der dorsale Anteil an Kontext abhängigen Lernprozessen beteiligt ist (Chowdhury, Quinn et al. 2005). Da diese Dissertation die molekularen Vorgänge nach dem Furchtkonditionierungsprozess beleuchtet, soll ebenfalls der dorsale Hippocampus betrachtet werden. Waider et al. stellten eine signifikante Erhöhung der GABA-Konzentration im dorsalen Hippocampus fest. Da 5-HT Neurone des *medianen raphe Nucleus* GABAerge Calbindin-bindende Interneurone sowie vasoaktiv intestinales Polypeptid/Cholezystokinin-bindende Interneurone via 5-HT₃-Rezeptor aktivieren und einen Anstieg der GABA Konzentration bedingen, war beim Wegfall von 5-HT eine Reduktion der GABA Konzentration zu erwarten. Interessanterweise steuern 5-HT Fasern die bereits erwähnten Subtypen der GABAergen Interneurone unterschiedlich stark an. Die Hauptziele sind Calbindin-positive Interneurone (Freund, Gulyas et al. 1990), wohingegen PV-ir Interneurone nicht so stark innerviert werden (Gulyas, L. et al. 1999). Die Tatsache, dass nach unseren Befunden keine Genotyp-spezifischen Unterschiede in der Aktivierung von hippocampalen PV-Neuronen nach Konditionierung gefunden wurden, scheint für einen relativ geringen Einfluss von 5-HT auf diese Neurone zu sprechen. Jedoch müssen die Ergebnisse kritisch und unter gewissen Einschränkungen betrachtet werden. Die Aktivierung der inhibitorischen Interneurone kann auch durch die 5-HT-Defizienz bedingten Entwicklungsstörungen beeinflusst worden sein. Zusätzlich spielen noch andere Transmittersysteme bei der Aktivierung des GABAergen Systems eine entscheidende Rolle. Es ist bekannt, dass Parvalbumin-ir und weitere Untergruppen der inhibitorischen Korbzellen durch cholinerge septo-hippocampale Afferenzen via cholinerge Rezeptoren aktiviert werden (Gulyas, L. et al. 1999). Insgesamt bleibt zu sagen, dass solange die komplexen Vorgänge bei der Aktivierung des hippocampalen GABAergen Neuronennetzwerkes nicht ganz geklärt sind, einfache Hypothesen zu deren Veränderung nicht möglich bzw. nur schwer zu beweisen sind.

4.4 c-Fos Erhöhung in der Unterregion des DG bei *Tph2*^{-/-} Tieren

In dieser Dissertation wurde ebenfalls das zelluläre Aktivierungsmuster der c-Fos positiven Zellen untersucht. Es kann davon ausgegangen werden, dass c-fos von den exzitatorischen glutamatergen Körnerzellen, aber auch von GABA-ergen Interneuronen exprimiert wird. Es sei hier nochmals auf die trisynaptische Verschaltung im Hippocampus hingewiesen. Die Informationen kommen vom Cortex entorhinalis als Tractus perforans zunächst an der Eingangsstation des DG an. Hier empfangen die Körnerzellen mittels der distalen Dendriten die Erregung und geben sie über ihre Axone, den exzitatorischen Moosfasern, an die Pyramidenzellen in CA3 weiter. Die Pyramidenzellen dieser Unterregion geben als zweite Schaltstation die eingehenden Signale via erregender Schaffer-Kollaterale an die Pyramidenzellen der CA1 Region weiter. In der letzten Station wird die Information schließlich über Alveus bzw. Fimbria an weiterführende Hirnstrukturen weiter oder auch über das Subiculum an die Eingangsstation zurück geleitet (Andersen, Morris et al. 2006).

Der Kernbefund der Untersuchungen war eine signifikante Erhöhung der c-Fos positiven Zellen der *Tph2*^{-/-} Mäuse nach Konditionierung, bevorzugt in der Unterregion des DG. Waider et al. entdeckten 2012 in der bereits genannten Studie nahezu gleiche Glutamatkonzentrationen bei *Tph2*^{+/+}, *Tph2*^{+/-} und den *Tph2*^{-/-} Tieren. Es stellt sich nun die Frage wie die starke Erhöhung der c-Fos-ir Zelldichte bei den KO Tieren nach dem Furchtkonditionierungstest zustande kam. Dazu sei zuerst auf die Besonderheiten der Signalverarbeitung durch die Körnerzellen hingewiesen. Charakteristisch für die Körnerzellen im Hippocampus ist der stark verzweigte Dendritenbaum. Aufgrund der Abschwächung der Signale durch die Dendriten haben einzelne Synapsen nur geringen Einfluss auf die Aktivität der Körnerzellen, so dass es mehrere (ca. 55) Synapsen bedarf um ein Aktionspotential zu erzeugen. Im Vergleich dazu benötigen Pyramidalneurone nur ca. 5 Synapsen damit ein Aktionspotential erzeugt wird. Zudem arbeiten die Körnerzellen linear (Krueppel, Remy et al. 2011), d. h. es kommt zu keiner Signalverstärkung. Auch bei zeitgleichem Eintreffen von erregenden Signalen feuern die Körnerzellen weiterhin Aktionspotentiale ohne Zunahme – die Zellen zeigen sich unbeeinflusst von dieser Synchronität. Ursächlich für

diese andersartige Verarbeitung sind sowohl weniger als auch andere spannungsabhängige Ionenkanäle. Der Sinn hinter diesen Besonderheiten der Körnerzellen wird kontrovers diskutiert. Womöglich stellen die Körnerzellen eine Art Filter dar, der die hohe Aktivität der vorgeschalteten Nervenzellnetzwerke in eine konzentriertere und gerichtete Form umwandelt (Krueppel, Remy et al. 2011). Der DG bzw. die im Str. gr. lokalisierten Körnerzellen können somit als eine Art Eingangs- und Vorverarbeitungsstation gesehen werden. Wenn ähnliche Informationen in die Hirnstruktur eintreffen werden sie in einzelne individuelle Details aufgespalten und damit die Verarbeitung in dem CA3 Segment vorbereitet.

Die in der vorliegenden Arbeit dokumentierte vermehrte Aktivierung von Neuronen des DG ist sehr wahrscheinlich zum großen Teil auf eine erhöhte Anzahl aktivierter Körnerzellen zurückzuführen. Das Ergebnis der c-Fos-ir/PV-ir-Doppelmarkierungen, in denen ja keine Vermehrung, eher eine Verringerung des Anteils an c-Fos-ir/PV-ir Zellen bei KO-Mäusen gefunden wurde, zeigt, dass es die PV-ir Interneurone wohl nicht waren. Darüber hinaus gibt es insgesamt nur relativ wenige Interneurone im DG. Diese erhöhte Körnerzellaktivierung deutet auf eine im Vergleich zu den anderen Genotypen intensivierte Vorverarbeitung der durch den Hippocampus geleiteten Information bei den KO-Tieren hin. Die Ergebnisse lassen weiterhin vermuten, dass 5-HT entweder akut oder über Entwicklungs-Beeinflussung eine Bedeutung für die Modulation der Körnerzellaktivierung hat. Eine mögliche Schlussfolgerung ist, dass eine lebenslang physiologische zentralnervöse 5-HT-Homöostase die konditionierungs-induzierte Körnerzellaktivierung eher zu inhibieren scheint. Diese unterschiedliche Aktivierung von Körnerzellen könnte eine Rolle für die Unterschiede in der Verhaltensantwort bzw. im Lernverhalten bei den verschiedenen Genotypen spielen.

5-HT und der 5-HT_{1A}-Rezeptor, der neben dem 5-HT₄-Rezeptor bevorzugt im DG exprimiert wird, übernehmen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Langzeit-Potenzierung. Die Langzeit-Potenzierung stellt eine Möglichkeit der synaptischen Plastizität und Gedächtniskonsolidierung dar. Voraussetzung ist die Generierung eines neuen Gedächtnisinhaltes – bei bekannten Inhalten

konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Die Induktion der Langzeit-Potenzierung wird über die Inhibition der GABAergen Interneurone vermittelt (Sanberg, Jones et al. 2006). Der 5-HT_{1A}-Rezeptor im DG der Körnerzellen ist außerdem notwendig um Depressionen und Angsterkrankungen suffizient mit Antidepressiva behandeln zu können. Es findet sich bei den genannten Erkrankungen eine reduzierte Dichte wie auch reduzierte 5-HT_{1A}-Rezeptor Bindung. Auch kommt dem 5-HT_{1A}-Rezeptor eine große Bedeutung während der Gehirnentwicklung zu, da durch seine Inaktivierung ein ängstlicher Phänotyp entsteht. Die Wiederherstellung der Expression des Rezeptors im adulten Organismus kann die Ängstlichkeit nicht abstellen (Gross and Hen 2004, Kriegebaum, Gutknecht et al. 2012). Zusätzlich kommt es bei der Furchtkonditionierung zu einer Synchronisierung der elektrischen Aktivität vom dorsalen Hippocampus und basolateraler Amygdala im Bereich der Theta Wellen (4 - 7,5 Hz) (Seidenbecher, Laxmi et al. 2003). Stress im Zuge der Furchtkonditionierung führt zudem zu hippocampalen Lern- und Gedächtnisdefiziten. Dieser Signalweg wird durch direkte glutamaterge Projektionen aus der basolateralen Amygdala ausgelöst. Entscheidende Faktoren stellen dabei die Cyclin-abhängige Kinase 5 und deren assoziiertes Protein p25 dar. p25 entsteht durch proteolytische Spaltung von p35. Die Cyclin-abhängige Kinase 5 phosphoryliert schließlich den Glucocorticoid-Rezeptor und bedingt über einen Anstieg der Histon-Deacetylase2 eine Suppression von Genen die wichtig sind für Lernen und Gedächtnis. Ein Entzug von p25 könnte dabei den Signalweg unterbrechen und somit den Hippocampus vor Lern- und Gedächtnisdefiziten schützen (Rei, Mason et al. 2015). Die Verknüpfung des Hippocampus mit anderen Hirnstrukturen wie z. B. die basolaterale Amygdala könnte ebenfalls die Ergebnisse beeinflusst haben.

Jedoch die Vorgänge als ganzes im DG zu verstehen bleibt im Angesicht zweier wesentlicher Schwierigkeiten offen: Zum einen fehlen fundierte, quantitative Daten über Zell- und Funktionseigenschaften sowie über die strukturellen Verbindungen. Zum anderen ist die Zahl der Neuronen bzw. der Synapsen sehr unterschiedlich, so finden sich z. B. bei Nagetieren nur ca. eine Million Körnerzellen, beim Menschen hingegen ca. 10 Millionen Körnerzellen im DG (Jonas

and Lisman 2014). So stellt die Etablierung eines geeigneten mit den humanen Verhältnissen vergleichbaren Tiermodells eine große Herausforderung für die Zukunft dar.

4.5 Beeinflussung der adulten Neurogenese durch den 5-HT Mangel

Die Subgranularschicht des DG ist neben der Subventrikularzone ein Ort des Gehirns, in welchem adulte Neurogenese stattfindet. Diese adulte Neurogenese scheint bei der Gedächtnisbildung eine entscheidende Rolle zu spielen. Neue Erinnerungen könnten bevorzugt durch neu gebildete Körnerzellen des DG generiert werden, so dass eine potentielle Möglichkeit für die Unterscheidung mehrerer Bilder ähnlicher Ereignisse entsteht (Nakashiba, Cushman et al. 2012). Zudem wird die Neurogenese mit einem verbesserten räumlichen Gedächtnis assoziiert. Dies wurde an Versuchstieren im Labyrinth bestätigt (Bliss). Die Lernprozesse, die die Tiere in den Versuchen dieser Dissertation durchliefen, könnten für eine angeregte adulte Neurogenese sprechen. Gutknecht et al. zeigten ein verstärktes räumliches Kontextgedächtnis bei *Tph2*^{-/-} Tieren im Vergleich zu den *Tph2*^{+/-} und *Tph2*^{+/+} Tieren auf. Ein weiterer Impuls für adulte Neurogenese scheint außerdem Bewegung zu sein. So konnte bewiesen werden, dass körperliche Aktion vermehrte Ausschüttung von 5-HT bewirkt und in Folge dessen zu verstärkter Bildung von Neuronen-Vorläuferzellen führt. 5-HT fördert gleichermaßen die Ausreifung jener Vorläuferzellen zu adulten Neuronen. Mäuse die durch Genveränderung kein 5-HT bilden zeigen jedoch eine normale Nervenzellneubildung, wobei sich ein Teil der neu gebildeten Stammzellen nicht weiterentwickelt oder gar abstirbt. Kompensierend zeigen diese Mäuse eine verstärkte Teilung der Vorläuferzellen um die Gesamtzellzahl aufrecht zu erhalten. Unter den 5-HT defizienten Mäusen wurde unter den sportlichen Tieren kein Zuwachs an Neuronen festgestellt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass 5-HT nicht unabdingbar für die adulte Neurogenese ist, jedoch eine Steigerung der Bildung durch Bewegung nur bei ausreichendem Transmitter Angebot möglich ist (Klempin, Beis et al. 2013). Allerdings hat der DG auch eine wesentliche, funktionelle Rolle bei Stress und Depressionen, z. B. wurde verstärkte Neurogenese bei Tieren festgestellt, die

dauerhaft mit Antidepressiva behandelt wurden (Malberg, Eisch et al. 2000). Die physiologischen Effekte von Stress, insbesondere die Freisetzung von Glucocorticoiden, im speziellen Kortikosteron bei Mäusen, sowie die Aktivierung des autonomen, viszeralen Nervensystems haben dagegen einen inhibitorischen Einfluss auf die Neurogenese. Dabei können sowohl endogene als auch exogene Glucocorticoide Psychosen und Depressionen hervorrufen (Gould, Tanapat et al. 1998, Jacobs, van Praag et al. 2000, Gutknecht, Popp et al. 2015). Aus diesen Erkenntnissen lässt sich ableiten, dass die genannte Unterregion des Hippocampus auch eine wichtige Rolle bei der Modulierung von Stress- und Depressionssymptomen spielt (Surget, Tanti et al. 2011). Die Befunde der vorliegenden Studie, die die Verhältnisse bei einem zentralnervösen 5-HT Mangel dokumentieren, können mit den beschriebenen Erkenntnissen nicht leicht in Einklang gebracht werden. Zudem scheint der per se inhibitorische Effekt von 5-HT auf die Aktivierung des dorsalen Hippocampus aufgehoben zu sein, was eine Erklärung für die starke Aktivierung darstellen könnte.

Neueste Studien zeigten zudem eine Beeinflussung der adulten Neurogenese durch die Parvalbumin-ir Interneuronenaktivität (PV+ Zellen). Die konditionierungsabhängige Formbarkeit des PV-Interneuronennetzwerkes steuert demnach Gedächtniskonsolidierung und Lernprozesse. Es können dabei zwei unterschiedliche Neuronenpopulationen gefördert werden: Durch positive Konditionierung wird die Bildung niedrig-exprimierter (geringe PV Expression) Korbzellen mit geringer Synapsendichte gesteigert. Durch Furchtkonditionierung wird hingegen ein hoch-exprimiertes (hohe PV Expression) Interneuronennetzwerk mit hoher inhibitorischer Synapsendichte begünstigt. Studien zufolge kann das niedrig-exprimierte Netzwerk die Gedächtnisbildung fördern, wohingegen sie durch das hoch-exprimierte Netzwerk, das durch Furchtkonditionierung entsteht, gehemmt wird. Diese zwei verschiedenen Zustände sind fließend und gehen z. B. nach erfolgreichem Lernprozess im Labyrinth von der niedrigen- in die hoch-exprimierte Form über. Der gegensätzliche Übergang von hoch- zu niedrigem Zustand beinhaltet einen erhöhten Gehalt an vasoaktiv-intestinalen- Polypeptid (VIP) positiven GABAergen Übertragungen

auf die PV+ Interneurone. Es kann somit eine starke Variation der Interneuronennetzwerke über lernabhängige VIP Modulationen festgestellt werden. Diese Erkenntnisse sind von großer Bedeutung und ermöglichen in der Zukunft möglicherweise Strategien, um kognitive Lernvorgänge zu fördern und Neuronen zu schützen (Donato, Rompani et al. 2013).

Außerdem bedingt die Aktivierung der PV+ Zellen zum einen ein erhöhtes Überleben der neugebildeten Neuronen zum anderen führt sie zur Inhibition der adulten Stammzellaktivierung. Die Vorteile dieser konträren Vorgänge könnten in der Förderung der adaptiven Regulierung der adulten Neurogenese liegen: Das Fehlen der neuronalen Aktivität minimiert die Notwendigkeit der Unterhaltung und Entwicklung frisch gebildeter Neurone, regt jedoch den neuronalen Stammzellpool für die bevorstehende Teilung und Aktivierung an. Zudem erleichtert es den Neuronen das Überleben und die Entwicklung durch aktive Phasen bei zeitgleicher Suppression der Neuentstehung von Neuronen (Song, Sun et al. 2013).

Diese zweigleisige Regulierung könnte sowohl der temporalen Speicherung als auch der Gedächtnislöschung Vorteile bringen. Es kann allerdings auch hier ein Einfluss anderer Transmittersysteme nicht ausgeschlossen werden. Die Weiterentwicklung und Erforschung dieser Vorgänge könnte möglicherweise zu einer Entwicklung neuer Strategien zur besseren RepARATION von endogenem oder transplantiertem neuronalen Gewebe wie auch der Heilung von degenerativen Erkrankungen führen.

4.6 Konklusion und Aussicht

Diese Dissertation zeigte, dass *Tph2* mit Furcht bzw. mit Depressionen in Verbindung gebracht werden kann und dass der zentrale 5-HT Mangel eine starke Aktivierung des DG bei der Furchtkonditionierung erzeugte. Es wäre interessant zu erfahren, ob andere Hirnregionen, die vom dorsalen Hippocampus innerviert und angesteuert werden, Veränderungen durch den 5-HT Mangel zeigen. Hierzu sollten unter den gleichen Bedingungen der präfrontale Cortex, der Hypothalamus, die parabrachialen Kerne sowie das periaquäduktale Grau untersucht werden. Auch der laterale Hypothalamus scheint

bei Furchtreaktionen eine Rolle zu spielen und wird dabei aktiviert (LeDoux, Iwata et al. 1988). Die *Tph2* Inaktivierung führt zu einer kompletten Verarmung des Gehirns an 5-HT, aber auch die Noradrenalin- und Dopamin- Systeme scheinen verändert (Gutknecht, Araragi et al. 2012). Eine ausführliche Untersuchung wie diese Neurotransmittersysteme mit- und aufeinander einwirken, um ausgleichende und kompensierende Effekte verstehen zu können, wäre für die Zukunft empfehlenswert.

Da entwicklungsbedingte Effekte oder Kompensationsmechanismen nicht ausgeschlossen werden können, würde ein konditionaler induzierbarer *Tph2* KO die präzise Analyse der 5-HT Funktion im adulten Gehirn ermöglichen. Zudem entsteht der Mangel an 5-HT, der mit neuropsychiatrischen Dysfunktionen in Verbindung gebracht wird, oftmals erst im Laufe des Lebens. Die Kombination eines induzierbaren Knockouts mit der Inaktivierung von *Tph2* speziell in den serotonergen zentralen Neuronen wäre daher eine gute Möglichkeit den 5-HT Mangel zu einem beliebigen Zeitpunkt zu untersuchen und daher womöglich Depressions- bzw. Angsterkrankungen noch besser verstehen zu können.

Zu diesem Zweck werden für die Untersuchung Mäuse verwendet, die die Tamoxifen-abhängige Cre-ER^{T2} Rekombinase speziell in den zentralen serotonergen Neuronen exprimieren. Im Experiment wurden bei Cre-ER Tieren, die die Cre-ER Rekombinase mit dem 5-HT spezifischen Pet-1 Transkriptionsfaktor besaßen, dennoch *Tph2*-positive Zellen nachgewiesen. Somit wurde auch 5-HT im Gehirn (Kriegebaum, Song et al. 2010) festgestellt. Ohne den zellspezifischen Promotor Pet-1 konnten gute Ergebnisse erzielt werden, sodass dieses System für weiterführende Studien herangezogen werden sollte.

5. Zusammenfassung

Veränderungen des zentralen serotonergen Systems können mit diversen psychiatrischen Krankheiten wie z. B. Depressionen, Aufmerksamkeitsdefizit/Hyperaktivitäts-Störung (ADHS), Phobien oder Panik- und Angststörungen assoziiert werden. Die fortlaufende Untersuchung des Neurotransmitters Serotonin (5-HT) und seine Bedeutung für physiologische und verhaltensbezogene Prozesse ist daher unerlässlich. Tiermodelle, die auf Ausschaltung elementarer oder assoziierter Gene des serotonergen Systems beruhen, sind infolgedessen eine ausgezeichnete Möglichkeit anatomische, (patho)physiologische und verhaltensbezogene Auswirkungen eines fehlgeleiteten serotonergen Systems zu untersuchen und zu analysieren. Aufgrund ihrer großen Bedeutung für Lern- und Gedächtnisprozesse steht die Hirnregion des dorsalen Hippocampus im Fokus dieser Dissertation. Die Analyse umfasste jeweils die gesamte Hirnstruktur des Hippocampus bzw. seine Unterregionen, Gyrus dentatus (DG), Cornu Ammonis (CA)1 und CA3.

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung zellulärer bzw. molekularer Veränderungen von konstitutiven Tryptophanhydroxylase 2 (*Tph2*) knockout (KO) Mäusen. Durch die Inaktivierung von *Tph2* und damit dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym (TPH2) der Serotoninsynthese, wurde im zentralen Nervensystem (ZNS) der KO Mäuse ein Mangel von 5-HT festgestellt. Der dorsale Hippocampus wurde auf zellspezifische Veränderungen nach dem Furchtkonditionierungstest analysiert. Die Reaktion der Neurone in den drei Unterregionen der Hirnstruktur wurde durch Immunfluoreszenzfärbung des „immediate-early“ Genprodukts *c-fos* bzw. des Calcium-bindenden Proteins Parvalbumin untersucht. Es wurde dabei zum einen die absolute Zellzahl in den Strukturen erfasst und zum anderen die Analyse bezüglich des Volumens vorgenommen. Die Zelldichte von *c-Fos* wies signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen im gesamten dorsalen Hippocampus und bei genauerer Betrachtung in der Unterregion des DG auf. Die *Tph2*^{-/-} Mäuse zeigten nach dem Furchtkonditionierungstest eine prägnante Erhöhung der aktivierten Zellen. Es scheint, dass 5-HT eine zu starke Aktivierung des dorsalen Hippocampus

verhindert um schlechte kontextbezogene Gedächtnisinhalte nicht zu verfestigen. Dabei inhibiert 5-HT Zellen im DG und der CA1 Region die nicht zu den Parvalbumin-immunoreaktiven GABAergen Interneuronen gehören.

6. Anhang

6.1 Quellenverzeichnis

Online Quellen

Wikipedia

(http://de.wikipedia.org/wiki/Serotonin#mediaviewer/Datei:Serotonin_Biosynthese.svg)

Wikipedia

(<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ab/HippocampalRegions.jpg>)

Paper, Bücher und Web Pages

Abrams, J. K., et al. (2005). "Serotonergic systems associated with arousal and vigilance behaviors following administration of anxiogenic drugs." Neuroscience **133**: 983-997.

Alenina, N., et al. (2006). "Specification and Differentiation of Serotonergic Neurons." Stem Cell Reviews **2**: 5-10.

Amaral, D. G. and M. P. Witter (1989). "The three dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data." Neuroscience **31**: 571-591.

Amaral, D. G. and M. P. Witter (1995). The hippocampal formation. In: the rat nervous system, 2nd ed (Paxinos G, ed.). San Diego, Academic Press.

Amat, J., et al. (2005). "Medial prefrontal cortex determines how stressor controllability affects behavior and dorsal raphe nucleus." Nature Neuroscience **8**: 365-371.

Andersen, P., et al. (2006). The Hippocampus book., Oxford University Press.

Azevedo, F. A., et al. (2009). "Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain." The Journal of comparative neurology **513**: 532-541.

Baker, K. G., et al. (1991). "Cytoarchitecture of serotonin-synthesizing neurons in the pontine tegmentum of the human brain." Synapse (New York, N.Y.) **7**: 301-320.

Baker, K. G., et al. (1990). "Cytoarchitecture of the human dorsal raphe nucleus." The Journal of comparative neurology **301**: 147-161.

Barbosa, R. M., et al. (1998). "Control of pulsatile 5-HT/insulin secretion from single mouse pancreatic islets by intracellular calcium dynamics." The Journal of physiology **510**: 135-143.

Barnes, N. M. and T. Sharp (1999). "A review of central 5-HT receptors and their function." Neuropharmacology **38**: 1038-1152.

Beaulieu, J. M., et al. (2008). "Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**: 1333-1338.

Bliss, R. M. (01.08.2007). Retrieved 13.02.2015, from <http://www.ars.usda.gov/is/ar/archive/aug07/aging0807.htm>.

Bouwknicht, J. A., et al. (2007). "Differential effects of exposure to low-light or high-light open-field on anxiety-related behaviors: relationship to c-Fos expression in serotonergic and non-serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus." Brain Research Bulletin **72**: 32-43.

Bröckel, J. (12.11.2010). Retrieved 07.02.2015, from <http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/fluoreszenz/fluoreszenz.htm>.

Bromet, E., et al. (2011). "Cross-national epidemiology of DSM-IV major depressive episode." BMC medicine **9**: 90.

Cameron, H. A., et al. (1998). "Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters." Journal of Neurobiology **36**: 287-306.

Champier, J., et al. (1997). "Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxyindol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets." Life Sciences **60**: 2191-2197.

Chowdhury, N., et al. (2005). "Dorsal hippocampus involvement in trace fear conditioning with long, but not short, trace intervals in mice." Behavioral Neuroscience **119**: 1396-1402.

Cordes, S. P. (2005). "Molecular genetics of the early development of hindbrain serotonergic neurons." Clinical genetics **68**: 487-494.

Côté, F., et al. (2003). "Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**: 13525-13530.

Cullinan, W. E., et al. (1995). "Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress." Neuroscience **64**: 477-505.

Czeh, B., et al. (2013). "Number and regional distribution of GAD65 mRNA-expressing interneurons in the rat hippocampal formation." Acta biologica Hungarica **64**: 395-413.

Dahlström, A. and K. Fuxe (1964). "Localization of monoamines in the lower brain stem." Experientia **20**: 398-399.

Davis, M., et al. (2010). "Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety." Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology **35**: 105-135.

Deckert, J., et al. (1999). "Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder." Human Molecular Genetics **8**: 621-624.

Deneris, E. S. and S. C. Wyler (2012). "Serotonergic transcriptional networks and potential importance to mental health." Nature Neuroscience **15**: 519-527.

Ding, Y. Q., et al. (2003). "Lmx1b is essential for the development of serotonergic neurons." Nature Neuroscience **6**: 933-938.

Donato, F., et al. (2013). "Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning." Nature **504**: 272-276.

Dragunow, M. and R. Faull (1989). "The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing." Journal of neuroscience methods **29**: 261-265.

Erspamer, V. and M. Vialli (1937). "Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini." Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie **27**: 81-99.

Feil, R., et al. (1996). "Ligand-activated site-specific recombination in mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**: 10887–10890.

Feil, R., et al. (1997). "Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains." Biochemical and biophysical research communications **237**: 752-757.

Finocchiaro, L. M., et al. (1988). "Serotonin and melatonin synthesis in peripheral blood mononuclear cells: stimulation by interferon-gamma as part of an immunomodulatory pathway." Journal of Interferon Research **8**: 705-716.

Fitzpatrick, P. F. (1999). "Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases." Annual review of biochemistry **68**: 355-381.

Freund, T., et al. (1990). "Serotonergic control of the hippocampus via local inhibitory interneurons." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87**: 8501–8505.

Frungieri, M. B., et al. (1999). "Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition." Neuroendocrinology **4**: 299-308.

Gaspar, P., et al. (2003). "The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics." Nature reviews. Neuroscience **4**: 1002-1012.

Gould, E., et al. (1998). "Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress ." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**: 3168-3171.

Gray, J. A. (1982). The Neuropsychology of Anxiety- An Enquiry into the Functions of the Septo-Hippocampal System, 1st edn. Oxford, Clarendon Press.

Green, A. R. (2008). "Gaddum and LSD: the birth and growth of experimental and clinical neuropharmacology research on 5-HT in the UK." British Journal of Pharmacology **154**: 1583-1599.

Green, C. B. and J. C. Beharse (1994). "Tryptophan hydroxylase expression is regulated by a circadian clock in *Xenopus laevis* retina." Journal of Neurochemistry **62**: 2420-2428.

Gross, C. and R. Hen (2004). "The developmental origins of anxiety." Nature reviews. Neuroscience **5**: 545-552.

Gross, C., et al. (2002). "Serotonin1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult." Nature **416**: 396-400.

Gulyas, A., et al. (1999). "Structural basis of the cholinergic and serotonergic modulation of GABAergic neurons in the hippocampus." Neurochemistry international **34**: 359-372.

Gulyas, A., et al. (1999). "Total Number and Ratio of Excitatory and Inhibitory Synapses Converging onto Single Interneurons of Different Types in the CA1 Area of the Rat Hippocampus." The Journal of Neuroscience **19**: 10082-10097.

Gutknecht, L., et al. (2012). "Impacts of brain serotonin deficiency following Tph2 inactivation on development and raphe neuron serotonergic specification." PLoS One **7**: e43157.

Gutknecht, L., et al. (2009). "Spatio-temporal expression of tryptophan hydroxylase isoforms in murine and human brain: convergent data from Tph2

knockout mice." European Neuropsychopharmacology The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology **19**: 266-282.

Gutknecht, L., et al. (2015). "Interaction of brain 5-HT synthesis deficiency, chronic stress and sex differentially impact emotional behavior in Tph2 knockout mice." Psychopharmacology (Berl) **232**: 2429-2441.

Gutknecht, L., et al. (2008). "Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in Tph2 knockout mice." Journal of neural transmission. General section **115**: 1127-1132.

Hale, M. W., et al. (2012). "Stress-related serotonergic systems: implications for symptomatology of anxiety and affective disorders." Cellular and Molecular Neurobiology **5**: 695-708.

He, M., et al. (2001). "Differential effects of 5-HT 1 A receptor deletion upon basal and fluoxetine-evoked 5-HT concentrations as revealed by in vivo microdialysis." Brain research **902**: 11-17.

Hettema, J. M., et al. (2001). "A Review and Meta-Analysis of the Genetic Epidemiology of Anxiety Disorders." The American Journal of Psychiatry **158**: 1568-1578.

Hirsch, M. (2000). Glossar der Neuroanatomie, Springer.

Hoess, R., et al. (1982). "P1 site-specific recombination: Nucleotide sequence of the recombining sites." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79**: 3398-3402.

Hornung, J.-P. (2003). "The human raphe nuclei and the serotonergic system." Journal of Chemical Neuroanatomy **26**: 331-343.

Jacobs, B. L., et al. (2000). "Adult brain neurogenesis and psychiatry- a novel theory of depression." Molecular psychiatry **5**: 262-269.

Jacobsen, J. P. R., et al. (2012). "Deficient serotonin neurotransmission and depression-like serotonin biomarker alterations in tryptophan hydroxylase 2 (Tph2) loss-of-function mice." Molecular psychiatry **17**: 694-704.

Jensen, P., et al. (2008). "Redefining the serotonergic system by genetic lineage." Nature Neuroscience **11**: 417-419.

Jonas, P. and J. Lisman (2014). "Structure, function, and plasticity of hippocampal dentate gyrus microcircuits." Front Neural Circuits **8**: 107.

Kempermann, G. (2002). "Why New Neurons? Possible Functions for Adult Hippocampal Neurogenesis." The Journal of Neuroscience **22**: 635-638.

Kempermann, G., et al. (1997). "More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment." Nature **386**: 493-495.

Kempermann, G., et al. (1998). "Experience-Induced Neurogenesis in the Senescent Dentate Gyrus." The Journal of Neuroscience **18**: 3206-3212.

Kiyasova, V., et al. (2011). "A genetically defined morphologically and functionally unique subset of 5-HT neurons in the mouse raphe nuclei." The Journal of Neuroscience **31**: 2756-2768.

Klempin, F., et al. (2013). "Serotonin Is Required for Exercise-Induced Adult Hippocampal Neurogenesis." The Journal of Neuroscience **33**: 8270-8275.

Kriegebaum, C., et al. (2012). "Serotonin Kompakt – Teil 1* Neurobiologische und entwicklungsgenetische Grundlagen. Serotonin Now: Part 1 Neurobiology and Developmental Genetics." Zeitschrift für Gastroenterologie **50**: 271-272.

Kriegebaum, C., et al. (2012). "Serotonin Kompakt – Teil 2 Verhaltensgenetik und Psychopathologie. Serotonin Now: Part 2 Behavioral Genetics and Psychopathology." Zeitschrift für Gastroenterologie **50**: 271-272.

Kriegebaum, C., et al. (2010). "Brain-specific conditional and time-specific inducible Tph2 knockout mice possess normal serotonergic gene expression in the absence of serotonin during adult life." Neurochemistry international **57**: 512-517.

Krueppel, R., et al. (2011). "Dendritic integration in hippocampal dentate granule cells." Neuron **71**: 512-528.

Lacroix, L., et al. (2000). "Differential role of the medial and lateral prefrontal cortices in fear and anxiety." Behavioral Neuroscience **114**: 1119-1130.

LeDoux, J. E., et al. (1988). "Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear." The Journal of Neuroscience **8**: 2517-2529.

Lesch, K.-P. and J. Waider (2012). "Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders." Neuron **76**: 175-187.

Lesch, K. P. and R. Mossner (1999). "Knockout Corner: 5-HT(1A) receptor inactivation: anxiety or depression as a murine experience." The international journal of neuropsychopharmacology **2**: 327-331.

Lesch, K. P. and J. Waider (2012). "Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders." Neuron **76**: 175-191.

Lesch, K. P., et al. (1992). "5-HT_{1A} receptor-effector system responsivity in panic disorder." Psychopharmacology (Berl) **106**: 111–117.

Levitt, P. and P. Rakic (1982). "The time of genesis, embryonic origin and differentiation of the brain stem monoamine neurons in the rhesus monkey." Brain research **256**: 35-57.

Li, J., et al. (2011). "Estrogen enhances neurogenesis and behavioral recovery after stroke." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **31**: 413-425.

Liu, C., et al. (2010). "Pet-1 is required across different stages of life to regulate serotonergic function." Nature Neuroscience **10**: 1190-1198.

Lowry, C. A., et al. (2005). "Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems." Stress **8**: 233-246.

Lumsden, A. and R. Keynes (1989). "Segmental patterns of neuronal development in the chick hindbrain." Nature **337**: 424-428.

Lydiard, R. B. (2003). "The role of GABA in anxiety disorders." The Journal of Clinical Psychiatry **64**: 21-27.

Maccaferri, G. and J. C. Lacaille (2003). "Interneuron Diversity series: Hippocampal interneuron classifications--making things as simple as possible, not simpler." Trends in neurosciences **26**: 564-571.

Maier, S. F. and L. R. Watkins (2005). "Stressor controllability and learned helplessness: the roles of the dorsal raphe nucleus, serotonin, and corticotropin-releasing factor." Neuroscience and Biobehavioral Reviews **29**: 829-841.

Malberg, J. E., et al. (2000). "Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus." The Journal of Neuroscience **20**: 9104-9110.

Malek, Z. S., et al. (2005). "Tissue-specific expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat midbrain: anatomical evidence and daily profiles." The European journal of neuroscience **22**: 895-901.

Matsuda, M., et al. (2004). "Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. Dev. Cell " Developmental Cell **2**: 193-203.

Metzger, D. and P. Chambon (2001). "Site- and time-specific gene targeting in the mouse." Methods **24**: 71-80.

Millan, M. J., et al. (2008). "Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions." Trends in pharmacological sciences **29**: 454-464.

Ming, G. and H. Song (2005). "Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System." Annual review of neuroscience **28**: 223-250.

Morgan, J. I. and T. Curran (1991). "Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun." Annual review of neuroscience **14**: 421-451.

Murphy, D. L. and K. P. Lesch (2008). "Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology." Nature reviews. Neuroscience **9**: 85-96.

Murray, C. J. and A. D. Lopez (1996). "Evidence-based health policy--lessons from the Global Burden of Disease Study." Science (New York, NY) **274**: 740-743.

Nakashiba, T., et al. (2012). "Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion." Cell **149**: 188-201.

Neumeister, A., et al. (2004). "Reduced serotonin type 1A receptor binding in panic disorder." The Journal of Neuroscience **24**: 589-591.

Niedermayr, A. (20.10.2010). Retrieved 06.02.2015, from <http://www.google.de/imgres?imgurl=https%3A%2F%2Fip.uni-goettingen.de%2Fget%2Fimage%2F6754&imgrefurl=https%3A%2F%2Fip.uni-goettingen.de%2Fget%2Ftext%2F6741&h=280&w=400&tbnid=tbe4wyHy-PLVdM%3A&zoom=1&docid=k7GkHo2KirQxkM&ei=NaPUVMSNLseBU4iJgNAP&tbm=isch&client=safari&iact=rc&uact=3&dur=126&page=1&start=0&ndsp=36&ved=0CGEQrQMwDw>.

Parks, C. L., et al. (1998). "Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**: 10734-10739.

Parry-Hill, M. J., et al. Retrieved 06.02.2015, from <http://olympusmicro.com/primer/java/fluorescence/matchingfilters/index.html>.

Patel, P. D., et al. (2004). "Robust and tissue-specific expression of TPH2 versus TPH1 in rat raphe and pineal gland." Biological Psychiatry **55**: 428-433.

Pattyn, A., et al. (2004). "Ascl1/Mash1 is required for the development of central serotonergic neurons." Nature Neuroscience **7**: 589-595.

Pattyn, A., et al. (2003). "Coordinated temporal and spatial control of motor neuron and serotonergic neuron generation from a common pool of CNS progenitors." Genes & Development **17**: 729-737.

Puig, M. V. and A. T. Gullledge (2011). "Serotonin and prefrontal cortex function: neurons, networks, and circuits." Molecular neurobiology **44**: 449-464.

Rapport, M., et al. (1948). "Crystalline Serotonin." Science (New York, NY) **108**: 329-330.

Rapport, M., et al. (1948). "Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum." The Journal of biological chemistry **174**: 735-741.

Rei, D., et al. (2015). "Basolateral amygdala bidirectionally modulates stress-induced hippocampal learning and memory deficits through a p25/Cdk5-dependent pathway." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **112**: 7291-7296.

Riccio, O., et al. (2009). "Excess of serotonin affects embryonic interneuron migration through activation of the serotonin receptor 6." Molecular psychiatry **14**: 280-290.

Rushworth, M. F., et al. (2004). "Action sets and decisions in the medial frontal cortex." Trends in cognitive sciences **8**: 410-417.

Sanberg, C. D., et al. (2006). "5-HT1a receptor antagonists block perforant path-dentate LTP induced in novel, but not familiar, environments." Learning & memory **13**: 52-62.

Schildkraut, J. J. (1965). "The catecholamine hypothesis of affective disorders—a review of supporting evidence." The American Journal of Psychiatry **122**: 509-522.

Schlessinger, A. R., et al. (1975). "An autoradiographic study of the time of origin and the pattern of granule cell migration in the dentate gyrus of the rat." Journal of Comparative Neurology **159**: 149-175.

Seidenbecher, T., et al. (2003). "Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval." Science **301**: 846-850.

Shors, T. J., et al. (2001). "Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories." Nature **410**: 372-376.

Silveira, M. C., et al. (1993). "Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze." Behavioral brain research **56**: 115-118.

Singewald, N. and T. Sharp (2000). "Neuroanatomical targets of anxiogenic drugs in the hindbrain as revealed by Fos immunocytochemistry." Neuroscience **98**: 759-770.

Sole, M. J., et al. (1986). "An active pathway for serotonin synthesis by renal proximal tubules." Kidney International **29**: 689-694.

Song, J., et al. (2013). "Parvalbumin interneurons mediate neuronal circuitry-neurogenesis coupling in the adult hippocampus." Nature Neuroscience **16**: 1728-1730.

Sternberg, N., et al. (1981). "Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome." Journal of molecular biology **150**: 487–507.

Surget, A., et al. (2011). "Antidepressants recruit new neurons to improve stress response regulation." Molecular psychiatry **16**: 1177-1188.

Taffe, M. A., et al. (2010). "Long-lasting reduction in hippocampal neurogenesis by alcohol consumption in adolescent nonhuman primates." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**: 11104-11109.

Videbech, P. and B. Ravnkilde (2004). "Hippocampal Volume and Depression-A Meta-Analysis of MRI Studies." The American Journal of Psychiatry **161**: 1957-1966.

Waider, J., et al. (2011). "Tryptophan hydroxylase-2 (TPH2) in disorders of cognitive control and emotion regulation: a perspective." Psychoneuroendocrinology **36**: 393-405.

Walther, D. J. and M. Bader (2003). "A unique central tryptophan hydroxylase isoform." Biochemical Pharmacology **66**: 1673-1680.

Walther, D. J., et al. (2003). "Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform." Science (New York, NY) **299**: 76.

Warner-Schmidt, J. L. and R. S. Duman (2006). "Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment." Hippocampus **16**: 239-249.

Weber, L. J. and A. Horita (1965). "A study of 5-hydroxytryptamine formation from L-tryptophan in the brain and other tissues." Biochemical Pharmacology **14**: 1141-1149.

Wurst, W. and L. Bally-Cuif (2011). "Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer." Nature reviews. Neuroscience **2**: 99-108.

Ye, W., et al. (1998). "FGF and Shh Signals Control Dopaminergic and Serotonergic Cell Fate in the Anterior Neural Plate." Cell Press **93**: 755-766.

Zhao, Z. Q., et al. (2006). "Lmx1b is required for maintenance of central serotonergic neurons and mice lacking central serotonergic system exhibit normal locomotor activity." The Journal of Neuroscience **26**: 12781-12788.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

	5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
	5-HT	5-Hydroxytryptamin
	5-HTP	5-Hydroxytryptophan
	5-HTT	5-Hydroxytryptamintransporter
	λ_k	kritische Wellenlänge
A	AADC	aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
	ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitätsstörung
	Aq	zerebrales Aquädukt
B	BH ₄	Tetrahydrobiopterin
	BNST	bed nucleus of the stria terminalis
	Bp	base pair = Basenpaar
	BSA	bovine serum albumin
C	CA	Cornu Ammonis
	cKO	konditioneller Knockout
	CLN	caudaler linearer Nucleus
	Cre-ER ^T	Tamoxifen abhängige Rekombinase
	CS	konditionierter Stimulus
D	DAB	3,3'-Diaminobenzidin
	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
	ddH ₂ O	destilliertes Wasser
	DG	Gyrus dentatus
	DNA	deoxyribonucleic acid = Desoxyribonucleinsäure
	DR	dorsaler raphe Nucleus
	DRC	caudaler Anteil des dorsalen raphe Nucleus
	DRD	dorsaler Anteil des dorsalen raphe Nucleus
	DRI	interfaszikulärer Anteil des dorsalen raphe Nucleus

	DRV	ventraler Anteil des dorsalen raphe Nucleus
	DRVL	ventrolateraler Anteil des dorsalen raphe Nucleus

E	ES	embryonale Stammzellen
----------	----	------------------------

F	FGF	fibroblast growth factor (= Wachstumsfaktor)
	fc	furchtkonditioniert

G	GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
	GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor

H	HET	heterozygoter Genotyp
----------	-----	-----------------------

I	IRN	intermediäre retikuläre Neurone
----------	-----	---------------------------------

K	KO	knockout
	KI	knockin

L	LBD	ligand-binding domain
	LSD	Lysergsäurediethylamid

M	MAO	Monoamin-Oxidase
	MFB	medialer frontaler Faszikel
	MHO	Mittelhirn-Hinterhirn Organisator
	MnR	medianer raphe Nucleus
	mPFC	medialer präfrontaler Cortex
	mRNA	messenger RNA (Ribonukleinsäure)

N	NGS	Normal goat Serum (Ziege)
	NHS	Normal horse Serum (Pferd)
	NPGN	lateraler paragigantocellulare Nucleus
	NRMa	Nucleus raphe magnus

	NRO	Nucleus raphe obscurus
	NRPa	Nucleus raphe pallidus
O	O ₂	Sauerstoff
P	PET	Positronen-Emissions-Tomographie
R	r	Rhombomer
	RMg	raphe magnus
	ROb	raphe obscurus
	RPa	raphe pallidus
	RT	Raumtemperatur
S	SERT	Serotonin Transporter
	SSRI	selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
	Str. pyr.	Stratum pyramidale
	Str. or.	Stratum oriens
	Str. gr.	Stratum granulosum
	Str. mol.	Stratum moleculare
T	TPH1	Tryptophan-Hydroxylase 1
	TPH2	Tryptophan-Hydroxylase 2
U	US	unkonditionierter Stimulus
V	Vmat2	vesikulärer Monoamintransporter
	VIP	vasoaktiv intestinales Polypeptid
W	WT	Wildtyp
Z	z. B.	zum Beispiel
	ZNS	zentrales Nervensystem

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Metabolismus von 5-HT (http://de.wikipedia.org/wiki/Serotonin#media-viewer/Datei:Serotonin_Biosynthese.svg)	4
Abbildung 2: Das serotonerge System des Säugers (Lesch and Waider 2012)	6
Abbildung 3: Entwicklung des zentralen serotonergen Systems (Deneris and Wyler 2012)	7
Abbildung 4: Histologisches Schnittbild des Hippocampus (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ab/HippocampalRegions.jpg)	16
Abbildung 5: Indirekte Immunofluoreszenzmethode (eigene Graphik).....	27
Abbildung 6: Elektronenübergänge bei Absorption und Emission von Licht (Bröckel)	27
Abbildung 7: Stokes Shift als Grundprinzip der Fluoreszenz (Niedermayr)	28
Abbildung 8: Aufbau eines Fluoreszenzmikroskops (Niedermayr).....	29
Abbildung 9: Zusammenspiel eines Fluoreszenzfiltersystems (Parry-Hill, Fellers et al.)	30
Abbildung 10: Immunofluoreszenzfärbung von Parvalbumin bzw. c-Fos einer nicht-konditionierten <i>Tph2^{+/+}</i> Maus	33
Abbildung 11: Darstellung der c-Fos Färbungen bei einer nicht-konditionierten <i>Tph2^{-/-}</i> Maus.....	34
Abbildung 12: Darstellung des Volumens des dorsalen Hippocampus und seiner Unterregionen DG, CA1 und CA3.....	35
Abbildung 13: Aufnahme des dorsalen Hippocampus bei einer konditionierten <i>Tph2^{+/+}</i> Maus	36
Abbildung 14: Darstellung der Dichte der Parvalbumin-ir Zellen im gesamten dorsalen Hippocampus sowie in den Unterregionen DG, CA1 und CA3	37

Abbildung 15: Immunofluoreszenzfärbung von c-Fos einer konditionierten <i>Tph2^{-/-}</i> Maus.....	38
Abbildung 16: Darstellung der vollen c-Fos Zelldichte im gesamten dorsalen Hippocampus, DG, CA1 und CA3	39
Abbildung 17: Immunofluoreszenzfärbung eines konditionierten <i>Tph2^{+/-}</i> Tieres mit separater Darstellung des c-Fos, Parvalbumin und DAPI Kanals.....	41
Abbildung 18: Darstellung der Zelldichte der Parvalbumin/c-Fos doppelgefärbten Zellen im gesamten dorsalen Hippocampus sowie in den Unterregionen DG, CA1 und CA3.....	42
Abbildung 19: Immunofluoreszenzfärbung von c-Fos einer nicht-konditionierten <i>Tph2^{-/-}</i> Maus.....	43
Abbildung 20: Darstellung der Zelldichte der granulären c-Fos-ir Zellen im gesamten dorsalen Hippocampus sowie in den Unterregionen DG, CA1 und CA3	44

6.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Organe und Gewebe in denen 5-HT und/oder TPH-Protein oder - mRNA nachgewiesen werden konnten.....	2
Tabelle 2: Einteilung der Untersuchungstiere beim Furchtkonditionierungstest	24
Tabelle 3: Antikörper, die für die Immunofluoreszenzfärbung verwendet wurden	32

6.5 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe. Übernommene Inhalte wurden von mir eindeutig gekennzeichnet.

Die Gelegenheit zum Promotionsverfahren wurde mir nicht kommerziell vermittelt. Insbesondere wurde keine Person oder Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Ich erkläre weiterhin, dass ich die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten habe.

Meine Dissertation wurde weder vollständig noch teilweise schon einmal einer anderen Fakultät mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erzielen, vorgelegt.

Elisabeth Thuy

Esslingen am Neckar, November 2015

Danksagung

Zuerst möchte ich Prof. Lesch für die Korrektur und die Möglichkeit danken, am Institut für molekulare Psychiatrie zu promovieren.

Dank geht auch an Frau Prof. Asan für die Bereitschaft als Korreferentin die Arbeit zu bewerten und sie vorab mit Korrekturvorschlägen zu verbessern.

Ich danke meinem Betreuer Dr. Jonas Waider für die Unterstützung, die Hilfe und das Verständnis für meine Arbeit.

Besonderer Dank geht an meine Mutter, die mich während meines Studiums und der Promotion stets in jeder Hinsicht unterstützt hat und ohne die ich heute nicht da wäre wo ich jetzt bin.

Danke an alle!

Lebenslauf

Thuy Elisabeth

Beruflicher Werdegang

Seit 06/2014 Assistenz Zahnärztin und angestellte Zahnärztin

Universitärer Werdegang

2008-2013 Studium der Zahnmedizin Universität Würzburg

Schulischer Werdegang

Mai 2008 Abitur
1999 – 2008 Ignaz- Kögler- Gymnasium Landsberg am Lech
1995 – 1999 Grundschule Penzing