Aus der Abteilung Neuroanatomie

(Leiter: Univ.-Prof. Dr. Oliver von Bohlen und Halbach)

des Instituts für Anatomie und Zellbiologie

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Karlhans Endlich)

der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Verhaltensanalyse von SrGAP3-Defizienz im Tiermodell

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2018

vorgelegt von: Leif Torben Koschützke

geboren am: 12.01.1990

in: Braunschweig

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Max P. Baur
1. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Oliver von Bohlen und Halbach, Greifswald
2. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Gabriele M. Rune, Hamburg
Ort, Raum:	Seminarraum der Klinik und Poliklinik für Neurologie Universitätsmedizin Greifswald Ferdinand-Sauerbruchstraße, 17475 Greifswald
Tag der Disputation:	13.12.2018

„Fakten, Fakten und nochmals Fakten.“

Pjotr Stepanowitsch Werchowenski
in
„Böse Geister“
(1873)

von

Fjodor Michailowitsch Dostojewski
(1821-1881)

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis ____ *I*

Abkürzungsverzeichnis ____ *II*

1. Einleitung ____ *1*

1.1 Die Entdeckung von SrGAP3 ____ **1**

1.2 Neurodevelopmental Disorders: Mentale Retardierung, Autismus und Schizophrenie ____ **2**

1.3 GTPase-Proteine bei Neurodevelopmental Disorders ____ **5**

1.4 Die SrGAP3-Defizienz ____ **6**

1.5 Vorarbeiten in der Analyse von SrGAP3-defizienten Mäusen ____ **8**

1.6 Verhaltensversuche zur Evaluation von Tiermodellen ____ **9**

1.7 In der Literatur beschriebene Verhaltensanalyse von SrGAP3-defizienten Mäusen ____ **10**

1.8 Fragestellung und Ziele der Arbeit ____ **13**

2. Material und Methoden ____ *14*

2.1 Versuchstiere ____ **14**

2.1.1 Generierung der Versuchstiere ____ 14

2.1.2 Haltungsbedingungen ____ 14

2.2 Materialien ____ **15**

2.2.1 Geräte ____ 15

2.2.2 Software ____ 16

2.3 Statistische Analyse ____ **16**

2.4 Verhaltensversuche ____ **17**

2.4.1 Open Field ____ 17

2.4.2 Hole Board ____ 18

2.4.3 Dark-Light Box ____ 19

2.4.4 Morris Water Maze ____ 20

2.4.5 Nest Building ____ 22

2.4.6 Marble Burying ____ 23

Vorläufiger Versuchsaufbau ____ **24**

2.4.7 Novel Object Recognition ____ 24

3. Ergebnisse 25

3.1 Open Field 25

3.2 Hole Board 27

3.3 Dark-Light Box 28

3.4 Morris Water Maze 29

3.5 Nest Building 31

3.6 Marble Burying 32

3.7 Vorläufige Daten: Novel Object Recognition 33

4. Diskussion 34

5. Zusammenfassung 42

6. Literaturverzeichnis 43

7. Anhang 55

7.1 Eidesstattliche Erklärung 55

7.2 Lebenslauf 56

7.3 Liste der Veröffentlichungen 57

7.3.1 Originalarbeiten 57

7.3.2 Kongressbeiträge 58

7.3.3 Vorträge 58

7.4 Danksagung 59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Eine Übersicht über den Slit-Robo-Signaltransduktionsweg. 7

Abbildung 2. Ergebnisse der bereits durchgeführten Verhaltensversuche. 12

Abbildung 3. Zonen im Open Field. 17

Abbildung 4. Definierte Zonen im Morris Water Maze und beispielhafter Lernfortschritt. 21

Abbildung 5. Ergebnisse Open Field. 26

Abbildung 6. Ergebnisse Hole Board. 27

Abbildung 7. Ergebnisse Dark-Light Box. 28

Abbildung 8. Ergebnisse Morris Water Maze. 30

Abbildung 9. Ergebnisse Nest Building. 31

Abbildung 10. Ergebnis Marble Burying. 32

Abbildung 11. Ergebnisse Novel Object Recognition. 33

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Abl	*Abelson Murine Leucemia Viral Oncogene 1*
ASD	*Autism Spectrum Disorder*
BRAIN Project	*Brain Research through Innovative Neurotechnologies*
ca.	circa
CC	*Conserved Cytoplasmatic Motifs*
Cdc42	*Cell Division Cycle 42*
cm	Centimeter
DLB	*Dark-Light Box*
DSM-V	*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*
F-Hole	*Fast*- Konfiguration im *Hole Board*
g	Gramm
G-Protein	GTPase-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HB	*Hole Board*
Kg	Kilogramm
Ko	Knockout
m	Meter
MB	*Marble Burying*
MEGAP	*Mental Disorder associated GTPase activating Protein*
MENA	*Mammalian-enabled Protein*
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
MR	Mentale Retardierung
MRX	X-chromosomal bedingte mentale Retardierung
MWM	*Morris Water Maze*

NB	*Nest Building*
ND	*Neurodevelopmental Disorder*
NOR	*Novel Object Recognition*
OF	*Open Field*
OF-MC	*Open Field-Methylphenidat Challenge*
p.	*Page*; Seite
pp.	*Pages*; Seiten
PCR	*polymerase chain reaction*
Rac-1	*Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1*
Ras	*Rat sarcoma*
Rho-Protein	*Ras homologue*
S-Hole	*Slow*- Konfiguration im *Hole Board*
SEM	*Standard Error of the Mean*
SHIRPA	*SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, and Royal London Hospital Phenotype Assessment*
SrGAP3	*Slit-Robo Rho GTPase activating Protein 3*
SrGAP3 -/-	SrGAP3-defizient
u.a.	unter anderen/m
WASP	*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*
WAVE-1	*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Family Member-1* Oder: *WASP family Verprolin-homologous Protein*
WRP	*WAVE regulating Protein*
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

Die folgende Arbeit möchte zunächst einen einleitenden Überblick über die Entdeckung des untersuchten Gendefektes geben, dann ein Schlaglicht auf die Grundlagen der pathophysiologischen Zusammenhänge werfen und zuletzt die Vorarbeiten zusammenfassen. Im Fokus dieses Projektes - diese Arbeit repräsentiert einen Teil davon - liegt die Krankengeschichte einer Patientin, welche von Psychiatern und Wissenschaftlern des Zentralinstituts für seelische Gesundheit in Mannheim untersucht wurde (Endris et al., 2002). Der bei ihr entdeckte Gendefekt betraf das SrGAP3-Gen (*Slit-Robo Rho GTPase Activating Protein 3*; alternativer Name: MEGAP: *Mental Disorder Associated GTPase Activating Protein*) mit dem zugehörigen gleichnamigen Protein als Genprodukt.

1.1 Die Entdeckung von SrGAP3

Volker Endris und seine Kollegen konnten bei einer mental stark retardierten und verhaltensauffälligen Patientin eine balancierte *de novo* Translokation zwischen dem X-Chromosom und dem endständigen, kurzen Arm des 3. Chromosoms nachweisen (Endris et al., 2002).

Diese Patientin war das zweite, jüngere Kind zweier gesunder Eltern. Der ältere Bruder zeigte ebenfalls keine mentale Retardierung. Die Patientin war zum Zeitpunkt der Untersuchung im Jahre 2002 16 Jahre alt. Schon früh machten sich mentale und motorische Entwicklungsdefizite bemerkbar. Beispielsweise konnte die Patientin erst mit 4 Jahren frei Stehen und mit 5,5 Jahren Laufen.

Der zusammenfassende psychiatrische Befund zur Zeit der Arbeit von Herrn Endris war folgendermaßen: starke psychomotorische Behinderung, ataktisches Gangbild, ruckartige Armbewegungen, sehr geringe mentale Leistungsfähigkeit, wiederkehrendes autoaggressives Verhalten und eine Abwesenheit von Sprache.

Ein deutlicher physischer Phänotyp ließ sich feststellen mit einem triangulären Gesicht, einem engen Gaumen, einem kurzen Philtrum, einem hohen Nasenübergang, sehr feingliedrigen Händen, Muskelhypotonie und Skoliose. Es ereigneten sich in den 3 Jahren vor der Publikation mehrere epileptische Anfälle.

Eine IQ-Testung war aufgrund stark ausgeprägter Aufmerksamkeitsdefizite nicht möglich. Eine magnetresonanztomografische Untersuchung wurde von den Eltern abgelehnt.
In der Studie von Herrn Endris sind noch 2 weitere Patienten bzw. Probanden beschrieben worden, die wesentlich geringere bis gar keine phänotypischen Ausprägungen bei ähnlichem Genotyp zeigten.
In einer weiteren Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine heterozygote SrGAP3-Deletion, eine sogenannte Haploinsuffizienz, bei der ein Allel des Gens funktionsfähig bleibt, nicht mit mentaler Retardierung assoziiert ist bzw. ein Spektrum unterschiedlicher Schweregrade der Ausprägung vorliegen könne (Hamdan et al., 2009).

1.2 Neurodevelopmental Disorders: Mentale Retardierung, Autismus und Schizophrenie

Neurodevelopmental Disorders (ND) oder entwicklungsbedingte Erkrankungen des Zentralen Nervensystems sind ein Spektrum verschiedener Erkrankungen, denen eine Abweichung von der physiologischen Entwicklung als Hauptgrund der Pathologie zugrunde liegt (Sontheimer, 2015, pp. 319-347). Die Häufigkeit dieser Erkrankungen lasse sich nur recht ungenau auf 1-8% der Bevölkerung schätzen und verursache in den entwickelten Industrieländern jedoch einen Großteil der gesundheitsökonomischen Kosten (Ropers, 2010). Zu den ND werden unter anderem kognitive Einschränkungen, wie die mentale Retardierung (MR), *Autism Spectrum Disorders* (ASD), die Autismus-Spektrum-Erkrankungen, und die Schizophrenie gerechnet (Vaillend et al., 2008; Xiao et al., 2014; Murray und Lewis, 1987).

Im Folgenden wird kurz auf die drei hervorgehobenen Krankheiten des Spektrums der ND eingegangen.
Mentale Retardierung beschreibt eine kognitive Einschränkung, welche über einen verminderten Intelligenzquotienten (IQ) von kleiner/gleich 70 definiert wird (Chelly et al., 2006). Etwa 2-3% der Bevölkerung besitzen einen IQ unter 70 und circa 0,3% sind mit einem Wert von unter 50 schwer mental retardiert (Chelly, 1999). Jedoch sei bei der IQ-Messung eine kulturelle und zeitliche Vergleichbarkeit erschwert, die bei der Diagnosestellung berücksichtigt werden müsse (Trahan et al., 2014). Bei circa der Hälfte aller Formen von MR hat sich eine genetische Ursache zeigen lassen (Chelly, 2000).

Geschichtlich gesehen konnte früh aufgrund des haploiden X-Chromosoms bei Männern, der dementsprechenden fehlenden Fähigkeit Mutationen auf diesem Chromosom zu kompensieren und der relativen Einfachheit Gene dort zu identifizieren, die Gruppe der X-chromosomalen mentalen Retardierungen (MRX) definiert werden. Diese werden oft beispielhaft als Formen der MR besprochen und konnten gut die Annahme unterstreichen, dass genetische Ursachen für Lernvorgänge vorliegen müssen (Chechlacz und Gleeson, 2003). Auf die Rolle der Rho-GTPase-Proteine in der Entwicklung der MR wird im nächsten Kapitel eingegangen.

Die Bezeichnung des Autismus leitet sich vom griechischen Wort *αύτός (autós)* „selbst" ab, und bezeichnet entwicklungsbedingte Erkrankungen des ZNS, deren Merkmal eine verminderte soziale Fähigkeit zu Kontakt und Interaktion ist und wurde vom deutschen Psychiater Eugen Bleuler eingeführt (Kumbier et al., 2010). Es liege eine pathologische „Selbstbeziehung" vor. Im Laufe der Jahrzehnte veränderte sich die Wahrnehmung und Nutzung des Begriffs und diese sind auch aktuell Gegenstand der Diskussion (Evans, 2013). Mittlerweile wird der Terminus Autismus-Spektrum-Erkrankungen bevorzugt und beschreibt damit die schwierige Definition und die Variabilität der Ausprägung der Krankheit (Xavier et al., 2015). Grundlegend für alle Erkrankungen des Autismusspektrums sind unterschiedlich ausgeprägte Einschränkungen in 2 folgenden Kategorien. Zu diesen Kategorien zählt die soziale Interaktion und Kommunikation, welche in der Neuauflage des *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM-V) zu einer Kategorie zusammengefasst wurde, sowie als zweites Kriterium repetitives, stereotypes Verhalten (American Psychiatric Association, 2013; Doernberg und Hollander, 2016).

Der Begriff der Schizophrenie leitet sich vom altgriechischen *σχίζειν (s'chizein)* für „spalten, zerspalten, zersplittern" und *φρήν (phrēn)* für „Geist, Seele" und beschreibt einen „gespaltenen Geist". Die Erstbeschreibung der Schizophrenie als Krankheitsbegriff geht ebenfalls auf Eugen Bleuler zurück, der es dem Begriff der *Dementia praecox*, welcher durch Emil Kraepelin postuliert wurde, gegenübergestellt hat (Fusar-Poli und Politi, 2008). Schizophrenie ist eine verbreitete psychiatrische Erkrankung, die je nach Quelle ca. 0,5-1% der Bevölkerung betrifft (Saha et al., 2005). Es findet sich eine Häufung der Krankheit in der späten Adoleszenz und dem frühen Erwachsenenalter, zudem sind Männer häufiger als Frauen betroffen (McGrath et al., 2008). Es werden positive

Symptome als übersteigerte Verhaltensweisen und negative Symptome als stark vermindertes Verhalten beschrieben. Hierzu gehören häufig Halluzinationen, gestörter Affekt und Wahnvorstellungen (Addington und Rapoport, 2009). Allgemein lässt sich aus der Literatur entnehmen, dass man von einer kombinierten Ätiologie von Genetik und Umwelt ausgehen sollte (Rapoport et al., 2012). Des Weiteren wird verstärkt darauf hingewiesen, dass der Schizophrenie allgemein eine fehlerhafte Verschaltung von Neuronen zugrunde liegt (Schmitt et al., 2011).

Als Gemeinsamkeit dieser Erkrankungen- der mentalen Retardierung, der Autismus-Spektrum-Erkrankungen und der Schizophrenie- kann festgestellt werden, dass sie sich über ein von der Norm abweichendes Verhalten der Betroffenen erkennen lassen.

Grundsätzlich wird eine stark erbliche Beeinflussung von Verhaltensweisen angenommen (Hermey et al., 2010, pp. 180-206).
Beispielsweise können erbliche Schäden des Farbsehens dazu führen, dass die Betroffenen aufgrund dieser Einschränkung andere Verhaltensweisen zeigen, als die in dieser Hinsicht gesunde Bevölkerung (Kandel et al., 1995, pp. 568–578).
Bei komplexeren Verhaltensmustern wird zudem davon ausgegangen, dass sie durch verschiedene erbliche Merkmale zugleich determiniert werden (Kandel et al., 1995, pp. 568–578). Dies zeigt somit Parallelen zwischen der erblichen Komponente von ND und Verhaltensweisen allgemein auf.

Das von der sozialen Norm abweichende Verhalten von betroffenen Menschen ist zudem häufig Grund für eine starke gesellschaftliche Stigmatisierung, die insbesondere im Zuge von ND zu verzeichnen ist (Corrigan et al., 2015; Schomerus et al., 2013).
Aufgrund ethischer Aspekte von wissenschaftlichen Experimenten wird bei Verhaltensversuchen häufig der Weg über die Analyse von Versuchstieren gegangen, da Versuchstiere allgemein wesentlich eingehender und invasiver untersucht werden können, als es bei menschlichen Patienten oder Probanden moralisch vertretbar wäre (Bryda, 2013).

1.3 GTPase-Proteine bei Neurodevelopmental Disorders

GTPase-Proteine (G-Proteine) sind an der Signaltransduktion zwischen Rezeptor und Second Messenger beteiligt. Es werden aus drei Untereinheiten bestehende sogenannte heterotrimere oder „große“ G-Proteine und sogenannte kleine G-Proteine unterschieden, die nur aus einer Untereinheit bestehen. Zu den kleinen G-Proteinen zählen die Rho-G-Proteine (*Ras homologue*). Rho-GTPase-Proteine bewegen sich zwischen einem aktiven GTP-gebundenen und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand (Alberts et al., 2017, pp. 1079-1082). Innerhalb der Gruppe der Rho-G-Proteine finden sich unter anderem die Proteine RhoA, Rac1 (*Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1*) und Cdc42 (*Cell Division Cycle 42*), die besonders an der Aktindynamik beteiligt sind (Chen et al., 2012).

Rho-GTPase-Proteine sind wichtig für die Ausreifung des zentralen Nervensystems und die synaptische Plastizität (Govek et al., 2005). Insbesondere sind sie über den Einfluss auf die Aktindynamik des Zytoskeletts der Zellen unerlässlich für die axonale Ausreifung und die neuronale Migration der Nervenzellen (Fischer et al., 1998; Hall, 1998). Eine Dysfunktion der Rho-Proteine ist mit schweren neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen, wie der Gruppe der *Neurodevelopmental Disorders*, in Verbindung gebracht worden (Ramakers, 2000). Solche Assoziationen ließen sich auch für GTPase-aktivierende Proteine (GAP) nachweisen, die die GTPase-Funktion der G-Proteine aktivieren und darüber einen Einfluss auf die Signaltransduktion nehmen können (Alberts et al., 2017, pp. 1127-1128; Wong et al., 2001).

1.4 Die SrGAP3-Defizienz

SrGAP3 ist ein ebensolches GAP, das in den Slit-Robo Signaltransduktionsweg eingeschaltet ist und die Aktinrepulsion über die Aktivierung der GTPase-Funktion des Rho-G-Proteins Cdc42 regulieren kann (siehe Abb. 1). Der Slit-Robo-Signaltransduktionsweg ist von Bedeutung bei der Ausreifung des zentralen Nervensystems, insbesondere bei dem Auswachsen der Axone der Neuronen zur Mittellinie hin und der Kreuzung der Bahnen auf die kontralaterale Seite (Bear et al., 2008, pp. 18–22). In neueren Arbeiten ist zudem von einer bevorzugten Inhibition von Rac1 die Rede (Bacon et al., 2013).

Ebenso formt SrGAP3 einen Signalkomplex mit dem Protein WAVE-1 (*Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1*) und reguliert mit diesem zusammen den Slit-Robo-Signalweg flussabwärts nach Rac1 (Kim et al., 2012). WAVE-1 wurde der Familie der WASP-Moleküle (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) zugeordnet (Miki et al., 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass der alleinige Verlust von WAVE-1 im Mausmodell zu einem ähnlichen Phänotyp, wie dem des SrGAP3-Verlustes führen kann, wobei die Mäuse insbesondere schlechte Ergebnisse im Lernverhalten zeigten (Soderling et al., 2003). Auch konnte gezeigt werden, dass SrGAP3 Zellmigration hemmen kann, indem die aktin- und mikrotubuliabhängigen Migrationsmechanismen, sowie die Bildung von Zell-Zell-Kontakten im Sinne von Fokalkomplexen herunterreguliert werden können (Yang et al., 2006).

An Menschen, denen ein funktionsfähiges Protein durch eine Mutation fehlt, ließen sich starke Mentale Retardierung und Schizophrenie nachweisen (Endris et al., 2002). Da SrGAP3 an der synaptischen Plastizität und der Ausbildung von korrekten Projektionen im Slit-Robo-Signalweg beteiligt ist, kann ein Verlust dieses Proteins und seiner Funktion ursächlich für die Entstehung von Mentaler Retardierung und Schizophrenie sein (Bertram et al., 2016). Wie oben dargestellt, haben diese entwicklungsbedingten Erkrankungen die Überschneidung, dass eine gewisse Fehlverschaltung bestimmter Neuronenpopulationen vorliegen kann. Dies konnte sich bislang sehr gut in die Prozesse einreihen, an denen SrGAP3 nachweislich beteiligt ist und lässt sich mechanistisch gut einordnen.

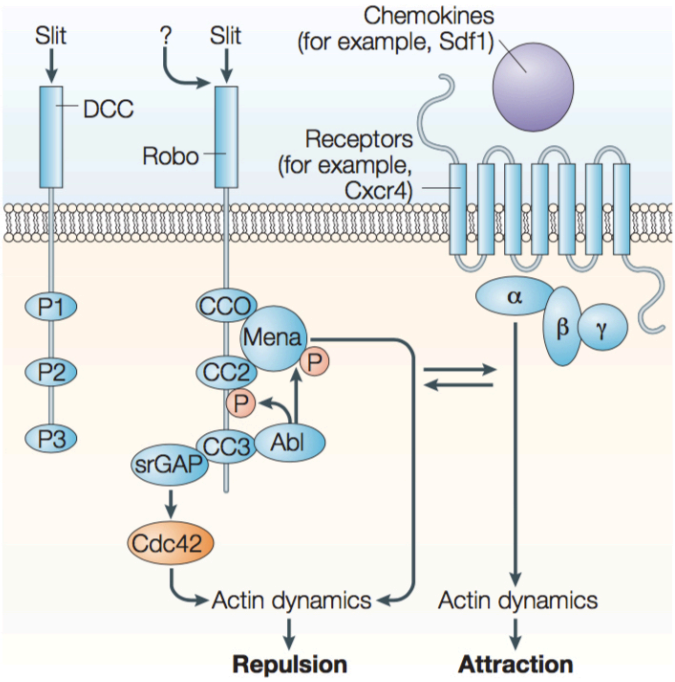

Abbildung 1. Eine Übersicht über den Slit-Robo-Signaltransduktionsweg.

*Entnommen aus (Guan und Rao, 2003). Dargestellt ist eine Übersicht über die Einbindung von SrGAP in den Slit-Robo-Signaltransduktionsweg. Die Tyrosinkinase Abl (Abelson Murine Leucemia Viral Oncogene 1) kann nach einer durch die Bindung von Slit an Robo bedingten Konformationsänderung ihrer Zielproteine das Protein MENA (*Mammalian-enabled Protein*) und CC (*Conserved Cytoplasmatic Motifs*) phosphorylieren. Eine Konformationsänderung in CC3 kann das SrGAP aktivieren, welches Cdc42 aktiviert. Cdc42 und Mena haben dann Einfluss auf die Aktindynamik. Unter „Repulsion" und „Attraction" sei hier eine die Wirkung des Slit-Robo-Signaltransduktionsweges auf das Aktinzytoskelett zu verstehen. Dieser kann einen Ausbau in Richtung seiner Aktivität entweder „anziehen" oder „abstoßen" und somit die zelluläre Architektur beeinflussen. Es lässt sich zudem, wie auf der rechten Seite der Abbildungen zu sehen, feststellen, dass Chemokine rezeptorvermittel ebenfalls Einfluss auf die Zytoskelettdynamik haben können und zumeist als Gegenspieler zum Slit-Robo-Signaltransduktionsweg fungieren.*

1.5 Vorarbeiten in der Analyse von SrGAP3-defizienten Mäusen

Die Untersuchung der SrGAP3-Defizienz wird bereits seit vielen Jahren durchgeführt (siehe oben). Auch sind in der Arbeitsgruppe *Neuroanatomie* der Universitätsmedizin Greifswald mehrere Mitarbeiter mit diesem Projekt beschäftigt gewesen. Es soll ein zusammenfassender Überblick über die bisherigen Ergebnisse der Analyse von SrGAP3-defizienten Mäusen gegeben werden. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf Verhaltensexperimenten. Aus Gründen der Übersicht soll in den nachfolgenden späteren Unterpunkten zunächst eine allgemeine Einführung in Verhaltensexperimente dargelegt und darauf aufbauend eine Übersicht der bislang an SrGAP3-defizienten Mäusen durchgeführten Verhaltensversuche erstellt werden.

In der anatomischen Analyse der Gehirne von SrGAP3-defizienten Mäusen konnte eine Vergrößerung des Volumens, der Masse des Gehirns und eine Vergrößerung der Ventrikel beschrieben werden (Koschützke et al., 2015). Es wird diskutiert, dass die Vergrößerung der Gehirne der Knockouttiere über einen verminderten Abfluss der hirneigenen Flüssigkeit, dem Liquor, im Sinne eines *Hydrocephalus* entstehen könnte (Kim et al., 2012). Die Abflussbehinderung soll laut den Autoren am ehesten über eine Verengung des Aquädukts realisiert sein.
Dies steht in Widerspruch mit den Erkenntnissen unserer Arbeitsgruppe, die keine Verengung der Abflusswege des Liquors feststellen konnte (Koschützke et al., 2015). Zudem konnte eine Abnahme der Ziliendichte im dritten Ventrikel der SrGAP3-Knockouttiere gefunden werden (Koschützke et al., 2015).
Des Weiteren wurde eine Zunahme der Dicke von bestimmten Fasertrakten im ZNS der Tiere, jedoch keine Zunahme der Marker für neuronale Plastizität beschrieben (Bertram et al., 2016).

1.6 Verhaltensversuche zur Evaluation von Tiermodellen

Die folgenden Ausführungen sollen einen ersten Überblick über die einsetzbaren Verhaltensversuche, sowie deren Entwicklungsgeschichte, geben. Im zweiten Kapitel MATERIAL UND METHODEN soll dann zu den jeweils in dieser Arbeit eingesetzten Versuchen eine detaillierte Übersicht über die Durchführung und den theoretischen Hintergrund gegeben werden.

Verhaltensversuche werden bereits seit mehreren Jahrzehnten zur Untersuchung von verschiedenen Tiermodellen eingesetzt. Mittlerweile ist eine große Bandbreite an Versuchsaufbauten und provozierbaren Situationen verfügbar, die eine Analyse verschiedener Verhaltensweisen zulassen (Bear et al., 2008, pp. 18–22). Häufig werden Nagetiere, meist Mäuse oder Ratten, für Verhaltensversuche eingesetzt, da sie über eine ausgeprägtes Sozialverhalten verfügen und mehrere Individuen gleichzeitig und platzsparend gehalten werden können (Bailey und Crawley, 2009, pp. 77-102). Zudem verfügen Mäuse und Ratten über eine schnelle Reproduktion. Aufgrund der höheren möglichen Individuenzahl, der sogar noch höheren Reproduktionsrate und der mittlerweile schnellen Zugänglichkeit für genetische Manipulation nimmt die Nutzung von Mäusen in den letzten Jahren stetig zu (Bryda, 2013; Perlman, 2016).
Einer der ersten Wissenschaftler, der dokumentierte Verhaltensversuche an Mäusen durchgeführt hat war Robert Yerkes 1907. Yerkes untersuchte Mäuse, die aufgrund ihres ständigen Drehens im Kreis als „Japanische Tanzmäuse“ bezeichnet wurden. Nach eingehender Untersuchung wurde für das seltsame Verhalten der Mäuse eine aufgrund von Inzucht Defekte Innenohrfunktion verantwortlich gemacht (Crawley, 2007, pp. 64–65).
Vielen Verhaltensversuchen an Mäusen ist die Beobachtung der Aktivität der Mäuse gemein, da dies die einfachste Art zur Evaluierung des Zustandes der Tiere ist. Prinzipiell ergibt sich eine sinnhafte Abfolge der Verhaltensversuche daraus, dass die motorische Funktion zunächst überprüft werden sollte, da eine Einschränkung aufgrund eines eingezüchteten Gendefektes hier, dazu führen kann, dass die Mäuse in anderen Tests schlechter abschneiden, ohne jedoch in dem dort eigentlich abgefragten Verhalten eingeschränkt zu sein. Beispielhaft sei hier eine mögliche Einschränkung der Schwimmfähigkeit durch eine Fehlanlage der Extremitäten zu nennen. Solch eine Einschränkung der Mäuse würde vielleicht zu einem schlechteren Ergebnis der Mäuse im

Water Maze-Lernversuch führen, ohne dass sie möglicherweise tatsächlich eine schlechtere räumliche Gedächtnisleistung besäßen (Hermey et al., 2010, pp. 180-206).

Zu den basalen, meist zuerst durchgeführten Verhaltensversuchen gehört beispielsweise die Überprüfung der motorischen Aktivität, der Neugierde und des Angstverhaltens, wie es im *Open Field* oder dem *Hole Board* oder dem *Dark-Light-Box*-Versuch durchgeführt werden kann (Crawley, 2007, pp. 64–69).
Weitere Verhaltensversuche umfassen beispielsweise die Überprüfung des Sozialverhaltens, des Lernverhaltens oder Aktivitäten, wie *Nest Building* oder *Marble Burying* (Crawley, 2007, pp. 207-211, p. 338).
Eine weitere Möglichkeit bietet die Unterscheidung zwischen beobachtenden Verhaltensversuchen und interventionellen Experimenten. Beispielsweise ist hier der *Novel Object Recognition*-Versuch oder Beobachtungen von medikamenteninduzierten Verhaltensänderungen anzuführen (Crawley, 2007, pp. 81-84; Puma et al., 1999; Waltereit et al., 2012). Zudem kann zwischen einmalig durchgeführten und sequentiellen Versuchen, zur Akquirierung von Wissen bzw. Überprüfung des Lernverhaltens unterschieden werden. Hier kann bespielhaft das mehrtägige Training im *Morris Water Maze* genannt werden (Morris, 1984).

1.7 In der Literatur beschriebene Verhaltensanalyse von SrGAP3-defizienten Mäusen

Zum Teil sind bereits Verhaltensversuche mit SrGAP3-Knockouttieren durchgeführt worden. Die folgenden Angaben beziehen sich auf Arbeiten aus der Arbeitsgruppe *Psychiatrische Tiermodelle* der *Zentralinstituts für Seelische Gesundheit* in Mannheim (Waltereit et al., 2012). Es besteht eine Kooperation zwischen dieser Arbeitsgruppe und der Arbeitsgruppe *Neuroanatomie* Greifswald, in der diese Arbeit durchgeführt worden ist.
Die Ergebnisse werden in Abbildung 2 dargestellt. Zunächst wurde eine standardisierte neurologische Untersuchung der Mäuse durchgeführt. Darauf folgten eine *Open Field*-Analyse, eine sogenannte *Open Field Methylphenidat-Challenge* (OF-MC), ein *Y-Maze*-Versuch, der *Prepulse Inhibition Test* und der *Social Interaction Test*.
Es wurde eine 60-minütige *Open Field*-Analyse durchgeführt, welche die motorische Aktivität der Mäuse im Vergleich der SrGAP3-Knockouttiere mit den Kontrolltieren

untersuchte (siehe Abb. 2a und b). Hier konnte festgestellt werden, dass die männlichen Knockouttiere weniger Strecke zurücklegten. Bei den weiblichen Mäusen konnte kein Unterschied festgestellt werden (Waltereit et al., 2012).

Die neurologische Untersuchung der SrGAP3-defizienten Tiere wurde nach dem standardisiertem SHIRPA-Protokoll (*SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College and Royal London Hospital Phenotype Assessment*) durchgeführt und erbrachte bei den SrGAP3-defizienten Tiere ein vermehrtes Auftreten von Tics, sich stereotyp wiederholende Bewegungen, beispielsweise vermehrtes Putzen (siehe Abb. 2c). Diese Tics waren bei den weiblichen Tieren insgesamt häufiger als bei den männlichen Knockouttieren (Waltereit et al., 2012).

Das *Y-Maze* bestand aus einer ypsilonförmigen Versuchsarena, in der die Tiere 5 Minuten getestet wurden. Es wurde registriert, wie oft die Tiere welchen der beiden unbekannten Arme erkundeten (siehe Abb. 2d). Es konnte eine signifikante Erniedrigung des spontanen alternierenden Erkundens der beiden Arme der Arena durch die SrGAP3-Knockouttiere festgestellt werden (Waltereit et al., 2012).

Im *Social Interaction*-Test wurden die SrGAP3-defizienten Tiere in Interaktion mit unbekannten genetisch gesunden Artgenossen untersucht (siehe Abb. 2e und f). Es konnte eine verminderte anogenitale Exploration und ein verstärktes Zurückziehen aus der sozialen Interaktion durch die SrGAP3-defizienten Tiere beobachtet werden (Waltereit et al., 2012).

In der *Open Field-Methylphenidat-Challenge* wurden Mäuse in einer offenen Arena für 30 Minuten auf ihre locomotorische Aktivität hin untersucht. Männliche SrGAP3-defiziente Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Erniedrigung der zurückgelegten Strecke. Danach wurde ihnen Methylphenidat (7,5 mg pro Kg Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht. Daraufhin wurden die Mäuse für 120 Minuten erneut in der Arena untersucht. Hier konnte die Arbeitsgruppe eine signifikante Erhöhung der zurücklegten Distanz der Knockouttiere im *Open Field* nach der Verabreichung des Methylphenidats feststellen (siehe Abb. 2g und h). Dies wurde als messbare Hyperaktivität bezeichnet (Waltereit et al., 2012).

Im *Prepulse Inhibition*-Test wurden den Tieren kurzzeitige Geräusche mit unterschiedlich starken Geräuschpegeln vorgespielt, die ein angstinduziertes Verharren der Mäuse provozieren (siehe Abb. 2i und j). Weibliche SrGAP3-defiziente Mäuse zeigten bei hohen Geräuschpegeln eine erniedrigte Anfälligkeit für dieses Verharren (Waltereit et al., 2012).

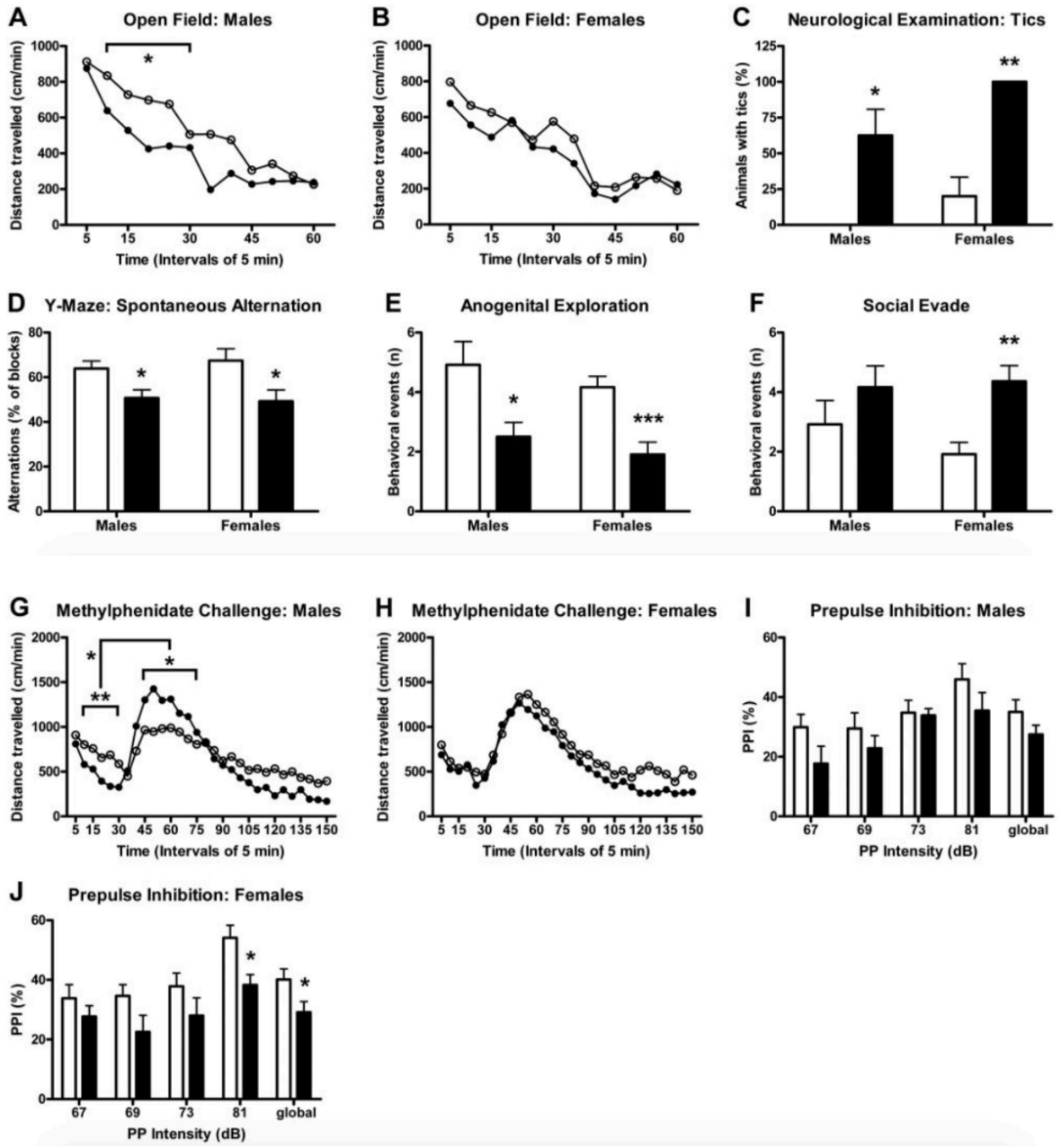

Abbildung 2. Ergebnisse der bereits durchgeführten Verhaltensversuche.

Entnommen und bearbeitet aus (Waltereit et al., 2012). Dargestellt sind die Ergebnisse der von R. Waltereit durchgeführten Verhaltensversuche. Eine detaillierte Beschreibung der Befunde ist im oben stehenden Text zu finden.

1.8 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist eine ergänzende detaillierte Untersuchung der SrGAP3-Knockouttiere auf Verhaltensebene. Die bisherigen Verhaltensanalysen beschränkten sich zunächst auf das reine soziale Verhalten, Spontanverhalten und die Untersuchung auf repetitive Verhaltensweisen.

Im besonderen Fokus steht die Überprüfung, inwiefern sich die am betroffenen Menschen beobachteten phänotypischen Ausprägungen im Mausmodell, welches wesentlich umfangreicher untersucht werden kann, bestätigen lassen.

Mit Hinblick auf die vermutete mentale Retardierung sind lernspezifische Verhaltenstests angewendet worden, wozu u.a. das *Morris Water Maze* diente.

Ein weiterer Schwerpunkt lag darauf, das starke Angstverhalten der beschriebenen Patientin im Mausmodell einer Überprüfung zu unterziehen. Zu diesem Zwecke wurden allgemeine Verhaltensversuche durchgeführt, die das *Open Field*, die *Dark-Light Box* und das *Hole Board* umfassen und einen Aufschluss über einerseits die motorischen Fähigkeiten als auch Verhalten, wie Angst und Neugierde zulassen und eine Vergleichbarkeit mit den bereits publizierten Ergebnissen herstellen sollen.

Des Weiteren wurde ein Schwerpunkt auf die Überprüfung von Verhaltensweisen, welche im Spektrum der *Neurodevelopmental Disorders* auftreten, gelegt, die u.a. mit dem *Marble Burying* und dem *Nest Building* untersucht worden sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind zusammen mit den immunhistologischen Untersuchungen von Doktor Jonathan Bertram veröffentlicht wurden (Bertram et al., 2016). Sie bilden einen Teil des SrGAP3-Projektes der Arbeitsgruppe von Bohlen und Halbach.

2. Material und Methoden

Im Folgenden wurden SrGAP3-Knockouttiere (SrGAP3 -/-) und Kontrolltiere (SrGAP3 +/+) auf Verhaltensebene untersucht. Die Kontrolltiere, z. T. auch als Wildtyptiere bezeichnet, sind als Negativkontrollen bzw. als mit gesundem Phänotyp ausgestattet anzusehen. Es wird zunächst erklärt, welches Verhalten die folgenden Versuche abfragen und wie diese durchgeführt wurden.

2.1 ***Versuchstiere***

2.1.1 Generierung der Versuchstiere

Das Knockout-Konstrukt ist in embryonalen Stammzellen des Entwicklungsstadiums R1 erzeugt, in Blastozysten eingebracht und daraufhin in pseudoschwangere, austragende Tiere verpflanzt worden. Die entstandenen Tiere sind zunächst mit C57/Bl6J-Mäusen verpaart worden. Darauf folgte eine Verpaarung mit FLP-Deleter Mäusen. Es folgte eine weitere Rückverpaarung auf C57/Bl6J-Mäuse über sechs bis acht Generationen. Die Tiere wurden im Zentralinstitut für seelische Gesundheit in Mannheim gezüchtet. Mittels PCR wurde eine Kontrolle des Deletionsstatus durchgeführt. Die erste Untersuchung dieser Tiere wurde 2012 publiziert (Waltereit et al., 2012).

2.1.2 Haltungsbedingungen

Die erwachsenen Mäuse wurden in Haltungskäfigen bei konstanter Raumtemperatur von 23°C in einem eigenen Tierhaltungsraum gehalten. Den Tieren wurde Nestbaumaterial zur Verfügung gestellt. Es wurde ein 12h Tag-Nacht-Zyklus eingestellt mit automatischer Dunkelheit von 7 Uhr bis 19 Uhr. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter, was einer Tierhaltung des *ad-libitum*-Prinzips entspricht. Bevor ein Tierversuch durchgeführt wurde, hatten die untersuchten Mäuse eine Akklimatisierungszeit von mindestens 30 Minuten in dem Haltungsraum. Die Versuche wurden während der Dunkelphase des Tag-Nacht-Zyklus der Tiere durchgeführt, was der Phase der höchsten Aktivität entspricht (Crawley, 2007, p.67).

Vor und nach jedem Verhaltensversuch wurde der genutzte Versuchsapparat mit 70%-iger Ethanollösung geputzt, um keine Geruchsspuren der vorherigen Versuchstiere zu hinterlassen und so eine mögliche Verwirrung der Tiere auszuschließen.

2.2 ***Materialien***

2.2.1 *Geräte*

Geräte	**Typ**	**Hersteller**
Dark-Light Box	Eigenbau Feinmechanik	Universitätsmedizin Greifswald Fleischmannstraße 8 17475 Greifswald Deutschland
Digitalkamera für MWM	Logitech C905	Logitech Europe S.A. EPFL - Quartier de l'Innovation Daniel Borel Innovation Center 1015 Lausanne Schweiz
Digitalkamera für OF	Logitech C300	
Glasmurmeln	-	Spielzeugladen Flax und Krümel GbR Lange Straße 26 17489 Greifswald Deutschland
Haltungskäfige	Typ 4	Bioscape- Firmensitz Castrop-Rauxel Hermannstraße 2–8 44579 Castrop-Rauxel Deutschland
Motor Activity Monitor-Set	LE8825 IR	Panlab Harvard Apparatus 84 October Hill Road Holliston, MA 01746 USA
Nestbaumaterial	NES 3600	Ancare Corp. 2647 Grand Ave. P.O. Box 814 Bellmore, NY 11710 USA
Open Field- Arena	-	Panlab Harvard Apparatus 84 October Hill Road Holliston, MA 01746 USA
Rotlichtlampe	INFRARED – R95E 100W	Philips GmbH Unternehmenskommunikation Röntgenstr. 22 22335 Hamburg Deutschland
Versuchskäfige	Macrolon Typ II	Bioscape- Firmensitz Castrop-Rauxel Hermannstraße 2–8 44579 Castrop-Rauxel Deutschland
Wasseraufbereitungs-system	SG Reinwasser-System clear	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH 22885 Barsbüttel Deutschland
Water Maze, inkl. Plattform	-	Panlab Harvard Apparatus 84 October Hill Road Holliston, MA 01746 USA

2.2.2 Software

Software	Version	Beschreibung	Hersteller
GraphPad Prism for Mac	6.0	statistische Auswertung	GraphPad Software La Jolla, CA 92037 USA
Inkscape	2.7.11	Bildbearbeitung	Projekt der Canonical Group Limited London SE1 0SU Großbritannien
Microsoft Office Excel for Mac	15.41	Tabellenkalkulation	Microsoft Corporation 1 Microsoft Way Redmond, WA 98052-6399 USA
Microsoft Office Word for Mac	15.41	Textprogramm	
SEDACOM	1.0	Tracking Software	Panlab Harvard Apparatus 84 October Hill Road Holliston, MA 01746 USA
SMART Junior	1.0.0.7		
Zotero 2	5.0.33	Zitationsassistent	Roy Rosenzweig Center for History and New Media Department of History and Art History George Mason University 4400 University Drive, MSN 1E7 Fairfax, Virginia 22030 USA

2.3 ***Statistische Analyse***

Für die statistische Analyse wurde Prism 6.0 der GraphPad Inc. genutzt. Die Daten wurden mit ungepaarten Zweistichproben-t-Tests bzw. einfaktorieller Varianzanalysen (ANOVA) analysiert. Zur *Post-Hoc*-Testung wurde *Tukey's Test* genutzt.

Zur Analyse des *Nest Building-Scores* wurde aufgrund nicht eingehaltener Normalverteilung der Werte ein nicht-parametrischer *Mann-Whitney-U-Test* eingesetzt.

2.4 **Verhaltensversuche**

2.4.1 *Open Field*

Das *Open Field* (OF) wird als Verhaltensversuch zur Analyse der Motorik eingesetzt (Crawley, 2007, pp. 65-69). Dies kann überprüft werden, da sich die Tiere ausdauernd in dem Versuch bewegen müssen (Carola et al., 2002).
Die Testung fand in einer *Open Field-Arena* (45 cm x 45 cm) statt, in der es für die Tiere keine Anhaltspunkte zur Orientierung gab. Im OF sind zwei Zonen definiert worden (siehe Abb. 3). Eine zentrale (15 cm x 15 cm) und eine periphere Zone (15 cm Wandabstand).
Prinzipiell wird davon ausgegangen, dass sich die Tiere, ihrem natürlichen Schutzinstinkt folgend, wenig in der Mitte des Feldes aufhalten. Es wird erwartet, dass sie sich, viel an den Rand gedrückt, auf die Suche nach Deckung begeben. Jedoch nach einiger Zeit wird ein zunehmend exploratives Verhalten erwartet (Hermey et al., 2010).

Es sind 14 SrGAP3-Knockouttiere und 8 Kontrolltiere herangezogen worden. Die Tiere wurden für 7 Minuten getestet. Die Beleuchtung wurde auf 25 Lux eingestellt. Zur computergestützten Auswertung wurde SMART Junior genutzt.

Die folgenden Parameter wurden bestimmt: zurückgelegte Strecke, Ruhezeit ohne lokomotorische Aktivität, die durchschnittliche Geschwindigkeit und welcher Anteil der Versuchszeit in welcher definierten Zone verbracht wurde.

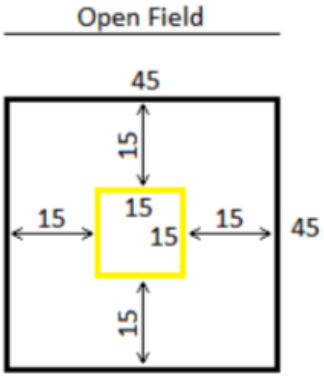

Abbildung 3. Zonen im Open Field.

Dargestellt ist die Zoneneinteilung des Open Field-Versuchs, wie sie von SMART Junior zur Auswertung der Versuche genutzt wird.
Angaben in cm. Gelb= zentrale Zone. Schwarz= periphere Zone.

2.4.2 Hole Board

Das *Hole Board* (HB) wird als Test zur Untersuchung der motorischen Aktivität, sowie des Angstverhaltens eingesetzt (Crawley, 2007, p. 69, p. 316). Die Tiere werden auf eine Plattform (45cm x 45cm; Motor Activity Monitor-Set) gesetzt, die in 4 Reihen mit regelmäßigem Abstand jeweils 4 Löcher (Durchmesser: 2,5 cm) besitzt und über jeweilige Lichtschranken in den Löchern registrieren kann, wann und wie oft das Versuchstier ein Loch erkundet hat (sogenannte *head dips*).

Es sind 14 SrGAP3-Knockouttiere und 8 Kontrolltiere herangezogen worden. Die Tiere wurden 7 Minuten im HB getestet. Es wurde eine Beleuchtungsstärke von 25 Lux eingestellt. Als Erfassungssoftware wurden SMART Junior und SEDACOM genutzt.

Ausgewertet wurde die zurückgelegte Distanz der Mäuse und die Neugierde, welche in diesem Fall die automatisch gemessene Zahl der Erkundungen darstellt. Die Zahl der *head dips* wurde nach der Länge der Erkundung in *F-Hole (fast)* und *S-Hole (slow)* unterteilt. Die Definition für die *F-Hole*-Erkundung war eine Erkundungsdauer von kleiner gleich 175 ms. Dementsprechend wurde als *S-Hole*-Erkundung eine Erkundungsdauer von über 175 ms festgelegt. Diese Unterscheidung dient dazu das Erkundungsverhalten besser zu kategorisieren und folgte der Anweisung von *PANLAB Harvard Apparatus* für das von uns verwendete *Motor Activity Monitor-Set*.

2.4.3 Dark-Light Box

Die *Dark-Light Box* (DLB) dient als Verhaltensversuch zur Analyse von Angstverhaltensweisen (Crawley, 2007, p. 242). In einer Arena (gesamt: 30 x 50 cm; Lichtkompartiment 30 cm x 30 cm; Dunkelkompartiment 20 cm x 50 cm, Eigenbau) sind zwei Räume eingeteilt, die ein Drittel (abgedunkelt) und zwei Drittel (hell) der Arena einnehmen. Die Tiere konnten zwischen dem Dunkel- und Lichtkompartiment frei wählen.

Es sind 14 SrGAP3-Knockouttiere und 8 Kontrolltiere herangezogen worden. Die Versuchstiere wurden für 7 Minuten in die Versuchsarena gesetzt und die Beleuchtungsstärke ist auf 25 Lux eingestellt worden. Zur Messung der Versuchsparameter ist SMART Junior genutzt worden.

Gemessene Parameter im DLB-Versuch waren die Aktivität als insgesamt über die Dauer des Versuchs zurückgelegte Distanz und die Neugierde der Tiere. Die Neugierde wurde in diesem Falle definiert als Quotient aus dem Eintritt der Mäuse in das helle Lichtkompartiment (*Entry*), welcher manuell gemessen wurde, und dem ebenfalls manuell gemessenen Hineinblicken der Tiere (*Peering*) in das Versuchsgebiet. Diese Auswertung erfolgte nach dem arbeitsgruppeninternen Standard und wurde von Leif Koschützke das erste Mal genutzt.
Als *Entry* wurde ein Betreten des hellen Lichtkompartiments durch die Mäuse, sowie ein Verlassen dieses Lichtkompartiments mit der Schnauze voran definiert. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass es sich um weites Hineinwagen in das helle Lichtkompartiment handelte.
Das *Peering* entspricht einem Betreten des Versuchsfeldes mit der Schnauze voran, jedoch musste das Feld wieder rückwärts und nicht mit der Schnauze voran verlassen werden. Dadurch sollte das *Peering* am ehesten einem kurzen Erkunden und schnellen Zurückziehens in das dunkle Kompartiment entsprechen.

2.4.4 Morris Water Maze

Das *Morris Water Maze* (MWM) ist ein Lerntest, der insbesondere das räumliche, hippocampusspezifische Lernen zuverlässig abfragt (Wang und Morris, 2010). Der angewandte Versuchsablauf basiert auf einem ausführlichen Protokoll, welches im Folgenden zusammenfassend dargestellt wird (Vorhees und Williams, 2006).

Der Versuch wird in einem runden Wasserbecken (Durchmesser: 140 cm) durchgeführt. Dieses Wasserbecken ist mit ca. 850 Liter gefüllt und mithilfe von 2 Liter aufgelöster Milchpulver-Wasser-Lösung eingetrübt worden. Das Wasser ist auf eine Temperatur von 23°C +/- 1°C eingestellt worden.

Eine runde Plattform (Durchmesser: 14 cm, Plexiglas) wird in einem vorher festgelegten Quadranten knapp unterhalb der Wasseroberfläche positioniert. Das Ziel der Versuchstiere soll es sein diese Plattform zu erreichen. Die Plattformposition wird über die volle Zeit des Versuchs beibehalten, wohingegen die Einsetzposition der Maus einem Zufallsschema folgte. An der Wand des MWM waren Symbole in allen vier Haupthimmelsrichtungen angebracht, um eine Orientierung der Mäuse zu vereinfachen. Durch das Eintrüben der Flüssigkeit und das Absenken soll ein visuelles Erkennen der Plattform durch die Tiere verhindert werden. Zudem soll durch das Schwimmen in der Flüssigkeit eine olfaktorische Orientierung oder Kommunikation der Tiere untereinander verhindert werden.

Die Mäuse schwammen maximal 2 Minuten im MWM. Nach dieser Zeit wurden sie für 15 Sekunden auf die Plattform gesetzt, um sich orientieren zu können. Falls das Tier die Plattform selbstständig vor Ablauf der 2 Minuten erreicht haben sollte, wurde der Versuch an dieser Stelle beendet und die Zeit wurde gestoppt. Die gestoppte Zeit wurde gespeichert. Nach dem Schwimmen wurden die Tiere zum Trocknen und Aufwärmen in einen separaten Käfig gesetzt. 4 Tage lang wurden die Mäuse auf diese Weise 6 Mal täglich trainiert. Zwischen den einzelnen Einheiten waren mindestens 40 Minuten Zeit zur Erholung der Tiere vorgesehen. Am 5. Tag sind die Mäuse im sogenannten *Probe Trial* ein einziges Mal ohne Plattform die vollen 2 Minuten geschwommen. Es wurde dann ermittelt, wie viel Zeit sich die Tiere im richtigen Quadranten befunden und wie oft sie die Plattformposition gekreuzt haben.

Es sind jeweils 8 Wildtyp- und 8 SrGAP3- Knockouttiere für die Versuche herangezogen worden Die maximale Versuchsdauer pro Durchgang betrug 2 Minuten oder die Zeit wurde gestoppt, nachdem das Tier die Plattform selbstständig gefunden hat. Die Beleuchtung wurde auf 25 Lux eingestellt. Zur computergestützten Auswertung wurde SMART Junior genutzt. Abbildung 4 zeigt einen beispielhaften Verlauf des Schwimmverhaltens einer Maus im Verlauf des 4-tägigen Trainings.

Die analysierten Parameter umfassten mithilfe der Lernkurve den Fortschritt in der Zeit bis zum Erreichen der Zielplattform über die Tage des Trainings. Zudem wurde die durchschnittliche Geschwindigkeit der Mäuse während des *Probe Trials*, die Anzahl der Plattformüberquerungen während des *Probe Trials* und wieviel Zeit im richtigen Quadranten während des *Probe Trials* verbracht wurde gemessen.

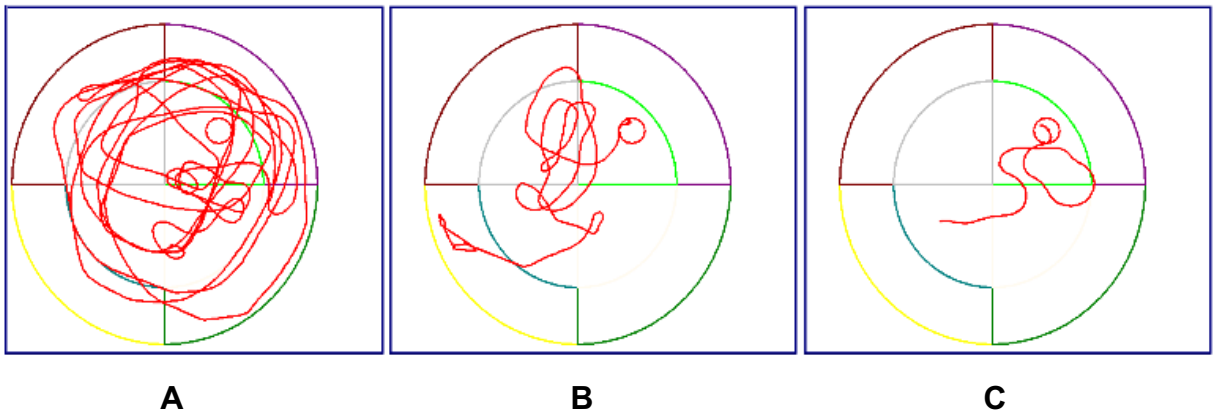

Abbildung 4. Definierte Zonen im Morris Water Maze und beispielhafter Lernfortschritt.

Dargestellt sind die 4 Quadranten des kreisförmigen Morris Water Maze (braun, lila, gelb und grün) und die Zielplattform (rot), welche sich in diesem Falle im oberen rechten Quadranten (auch: NordOst-Quadrant) befindet. Die roten Linien beschreiben das suchende Verhalten während des Schwimmens einer Wildtypmaus am ersten Tag des Trainings (siehe Abb. 4a), dem zweiten Tag (siehe Abb. 4b) und dem vierten Tag des Training (siehe Abb. 4c). Es ist eine weitaus zielgerichtete Bewegung der Maus über diese 3 Beispielbilder erkennbar. In A wird die Plattform nicht erreicht, in B nach einigem Suchen, in C dann jedoch sehr zielgerichtet.

2.4.5 Nest Building

Das *Nest Building* (NB) wurde als ein Verhaltensversuch zur Untersuchung des Sozialverhaltens und des allgemeinen Wohlbefindens eingesetzt (Crawley, 2007, pp. 194-195, pp. 207-210; Jirkof, 2014). Es ist beispielsweise bekannt, dass Mäuse, welche einen *Obsessive-Compulsive Disorder*-Komplex zeigen, dazu neigen keine Nester oder Nester von geringer Qualität zu bauen, wenn sie ohne weitere Deckung über Nacht in einem Käfig gehalten werden (Deacon, 2006a).
Unter der *Obsessive-Compulsive Disorder* (deutsch: Zwangsstörung) versteht man eine zwanghafte Störung mit sich wiederholenden Verhaltensweisen, welche willentlich nicht oder nur schwer unterbrochen werden können, hohe Komorbiditäten mit den *Neurodevelopmental Disorders* aufweisen und von einigen Autoren auch zu diesen gezählt werden (Geschwind, 2011).
Zur Testung des *Nest Buildings* wurden die Mäuse über Nacht in Versuchskäfige gesetzt und ihnen wurde nur ein exakt zugeschnittenes Teil des verwendeten Nestbaumaterials (Gewicht: 3g) neben Trinkwasser und Futter und Einstreu zur Verfügung gestellt.
Die Mäuse wurden eine Stunde vor ihrer Nachtphase in die vorbereiteten Käfige gesetzt. Die Auswertung des Nestbauverhaltens erfolgte jeweils am nächsten Morgen.

Es sind jeweils 6 Wildtyp- und 6 SrGAP3- Knockouttiere für die Versuche herangezogen worden.

Das Ergebnis des Nestbauverhaltens anhand eines 5- teiligen Scores von R. Deacon evaluiert (Deacon, 2006a). Ein Score von 1 entspricht einem Nestbaupellet, welches fast vollständig intakt geblieben ist (bis ca. 90% intakt). Ein Score von 2 entspricht einem teilweise auseinandergerissenen Nestpellet (ca. 50-90% intakt). Für einen Score von 3 musste das Pellet 50 – 90% zerrissen gewesen sein, jedoch war kein adäquates Nest erkennbar. Ein Score von 4 entspricht einem zu mindestens 90% zerrissenen Pellets und einem identifizierbaren, jedoch flachen Nest. Für einen Score von 5 mussten mindestens 90% des Pellets zerrissen sein und ein Nest mit einem erkennbaren Randwall vorzuweisen sein. Es waren auch Zwischenstufen zulässig, wie beispielsweise 3,5.
Zusätzlich ist das größte, nicht zerrissene Stück des Nestbaupellets erneut gewogen worden, um eine Analyse des Grades des Zerreissens der Pellets zu ermöglichen.

2.4.6 Marble Burying

Das *Marble Burying* (MB) wird zur Erfassung des Grabverhaltens genutzt (Deacon, 2006b). Es wird davon ausgegangen, dass durch *Marble Burying* und das Graben allgemein hippocampale Funktionen abgefragt werden (Deacon und Rawlins, 2005; Deacon, 2006c). Zudem scheint eine pharmakologische Behandlung mit angstlösenden Medikamenten, wie Benzodiazepinen, eine Verminderung des Grabverhaltens auszulösen (Deacon, 2006b). Diese Medikamente wirken auch bei Menschen und im Tiermodell bei Krankheiten wie Depression, Angststörungen und zwanghaften repetitiven Verhaltensstörungen, wie *Obsessive-Compulsive Disorders*. Zwanghafte Verhaltensweisen werden auch im Rahmen von Krankheiten wie Autismus und Schizophrenie berichtet und sind somit ebenfalls im Spektrum der *Neurodevelopmental Disorders* anzusiedeln (Hwang et al., 2006; Silverman et al., 2010; Tracy et al., 1996).

Das *Marble Burying* wurde nach dem folgenden beschriebenen Protokoll durchgeführt (Deacon, 2006b). Es wurde ein großer Haltungskäfig gleichmäßig mit 4 - 5 cm Einstreu ausgelegt. Es wurden 20 gleichförmige Murmeln mit einem Durchmesser von 15 mm in einem Muster von 4 mal 5 Murmeln ausgelegt. Alle Murmeln wurden ca. 20 mm voneinander entfernt platziert. Danach wurde eine Maus allein für 30 Minuten in den Käfig gesetzt. Die Maus wurde dann aus dem Käfig herausgenommen.

Es sind jeweils 8 Wildtyp- und 8 SrGAP3- Knockouttiere für die Versuche herangezogen worden. Die Mäuse sind 30 Minuten lang getestet worden. Die Beleuchtung wurde auf 25 Lux eingestellt.

Die analysierten Parameter umfassten die Anzahl der vergrabenen Murmeln. Als eingegraben wurden Murmeln definiert, die mindestens zwei Drittel ihres vollen Umfangs mit Einstreu bedeckt waren. Es wurden Fotos von jedem Käfig aufgenommen bevor die Maus hineingesetzt und nachdem sie wieder herausgenommen wurde, um den Unterschied zu dokumentieren (Deacon, 2006b).

Vorläufiger Versuchsaufbau

2.4.7 Novel Object Recognition

Es handelt sich bei diesem Versuchsaufbau um einen vorläufigen Aufbau, da Leif Koschützke diesen in der Arbeitsgruppe etabliert hat und dementsprechend zum ersten Mal nutzte.

Das *Novel Object Recognition* (NOR) wird als Test des Angst- und Entdeckungsverhaltens genutzt (Puma et al., 1999). Der Versuchsablauf wurde nach einem Versuchsprotokoll modifiziert und wird im Folgenden dargelegt (Bevins und Besheer, 2006).
In der oben erwähnten *Open Field*-Arena wurde eine Maus zwei von dreien zufällig gewählten Objekten ausgesetzt. Die Maus hatte daraufhin 5 Minuten Zeit, um sich diese Objekte anzusehen, sie zu erkunden und sich diese zu merken. Das Tier wurde danach aus der Box entfernt und eines der Objekte wurde zufällig durch ein neues ersetzt. Das Tier wurde daraufhin für 2 weitere Minuten in die Box gesetzt. Es wurde gemessen, inwiefern sich die Maus dem neuen Objekt näherte und wieviel Zeit sie in dessen Nähe verbrachte.

Es sind jeweils 8 Wildtyp- und 8 SrGAP3- Knockouttiere für die Versuche herangezogen worden. Die Versuchstiere wurden für insgesamt 7 Minuten - 5 Minuten, dann Objektwechsel und darauf noch einmal 2 Minuten - in die Versuchsarena gesetzt. Die Beleuchtungsstärke ist auf 25 Lux eingestellt worden. Zur Erfassung der Tiere wurde SMART Junior genutzt.
Das Objekt, welches ausgetauscht werden sollte, wurde zunächst mittels der SMART Junior-Software als eigene Zone definiert. Es konnte darüber gemessen werden, wie oft eine Erkundung dieses Objektes in den ersten 5 Minuten des Versuchs stattfand. Nach dem Wechsel des Objekts wurde für dieses neue Objekt erneut gemessen, wie oft das Tier sich in dessen Nähe aufhielt.

Die analysierten Parameter beinhalteten die über die Zeit von 7 Minuten für beide Anteile des Versuchs zurückgelegte Distanz, welche als Aktivität definiert wurde und Aufschluss darüber geben sollte, inwiefern die Tiere tatsächlich aktiv am Versuch teilnehmen. Des Weiteren wurde die Anzahl der Erkundungen für das erste Objekt und das neue Objekt gemessen.

3. Ergebnisse

Im Folgenden wird ein Überblick über die Ergebnisse der Experimente dieser Arbeit gegeben.

3.1 Open Field

In der Untersuchung der Mäuse im *Open Field*-Experiment wurde das Verhalten anhand der Beobachtung der Aktivität, welche der zurückgelegten Distanz der Mäuse im Versuch entspricht (siehe Abb. 5a), der Geschwindigkeit (siehe Abb. 5b) und der rastenden Zeit (siehe Abb. 5c), beobachtet. Keiner dieser Parameter zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Analyse der Zeit in den jeweiligen definierten Zonen (siehe Kapitel 2. MATERIAL UND METHODEN) konnte zwischen den Genotypen keinen Unterschied erbringen, jedoch eine signifikante Erniedrigung der Aufenthaltszeit in der zentralen Zone im Vergleich zur peripheren Zone über beide Genotypen hinweg aufzeigen (siehe Abb. 5d).

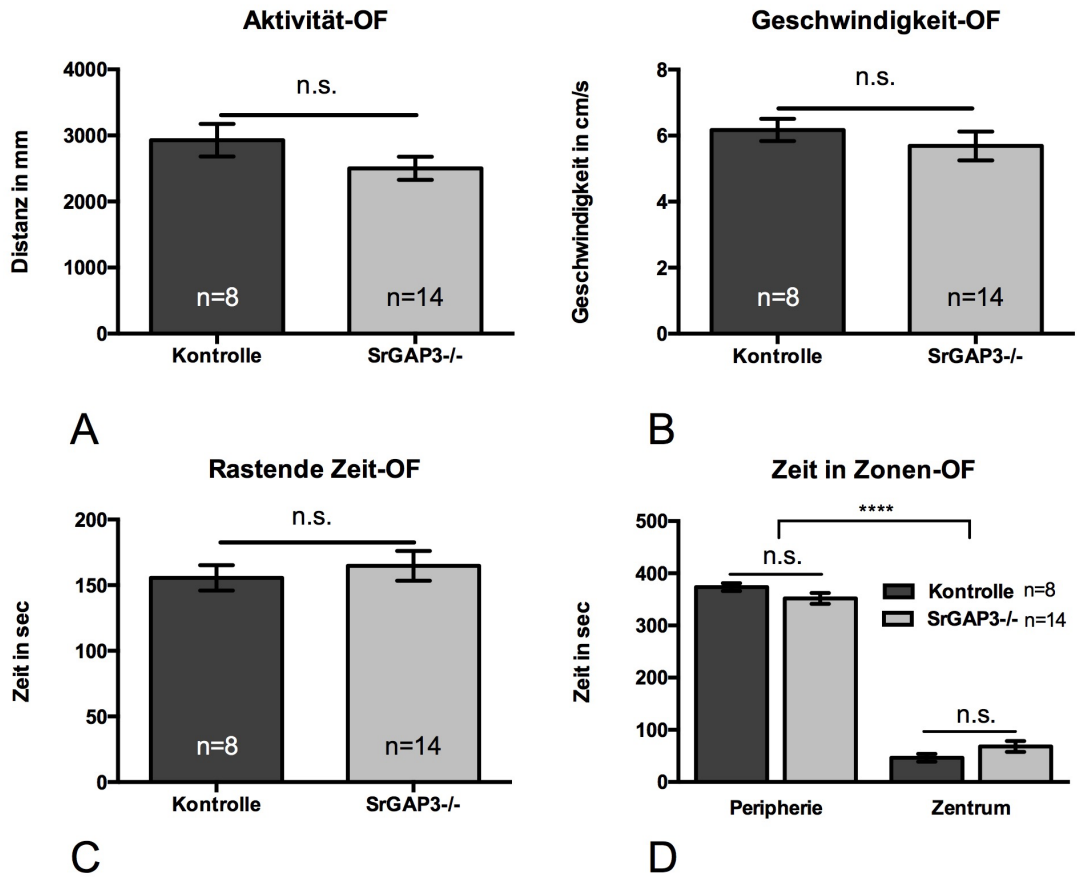

Abbildung 5. Ergebnisse Open Field.

(A) Aktivität.

(B) Geschwindigkeit.

(C) Rastende Zeit.

(D) Zeit in den Zonen (p=0,0001; F (3,40)= 288,2).

**=p≤0,05; **=p≤0,01; ***=p≤0,001; ****=p≤0,0001.*

Zur Post-Hoc-Analyse wurde Tukey's Test genutzt.

Es wurden Kontrolltiere (n=8) und SrGAP3-Knockouttiere (n=14) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

3.2 Hole Board

Nachfolgend werden die Ergebnisse des *Hole* Board-Versuchs dargestellt (siehe Abb. 6). Zur vergleichenden Analyse der Motorik wurde die Aktivität auch im *Hole Board* als über die gesamte Zeit des Versuchs zurückgelegte Distanz untersucht (siehe Abb. 6a). Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.
Die weitere Analyse des Verhaltens im *Hole Board*-Versuch wurde durch die Messung der Neugierde realisiert (siehe Abb. 6b). Die Neugierde wurde definiert als Anzahl der Erkundungen, welche elektronisch erfasst wurden und anhand der Zeitdauer der Exploration als S-Hole (*slow*) und F-Hole (*fast*) eingestuft wurden (siehe Kapitel 2. MATERIAL UND METHODEN). Es konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Genotypen sowohl in der S-Hole-, als auch in der F-Hole-Erkundung festgestellt werden. Jedoch konnte über beide Gruppen hinweg eine signifikant-erniedrigte Exploration der F-Hole-Konfiguration im Vergleich zur S-Hole-Konfiguration festgestellt werden. Dies spricht für ein konsistent häufigeres Vorkommen der langen Erkundungsdauer.

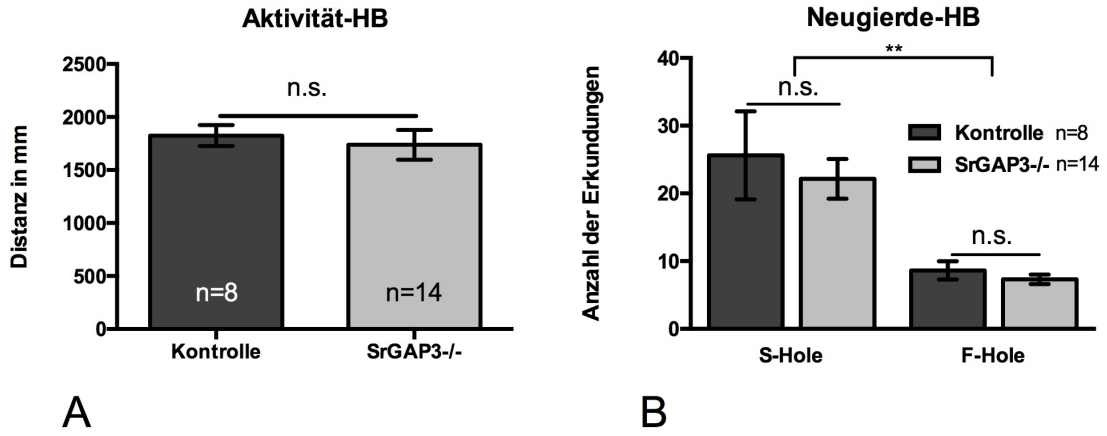

Abbildung 6. Ergebnisse Hole Board.

(A) Aktivität.
(B) Neugierde (p=0,002; F (3,38)= 8,654).
**=p≤0,05; **=p≤0,01; ***=p≤0,001.*
Zur Post-Hoc-Analyse wurde Tukey's Test genutzt.

Es wurden Kontrolltiere (n=8) und SrGAP3-Knockouttiere (n=14) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

3.3 Dark-Light Box

Die Ergebnisse der Untersuchung der Mäuse im *Dark-Light Box*-Versuch sind in Abb. 7 dargestellt und beinhalten die Resultate der Messung der Aktivität (siehe Abb. 7a) und der Neugierde (siehe Abb. 7b). Die Aktivität entspricht der zurückgelegten Distanz der Mäuse in dem Versuch. Die Neugierde wurde in diesem Falle als Quotient aus Eintritt und der gemessen Blickanzahl definiert. Die Analyse beider Parameter konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen aufzeigen.

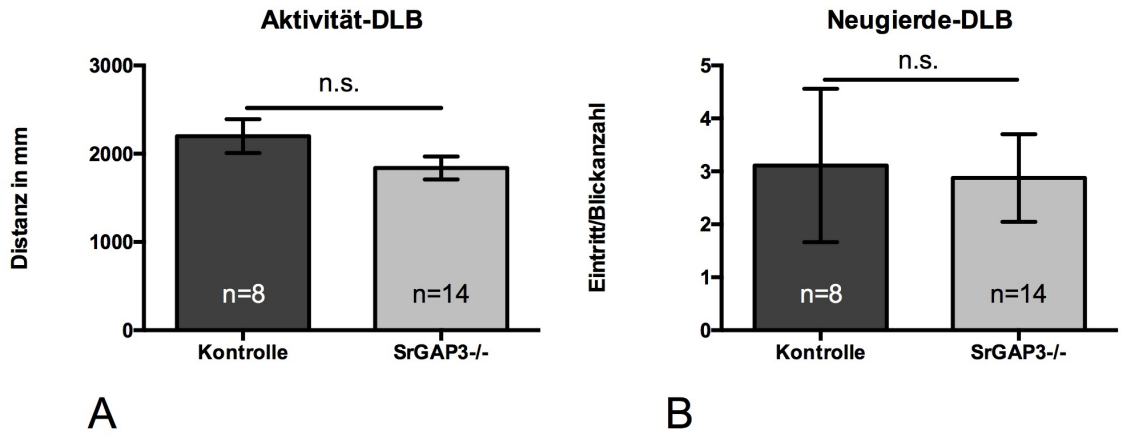

Abbildung 7. Ergebnisse Dark-Light Box.

(A) Aktivität.
(B) Neugierde.

Es wurden Kontrolle (n=8) und SrGAP3-Knockouttiere (n=14) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

3.4 Morris Water Maze

Die Analyse des Verhaltens der Mäuse im *Morris Water Maze* ergab folgende Ergebnisse (siehe Abb. 8). Gegenstand der Untersuchungen war die Messung mehrerer Parameter (siehe Kapitel 2. MATERIAL UND METHODEN).

Zur Dokumentation des Lernverhaltens über die Zeit des mehrtägigen Trainings wurde die Lernkurve vergleichend genutzt. Dafür wurde die durchschnittliche Zeit, welche die Mäuse an dem jeweiligen Tag bis zum erfolgreichen Erreichen der Plattform benötigten, gemessen (siehe Abb. 8a). Es ließ sich eine signifikante Erniedrigung der Schwimmzeit der Mäuse bis zum Erreichen der Plattform im Vergleich von Tag 1 zu Tag 2 zeigen. Diese Erniedrigung der Schwimmzeit fand über beide verglichenen Genotypen parallel statt.

Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Mäuse im sogenannten *Probe Trial* wurde vergleichend dargestellt, um eine Aussage über die Aktivität der Mäuse während des Versuchs zuzulassen (siehe Abb. 8b). Der *Probe Trial* wurde an Tag 5 des Trainings ohne Plattform und mit einer Schwimmzeit von den vollen 2 Minuten durchgeführt. Zudem wurde im *Probe Trial* die Anzahl der Plattformüberquerungen als Zeichen dafür dargestellt, wie oft die Mäuse die eigentliche Plattformposition entdeckt hätten(siehe Abb. 8c). Darüber hinaus wurde die Zeit im Zielquadranten während des *Probe Trials* analysiert, um zu überprüfen, ob die Mäuse die richtige Region des *Water Maze* ansteuerten (siehe Abb. 8d).

Es konnte im Vergleich der Knockouttiere mit den Kontrolltieren kein signifikanter Unterschied in einem dieser genannten Parameter festgestellt werden.

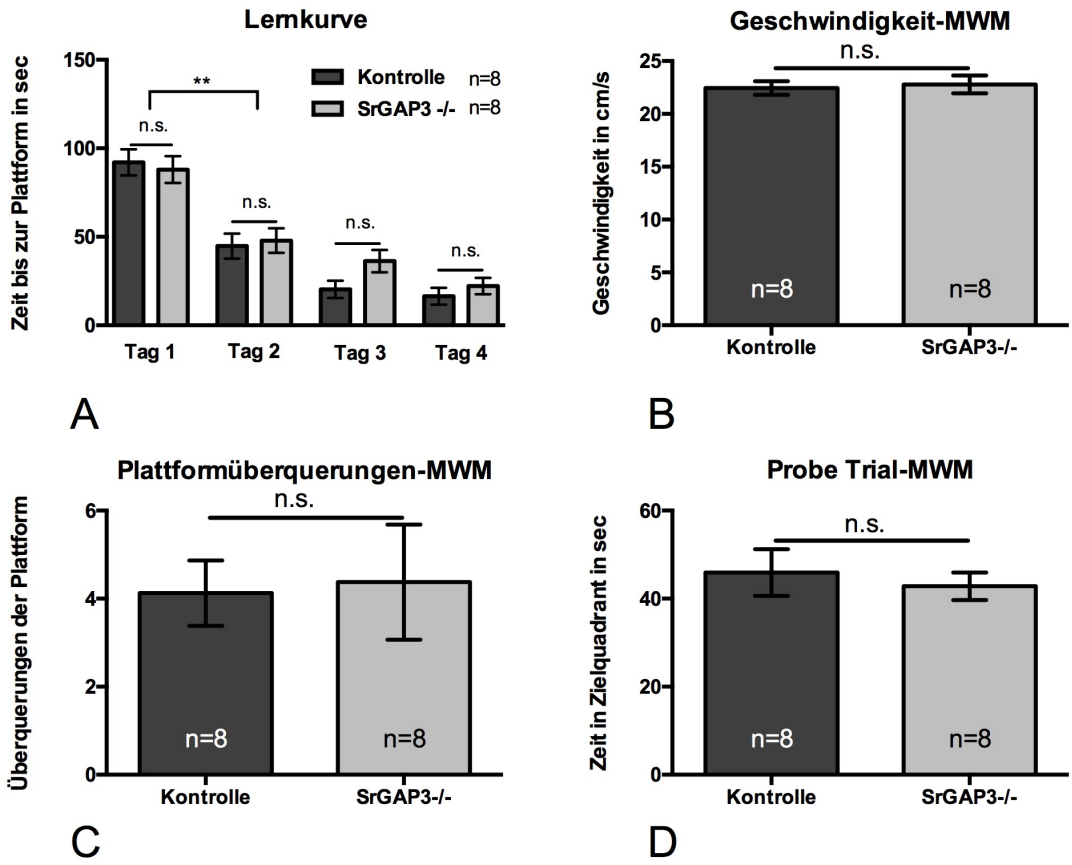

Abbildung 8. Ergebnisse Morris Water Maze.

(A) Lernkurve über insgesamt viertägiges Training (p= 0,0064; F(7,376)= 21,07).

(B) mittlere Geschwindigkeit im Probe Trial.

(C) Anzahl der Plattformüberquerungen im Probe Trial.

(D) Zeit im Zielquadranten während des Probe Trial.

**=p≤0,05; **=p≤0,01; ***=p≤0,001.*

Zur Post-Hoc-Analyse wurde Tukey's Test genutzt.

Es wurden Kontrolle (n=8) und SrGAP3-Knockouttiere (n=8) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

3.5 Nest Building

Die vergleichende Untersuchung der Knockout- und Kontrolltiere wird nachstehend illustriert (siehe Abb. 9). Zur Quantifizierung der Leistung der Mäuse im *Nest Building* wurde ein aus der Literatur bekanntes Bewertungssystem herangezogen (Deacon, 2006a). Aufgrund der dortigen Empfehlung wurde ein 5-teiliger Score genutzt (siehe Kapitel 2. MATERIAL UND METHODEN). Die gebauten Nester wurden dementsprechend eingestuft (siehe Abb. 9a). Zudem wurde das größte übrig gelassene Stück des Nestbaumaterials aus jedem Versuch gewogen (siehe Abb. 9b).
Es konnte kein signifikanter Unterschied in beiden untersuchten Parametern im Vergleich der beiden Gruppen festgestellt werden.

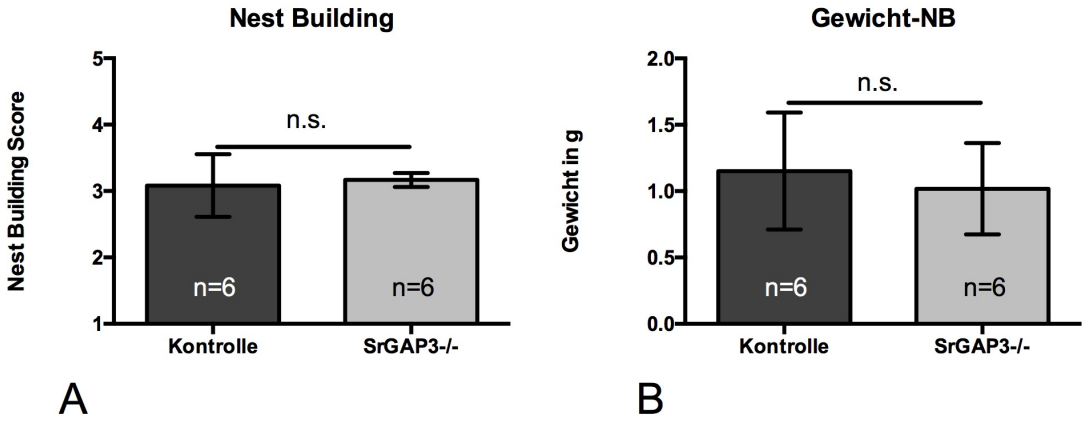

Abbildung 9. Ergebnisse Nest Building.

(A) Nest Building Score
(B) Gewicht des übrigen Nestbaumaterials.

Es wurden Kontrolle (n=6) und SrGAP3-Knockouttiere (n=6) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Für (A) wurde der Mann-Whitney U-Test genutzt.

3.6 Marble Burying

Im Folgenden werden die Ergebnisse des *Marble Burying*-Versuchs dargelegt (siehe Abb. 10). Es konnte eine signifikante Erniedrigung der durch die SrGAP3-Kockouttiere vergrabenen Murmeln im Vergleich mit ihren Kontrolltieren festgestellt werden.

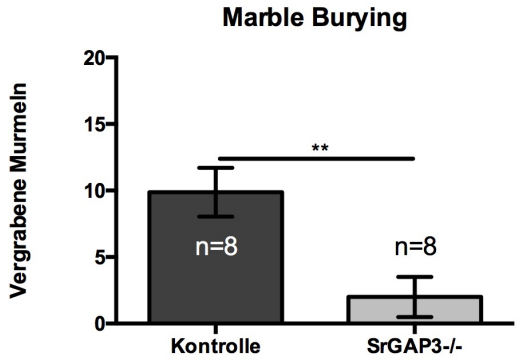

Abbildung 10. Ergebnis Marble Burying.

**=p≤0,05; **=p≤0,01; (p=0,0026)*

Es wurden Kontrolle (n=8) und SrGAP3-Knockouttiere (n=8) untersucht.
Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

3.7 Vorläufige Daten: Novel Object Recognition

Im Folgenden werden die vorläufigen Ergebnisse des durchgeführten *Novel Object Recognition*-Versuchs illustriert (siehe Abb. 11). Zunächst wurde die Aktivität der Mäuse als während der Dauer des Versuchs zurückgelegte Distanz aufgetragen (siehe Abb. 11a). Dann wurde die Untersuchung um die Erkundung des alten und des neuen Objekts im Vergleich unter Berücksichtigung der Genotypen ergänzt (siehe Abb. 11b).
In beiden untersuchten Parametern konnte kein signifikanter Unterschied des Verhaltens aufgedeckt werden.

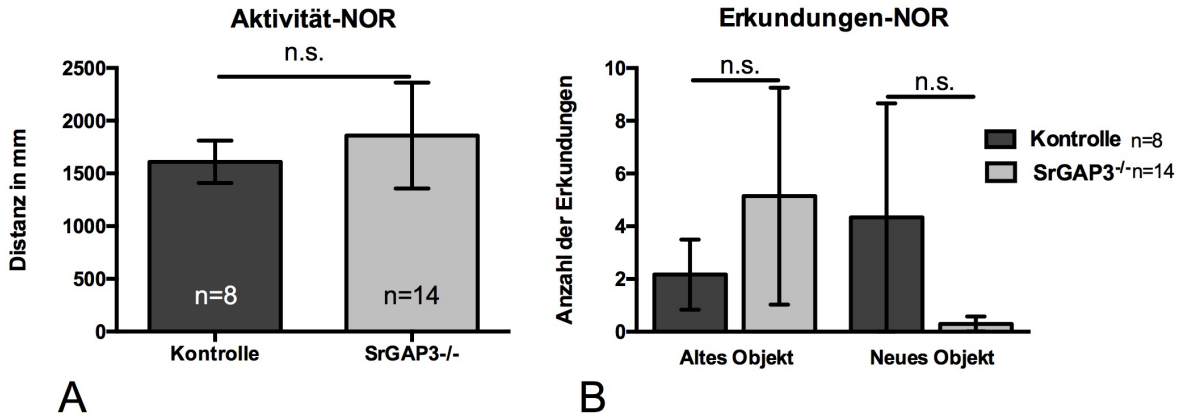

Abbildung 11. Ergebnisse Novel Object Recognition.

(A) Aktivität.
(B) Erkundungen.

Es wurden Kontrolle (n=8) und SrGAP3-Knockouttiere (n=14) untersucht. Es sind die Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

4. Diskussion

Die Gruppe der *Neurodevelopmental Disorders* umfasst ein Spektrum verschiedener, jedoch häufiger Krankheiten (Chelly et al., 2006; Yeargin-Allsopp und Boyle, 2002). Zu diesen können unter anderem die mentale Retardierung, Autismus-Spektrum-Erkrankungen, sowie die Schizophrenie gezählt werden und es besteht eine starke Assoziation mit erblichen Ursachen (Birnbaum und Weinberger, 2017; Jeste, 2015). Diese Krankheiten sind zum Teil mit einem hohen Leidensdruck und einer gesellschaftlichen Stigmatisierung der Patienten verbunden (Schomerus et al., 2013). Zudem sei zu beachten, dass ein nicht zu vernachlässigender Anteil der Gesundheitskosten für die Behandlung von *Neurodevelopmental Disorders* aufgebracht werden muss (Ropers, 2010). Aus diesen Gründen und dem zeitgleichen Aufkommen neuer Untersuchungsmethoden ist diese Gruppe von Erkrankungen von besonderem Interesse der Forschung (Yeung et al., 2017).

Im Rahmen dieser Arbeit ist ein definierter Gendefekt und seine Auswirkungen auf das Verhalten der Versuchstiere untersucht worden. Die Möglichkeit der Untersuchung am Tiermodell bot in dem Falle des gesamten SrGAP3-Projektes die Chance eine eingehende Analyse dieses Gendefekts auf Verhaltensebene, neuroanatomischer und bildgebender Ebene in einem Umfang durchzuführen, wie es am menschlichen Probanden nicht möglich gewesen wäre. Aus diesem Grunde bot sich die Entwicklung eines Tiermodells an, obgleich es ein menschlicher Proband war, an dem dieser Gendefekt erstmals mit allen ausgeprägten Auffälligkeiten, wie im ersten Kapitel beschrieben, entdeckt wurde. Aufgrund dieser Konstellation ist unserer Ansicht nach diese Vorgehensweise nicht als „Rückschritt“ vom Menschen zum Tiermodell hin, sondern viel eher als Möglichkeit der umfassenderen Analyse zu werten.

Die bereits durchgeführten Untersuchungen des Verhaltens von SrGAP3-defizienten Mäusen der kooperierenden Arbeitsgruppe aus dem *Zentralinstitut für Seelische Gesundheit* in Mannheim brachte die Erkenntnis, dass die Tiere Auffälligkeiten im Sozialverhalten, vermehrte repetitive Verhaltensmuster und ein auffälliges Ansprechen auf Methylphenidat präsentieren (Waltereit et al., 2012).
Fokus dieser Arbeit war eine Ergänzung und Erweiterung dieser Verhaltensanalyse von R. Waltereit mit besonderem Augenmerk auf das Lernverhalten, dem motorischen

Verhalten, der Analyse des Angstverhaltens und des Nestbau- bzw. Grabverhaltens als Indikator für komplexere Abweichungen. Es sind jeweils die auf dieselbe Art und Weise generierten Tiere aus derselben Zucht genutzt worden.
Unsere Intention in der Wiederholung des *Open Field*-Versuchs, wenn auch ohne eine medikamentöse Intervention, lag zunächst darin, sicherzustellen, inwiefern die Versuchstiere tatsächlich an den Versuchen teilnehmen, also eine Aktivität zeigten oder nicht. Darüber hinaus ergänzten wir die *Open Field*-Analyse um die Messung des Verhaltens der Mäuse in verschiedenen Zonen des Versuchsaufbaus. Uns erschien zudem eine Wiederholung des *Dark-Light-Box* Versuchs lohnenswert, da wir mit dem von uns definiertem Quotienten unterschiedliche Parameter als bei der ersten Messung durch die Arbeitsgruppe *Psychiatrische Tiermodelle* untersucht haben, einen anderen Versuchsaufbau genutzt haben und uns dabei neue Erkenntnis versprochen haben.

Die Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit lieferte als erste erstaunliche Erkenntnis, dass die Mäuse in unseren Versuchsaufbauten zusammenfassend keine motorischen Defizite, überprüft im *Open Field*, dem *Hole Board* oder dem *Dark-Light* Versuch, aufweisen. In diesen Versuchen zeigte sich eine konstante Aktivität, welche stets sehr ähnliche zu der der genutzten Kontrolltiere war. Zudem konnte in diesen Versuchen auch keine signifikante Änderung des Angstverhaltens festgestellt werden. Dies kann beispielsweise an der fehlenden Verhaltensänderung in der „Zeit in Zonen"-Analyse des *Open Fields* und der fehlenden Änderung in der „Neugierde" im *Hole Board* und *Dark-Light* Versuch festgemacht werden (siehe Abb. 5 - 7).
Interessanterweise konnte ebenso im *Water Maze*- Versuch kein signifikanter Unterschied des Verhaltens der SrGAP3-defizienten Mäuse im Vergleich mit ihren Kontrolltieren festgestellt werden (siehe Abb. 8). Die Lernkurve zeigte ein sehr kongruentes Lernverhalten der Tiere über die Tage des Trainings im *Morris Water Maze*. Auch war die Leistung der SrGAP3-defizienten Tiere im *Probe Trial* des Versuchs nicht unterschiedlich zu der Leistung ihrer Kontrolltiere. Dies spricht gegen eine gendefektbedingte Verschlechterung der räumlichen Orientierung oder des räumlichen Lernens. In allen den bislang angesprochenen Versuchen wurde gesondert die Aktivität der Mäuse aufgeführt, um vergleichend festzustellen, ob eine verminderte Aktivität der Mäuse vielleicht zu unterschiedlichen Ergebnissen im Abschneiden in diesen Versuchen beigetragen haben könnte. Dies war in keinem der Versuche der Fall.

Die Überprüfung des Nestbauverhaltens, sowie des Reagierens auf neue, unvertraute Objekte konnte ebenso keine signifikante Abweichung der SrGAP3-defizienten Mäuse zu Tage bringen. Im Versuch des *Nest Buildings* war sowohl, mit dem in der Literatur beschrieben Score, als auch mit der leichter objektivierbaren Messung des Gewichts des übrigen Nestbaumaterials kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar (siehe Abb. 9).
Die Untersuchung der Aktivität, sowie des Erkundens im *Novel Object Recognition*-Versuch konnte ebenfalls keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen aufzeigen (siehe Abb. 11).
In diesem Falle spricht das Ergebnis also gegen eine Einschränkung der für Nestbauverhalten verantwortlichen Areale des Gehirns, sowie erneut gegen ein vermehrtes Angstverhalten der Mäuse.

Ein überraschend deutlicher Unterschied ließ sich im *Marble Burying*- Versuch nachweisen, in dem die SrGAP3-defizienten Mäuse signifikant weniger Murmeln vergruben, als die zum Vergleich herangezogenen Kontrolltiere (siehe Abb. 10). Die Interpretation dieses Ergebnisses ist nicht ganz trivial, da die Meinung, welches Verhalten mit dem *Marble Burying* abgefragt wird, Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion ist (Deacon, 2006b).
Eine weithin akzeptierte Interpretationsweise geht davon aus, dass durch diesen Versuch im weitesten Sinne hippocampus-abhängiges Verhalten abgefragt wird, da Mäuse mit Hippocampus-Läsionen weniger Murmeln vergraben (Deacon und Rawlins, 2005). Zudem wird in der Literatur beispielsweise von Mäusen mit zwanghaften Verhaltensweisen berichtet, welche mehr Murmeln vergraben als ihre gesunden Kontrolltiere (Deacon, 2006b).
In diesem Sinne stellt sich die Frage, weswegen die SrGAP3-defizienten Tiere weniger Murmeln vergraben haben. Unserer Meinung nach scheint eine Einschränkung der hippocampus-spezifischen Aktivität oder der Wahrnehmung der Umwelt vorzuliegen, welche es den Mäusen möglicherweise nicht erlaubt, die Murmeln als etwas potenziell Nützliches anzusehen und diese deswegen nicht vergraben werden. Diese Einschränkung des Hippocampus scheint sich trotzdem nicht in einem eingeschränkten räumlichen Lernverhalten niederzuschlagen, wie die unauffälligen Ergebnisse im *Water Maze*-Versuch gezeigt haben.

Diese Diskrepanz ist besonders erwähnenswert, da noch hinzuzufügen ist, welch ausgeprägte anatomische Auffälligkeiten im Gehirn der SrGAP3-defizienten Mäuse zu finden waren. Diese haben jedoch anscheinend nur eine erstaunlich geringe Auswirkung auf das Verhalten der Mäuse. Vor diesem Hintergrund kann etwa die gefundene Zunahme der Schichtdicke einiger Fasertrakte im ZNS der von der Mutation betroffenen Tiere als eine Art Kompensationsmechanismus bzw. -versuch zu sehen sein.

Jedoch sollte in die Gesamtbetrachtung der möglichen kognitiven Einschränkung bei SrGAP3-Defizienz einfließen, dass die in dieser Arbeit eingesetzten Lernversuche, vorrangig das *Morris Water Maze*, am ehesten ein hippocampales Lernen abfragen.
Aus diesem Grunde würden sich andere Lernversuche zur weiteren tiefergehenden Untersuchung der kognitiven Leistungsfähigkeit der SrGAP3-defizienten Mäuse anbieten. Darunter sollten Tests sein, die am ehesten eine längere Gedächtnisleistung, sowie eher kortikale Prozesse abfragen. In der Arbeitsgruppe *Neuroanatomie* Greifswald finden solche Testverfahren neuerdings Anwendung. Hierunter sind beispielsweise Versuche, bei denen die Mäuse über einen speziell programmierten Apparat mittels eines Touchscreens Aufgaben lösen müssen, um eine Belohnung in Form von Futter zu erhalten. Solche Versuche sind bereits eingehend beschrieben worden und sind in der Lage unterschiedliche höhere kognitive Fähigkeiten abzufragen, wie zum Beispiel Konditionierung und Mustererkennung (Heath et al., 2015; Horner et al., 2013; Mar et al., 2013).
Als Testverfahren zur Gedächtnisleistung sei beispielsweise eine Wiederholung des *Water Maze*-Versuchs ohne erneutes Training nach mehreren Monaten denkbar (Takemiya et al., 2017). In dieser Publikation ist eine Überprüfung des Langzeitgedächtnisses der Tiere nach einem Monat erfolgt. Denkbar sind auch Versuchsaufbauten nach längerer Zeit. Limitierend muss hierbei bedacht werden, dass ältere Wildtypmäuse allgemein schlechtere Gedächtnisleistung erbringen (Wimmer et al., 2012).

Die Einbindung der SrGAP3-Defizienz im Spektrum der *Neurodevelopmental Disorders* erlaubt auch eine weniger auf ein einzelnes Krankheitsbild festgeschriebene Sichtweise dieses Gendefekts. So wurde bei der Untersuchung der menschlichen Patientin die mentale Retardierung und das auffällige ängstliche Verhalten als besonders vordergründig erachtet. Jedoch scheint das Lernverhalten, sowie das Angstverhalten im Mausmodell nicht auffällig zu sein. Dieses Ergebnis in Verbindung mit dem auffälligen Ergebnis im *Marble Burying*, welches doch für eine Einschränkung im hippocampus-spezifischen Verhalten im weiteren Sinne oder der Wahrnehmung der Umwelt spricht, ließe die Abkehr von der Lerneinschränkung als führendes Symptom der SrGAP3-Defizienz hin zu Autismus-Spektrum-Erkrankungen oder der Schizophrenie zu.
Bei der Erkrankung der Schizophrenie steht beim Menschen eine andere Wahrnehmung der Realität im Zentrum. Es bietet sich nun die Erklärung an, dass das schlechte Abschneiden der menschlichen Patientin vielleicht mit einer Unfähigkeit der Teilnahme an den üblichen Tests erklärbar sein könnte, wobei das Lernverhalten und damit einhergehend auch die Intelligenz vielleicht nicht in solch großem Maße eingeschränkt ist, es sich jedoch aufgrund des ausgeprägten Schweregrades der Erkrankung der Messbarkeit und damit dem Zugriff entzieht.

Im Verlauf dieser eingehenden Untersuchungen konnten auch Diskrepanzen zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen festgestellt werden. So stellte die Arbeitsgruppe von S. Soderling fest, dass aufgrund einer fehlangelegten Zellmigration im ZNS von SrGAP3-defizienten Tieren vermehrt Zellüberreste anfalle und dies über eine Verlegung des Aquädukts zu einem Aufstau von Liquor im Sinne eines *Hydrocephalus occlusus* führe (Kim et al., 2012).
Dem konnte unsere Arbeitsgruppe entgegensetzen, dass in denen von uns untersuchten SrGAP3-defizienten Tieren mikroskopisch keine Aquäduktstenose nachweisbar war. Jedoch konnten wir zeigen, dass eine Verminderung der Ziliendichte insbesondere im dritten Ventrikel der SrGAP3-defizienten Tiere zu finden war, welche möglicherweise den Transport des Liquors einschränkt (Koschützke et al., 2015).
Unserer Ansicht nach kann ein Grund für diese divergierenden Ergebnisse der zugrunde liegende Mechanismus der SrGAP3-Deletion bei den eingesetzten Versuchstieren sein. Die Arbeitsgruppe von S. Soderling hat ein konditionales Knockoutmodell genutzt, welches die SrGAP3-Defizienz nur in kortikalen Neuronen der Tiere realisiert hat (Kim et al., 2012).

Dem gegenüber steht der vom *Zentralinstitut für Seelische Gesundheit* kreierte traditionelle Knockout, welcher in allen Körperzellen eine SrGAP3-Defizienz hergestellt hat (Waltereit et al., 2012).
Unserer Meinung nach ist diese Art des Knockouts näher an dem genetischen Konstrukt der betroffenen Patientin und somit besser auf diese Situation übertragbar. Durch die konditionale Ausschaltung des Gens nur in kortikalen Zellen kann nicht ausgeschlossen werden, dass beispielsweise das Immunsystem oder die Gliazellen in die Ausprägung des Phänotyps eingreifen könnten. Der erbrachte Beweis, dass im ZNS Lymphgefäße vorhanden sind und weitere weitreichende Befunde der Interaktion, lassen zudem eine etwaige Einflussnahme des Immunsystems auf das Gehirn noch plausibler erscheinen (Fenster und Eisen, 2017; Louveau et al., 2015).

Einerseits zeigt dieses Beispiel unserer Meinung nach, dass wir ein valideres und realitätsnäheres Mausmodell untersuchen konnten. Dies ist unserer Ansicht nach besonders wichtig, um eine möglichst uneingeschränkte Übertragbarkeit von Erkenntnissen aus diesem Tiermodell auf den Menschen zuzulassen.
Andererseits ist die Übertragbarkeit von Erkenntnissen vom Tiermodell auf den Menschen weiterhin Gegenstand weitreichender Diskussionen. Dies birgt an sich Risiken der Fehlinterpretation oder hat in manchen Fällen zu Erkenntnissen geführt, die sich im Menschen nicht nachweisen ließen (u.a. Pound et al., 2004).
Insbesondere das Nachempfinden von psychiatrischen Erkrankungen im Tiermodell ist eine besondere Herausforderung, da psychische Symptome an Tieren aufgrund der fehlenden verbalen Kommunikationsfähigkeit schwieriger einzuschätzen sind, als es beim Menschen der Fall wäre (Arguello und Gogos, 2006). Aus diesem Grunde muss auf in vielen Studien validierte Versuche zurückgegriffen, welche Verhaltensweisen abfragen, die Korrelate von psychischen Symptomen im Tierreich entsprechen. Hierunter seien beispielsweise die von uns eingesetzten Versuche, sowie Versuche, die Belohnungsverhalten und das Sozialverhalten in Gruppen abfragen, zu nennen (Crawley, 2007, pp. 226-265).
Es wird jedoch immer wieder betont, dass ohne diese Grundlagenforschung an Modellorganismen ein vertieftes Verständnis der molekularen Zusammenhänge von psychiatrischen Erkrankungen unmöglich erscheint (Burne et al., 2011).

Im Folgenden soll ein kurzer Ausblick in die Entwicklung der psychiatrischen Grundlagenforschung gewagt werden. Das Feld der molekularen Erforschung psychiatrischer Erkrankungen hat, wie die Neurowissenschaften allgemein, einen rasanten Aufstieg und Wandel in den letzten Jahrzehnten erlebt (Yeung et al., 2017). Neue Methoden aus dem gesamten Spektrum der Neurowissenschaften geben zunehmend Möglichkeit pathophysiologische Zusammenhänge in der Entstehung dieser Krankheiten zu verstehen (Churchland und Sejnowski, 2016; Olds, 2016). Große Leuchtturmprojekte, wie das *Human Brain Project* und das *BRAIN Project (Brain Research through Innovative Neurotechnologies),* nehmen sich beispielsweise auf unterschiedliche Art der Kartierung des Konnektoms, also der Gesamtheit aller Verbindungen im ZNS an, da bei vielen Krankheiten eine Abweichung davon als Ursache vermutet (Amunts et al., 2016; Van Essen et al., 2013).

Hinzu kommen jedoch neue ungeahnte Möglichkeiten der Therapie. Beispielsweise wird der Technik der *Optogenetik*, also der zielgerichteten lichtinduzierten Beeinflussung von Zellen, enormes Potenzial zugeschrieben (Deisseroth und Hegemann, 2017; Rost et al., 2017). Die *Optogenetik* ermöglichte es bereits im Mausmodell Schaltkreise, die der Depression zugrunde liegen, einerseits aufzudecken, als auch therapeutisch zu beeinflussen (Covington et al., 2010; Hultman et al., 2018). Hier könnte vielleicht auch ein weiterer Ansatz zur Vertiefung der Erforschung des SrGAP3-Defekts, insbesondere der bereits beobachteten anatomischen Veränderungen und der wahrscheinlichen damit einhergehenden Abweichung des Konnektoms, liegen.

Eine weitere Möglichkeit der therapeutischen Intervention, welche seit Jahrzehnten intensiv erforscht wird, ist die Gentherapie (Naldini, 2015). Hierunter werden sehr unterschiedliche Methoden verstanden, welche durch Einbringen neuer, oder Regulation vorhandener, genetischer Information einen Einfluss ausüben. Vor Kurzem ist die erfolgreiche Veränderung der Genexpression bei der *Fragile X-linked Mental Retardation* beschrieben worden (Liu et al., 2018). Hierbei handelt es sich um eine Form der erblichen X-chromosomalen mentalen Retardierung, dem Fragilen X-Syndrom. Dies lässt die Möglichkeit eines gentherapeutischen Ansatzes zur Therapie der SrGAP3-Defizienz und verwandter Gendefekte nach intensiver Forschung realistisch erscheinen.

Abschließend sei festzustellen, dass im Rahmen des SrGAP3-Projektes der Arbeitsgruppe *Psychiatrische Tiermodelle* des *Zentralinstituts für Seelische Gesundheit* in Mannheim und der Arbeitsgruppe *Neuroanatomie* der Universitätsmedizin Greifswald eine umfassende Analyse eines definierten Gendefektes über mehrere Jahre hinweg durchgeführt wurde. Es lässt sich festhalten, dass starke neuroanatomische Auffälligkeiten in dem konstruierten Tiermodell gefunden wurden. Auf der Verhaltensebene, deren Vertiefung Ziel dieser Arbeit war, konnten erstaunlich geringe Abweichungen im Lern- und motorischen Verhalten zu Tage gefördert werden. Die dennoch gefundenen Unterschiede lassen auf eine mögliche divergierende Wahrnehmung der Umwelt durch die vom Gendefekt betroffenen Tiere schließen.

Dies kann im Kontext des Spektrums der *Neurodevelopmental Disorders*, welche mit Gendefekten dieser Art assoziiert sind, zu einer anderen Beurteilung der klinischen Ausprägung der SrGAP3-Defizienz führen – weg vom eher auf Lerndefiziten gelegten Fokus auf eine mögliche mentale Retardierung, hin zu einer eher veränderten Wahrnehmung der Umwelt, wie sie beispielsweise im Zuge von Autismus-Spektrum-Erkrankungen und der Schizophrenie auftreten kann.

5. Zusammenfassung

Mentale Retardierung (MR) wird definiert als ein erniedrigter Intelligenzquotient unter beziehungsweise gleich 70. Man weiß, dass MR im Rahmen anderer Krankheiten, wie Autismus oder Schizophrenie eine starke genetische Komponente in der Entstehung aufweist. Diesen Krankheiten liegen höchstwahrscheinlich entwicklungsbedingte Fehlanlagen von Nervenzellverbindungen, sowie eine verminderte synaptische Plastizität, also aktivitätsbedingte Veränderungen der bestehenden Nervenzell-verbindungen, zugrunde. Dieses Spektrum an Erkrankungen wird häufig als *Neurodevelopmental Disorders (ND)* zusammengefasst.

In den letzten Jahren wurden viele Gene identifiziert, die einerseits mit dem physiologischen Lernen, als auch bei deren Abwesenheit oder Fehlfunktion mit MR oder anderen Krankheiten im Spektrum der *ND* assoziiert werden konnten. Dazu gehört das SrGAP3-Gen mit dem dazugehörigen Produkt, dem Protein (*Slit-Robo Rho-GTPase activating Protein 3*). Gegenstand dieser Arbeit waren genetisch modifizierte Mäuse (Knockoutmäuse), deren SrGAP3-Gene vollständig ausgeschaltet wurden. In vorhergehenden morphologischen Untersuchen zeigten diese Mäuse eindrückliche Veränderungen des Zentralen Nervensystems (ZNS), wie eine Vergrößerung der Hirnmasse und insbesondere des Gesamtvolumens. Zudem fiel eine Vergrößerung der Ventrikel, den flüssigkeitsgefüllten Hohlräumen des ZNS, auf. Diese Vergrößerung wird als *Hydrocephalus* bezeichnet.

In dieser Arbeit wurden vergleichende Verhaltensversuche von gesunden Kontrollmäusen und modifizierten Knockoutmäusen durchgeführt. Diese Versuche beinhalteten unter anderem die Beobachtung der motorischen Fähigkeiten im *Open Field*, über Erfassung der Neugierde im *Hole Board*, räumliches Lernen im *Morris Water Maze*, Nestbauverhalten im *Nest Building*, sowie eine Erfassung des Grabtriebes im *Marble Burying*. Zu unserer Überraschung zeigten die Knockoutmäuse insbesondere in den Lerntests keine statistisch signifikante Verschlechterung, obwohl sie so starke Auffälligkeiten in der Anatomie zeigten.

Die signifikante Verschlechterung im *Marble Burying*, sowie das in Voruntersuchungen auffällig eingeschränkte Sozialverhalten der Knockoutmäuse, lassen in der Gesamtschau von der Annahme einer MR in Assoziation mit dem SrGAP3-Gendefekt Abstand nehmen. Eher rücken andere Krankheiten im Spektrum der ND in den Fokus. Insbesondere sei hier die Schizophrenie zu erwähnen bei der eine genetische Komponente mit Defekten von SrGAP3-ähnlichen Genen bereits in der Literatur beschrieben wurde.

6. Literaturverzeichnis

Addington, A.M., Rapoport, J.L. (2009).
The Genetics of Childhood-Onset Schizophrenia: When Madness Strikes the Prepubescent.
Current Psychiatry Reports *11*, 156–161.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter,P., Schäfer, U. (2017).
Molekularbiologie der Zelle.
6. Auflage (Weinheim: Wiley-VCH).
ISBN: 978-3-527-32384-5.

American Psychiatric Association (2013).
Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.
5. Auflage (Washington, D.C: American Psychiatric Association Publishing).
ISBN 978-0-89042-559-6.

Amunts, K., Ebell, C., Muller, J., Telefont, M., Knoll, A., Lippert, T. (2016).
The Human Brain Project: Creating a European Research Infrastructure to Decode the Human Brain.
Neuron *92*, 574–581.

Arguello, P.A., Gogos, J.A. (2006).
Modeling madness in mice: one piece at a time.
Neuron *52*, 179–196.

Bacon, C., Endris, V., Rappold, G.A. (2013).
The cellular function of srGAP3 and its role in neuronal morphogenesis.
Mechanisms of Development *130*, 391–395.

Bailey, K.R., Crawley, J.N., J.J. Buccafusco (Editor) (2009).
Anxiety-Related Behaviors in Mice. In Methods of Behavior Analysis in Neuroscience,
2. Auflage (Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis).
ISBN: 978-1-4200-5234-3.

Bear, M.F., Connors, B.W., Paradiso, M.A., Engel, A. (2008).
Neurowissenschaften - Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin
und Psychologie.
3. Auflage (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
ISBN: 978-3-662-49932-0.

Bertram, J., Koschützke, L., Pfannmöller, J.P., Esche, J., Diepen, L. van, Kuss, A.W., Hartmann, B., Bartsch, D., Lotze, M., von Bohlen und Halbach, O. (2016).
Morphological and behavioral characterization of adult mice deficient for SrGAP3.
Cell Tissue Research *366*, 1–11.

Bevins, R.A., Besheer, J. (2006).
Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study "recognition memory."
Nature Protocols *3*, 1306–1311.

Birnbaum, R., Weinberger, D.R. (2017).
Genetic insights into the neurodevelopmental origins of schizophrenia.
Nature Reviews Neuroscience *18*, 727.

Bryda, E.C. (2013).
The Mighty Mouse: The Impact of Rodents on Advances in Biomedical Research.
Missouri Medicine *110*, 207–211.

Burne, T., Scott, E., van Swinderen, B., Hilliard, M., Reinhard, J., Claudianos, C., Eyles, D., McGrath, J. (2011).
Big ideas for small brains: what can psychiatry learn from worms, flies, bees and fish?
Molecular Psychiatry *16*, 7–16.

Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., Renzi, P. (2002).
Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice.
Behavioral Brain Research *134*, 49–57.

Chechlacz, M., Gleeson, J.G. (2003).
Is mental retardation a defect of synapse structure and function?
Pediatric Neurology *29*, 11–17.

Chelly, J. (1999).
Breakthroughs in Molecular and Cellular Mechanisms Underlying X-Linked Mental Retardation.
Human Molecular Genetics and Genomics *8*, 1833–1838.

Chelly, J. (2000). MRX review.
American Journal of Medical Genetics *94*, 364–366.

Chelly, J., Khelfaoui, M., Francis, F., Chérif, B., Bienvenu, T. (2006).
Genetics and pathophysiology of mental retardation.
European Journal of Human Genetics *14*, 701.

Chen, C., Wirth, A., Ponimaskin, E. (2012).
Cdc42: An important regulator of neuronal morphology.
The International Journal of Biochemistry and Cell Biology *44*, 447–451.

Churchland, P.S., Sejnowski, T.J. (2016).
Blending computational and experimental neuroscience.
Nature Reviews Neuroscience, DOI: 10.1038/nrn.2016.114, 667-668.

Corrigan, P.W., Bink, A.B., Fokuo, J.K., Schmidt, A. (2015).
The public stigma of mental illness means a difference between you and me.
Psychiatry Research *226*, 186–191.

Covington, H.E., Lobo, M.K., Maze, I., Vialou, V., Hyman, J.M., Zaman, S., LaPlant, Q., Mouzon, E., Ghose, S., Tamminga, C.A., et al. (2010).
Antidepressant Effect of Optogenetic Stimulation of the Medial Prefrontal Cortex.
Journal of Neuroscience *30*, 16082–16090.

Crawley, J.N. (2007). What's Wrong With My Mouse?:
Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice.
2. Auflage (Hoboken, N.J: Wiley-Liss).
DOI: 10.1002/9780470119051.

Deacon, R.M.J. (2006a). Assessing nest building in mice.
Nature Protocols *3,* 1117–1119.

Deacon, R.M.J. (2006b).
Digging and marble burying in mice: simple methods for *in vivo* identification of biological impacts.
Nature Protocols *1*, 122-124.

Deacon, R.M.J. (2006c).
Burrowing in rodents: a sensitive method for detecting behavioral dysfunction.
Nature Protocols *1*, 118-121.

Deacon, R.M.J., Rawlins, J.N.P. (2005).
Hippocampal lesions, species-typical behaviours and anxiety in mice.
Behavioural Brain Research *156*, 241–249.

Deisseroth, K., Hegemann, P. (2017). The form and function of channelrhodopsin.
Science *357*, eaan5544.

Doernberg, E., Hollander, E. (2016).
Neurodevelopmental Disorders (ASD and ADHD): DSM-5, ICD-10, and ICD-11.
CNS Spectrums *21*, 295–299.

Endris, V., Wogatzky, B., Leimer, U., Bartsch, D., Zatyka, M., Latif, F., Maher, E.R., Tariverdian, G., Kirsch, S., Karch, D., et al. (2002).
The novel Rho-GTPase activating gene MEGAP/ srGAP3 has a putative role in severe mental retardation.
Proceedings of the National Academy of Science USA *99*, 11754–11759.

Evans, B. (2013). How autism became autism.
History of the Human Sciences *26*, 3–31.

Fenster, R.J., Eisen, J.L. (2017).
Checking the Brain's Immune Privilege: Evolving Theories of Brain-Immune Interactions.
Biological Psychiatry *81*, e7–e9.

Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., Matus, A. (1998).
Rapid Actin-Based Plasticity in Dendritic Spines.
Neuron *20*, 847–854.

Fusar-Poli, P., Politi, P. (2008).
Paul Eugen Bleuler and the Birth of Schizophrenia (1908).
American Journal of Psychiatry *165*, 1407–1407.

Geschwind, D.H. (2011). Neurodevelopmental disorders: hope for a new beginning.
Current Opinion in Neurology *24*, 95–97.

Govek, E.-E., Newey, S.E., Van Aelst, L. (2005).
The role of the Rho GTPases in neuronal development.
Genes and Development *19*, 1–49.

Guan, K.-L., Rao, Y. (2003).
Signalling mechanisms mediating neuronal responses to guidance cues.
Nature Reviews Neuroscience *4*, 941–956.

Hall, A. (1998). Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton.
Science *279*, 509–514.

Hamdan FF, Gauthier J, Pellerin S. (2009).
No association between srgap3/megap haploinsufficiency and mental retardation.
Archives of Neurology *66*, 675–677.

Heath, C.J., Bussey, T.J., Saksida, L.M. (2015).
Motivational assessment of mice using the touchscreen operant testing system: effects of dopaminergic drugs.
Psychopharmacology (Berl.) *232*, 4043–4057.

Hermey, G., Mahlke, C., Schwake, M., Sommer, T. (2010).
Der Experimentator: Neurowissenschaften.
1. Auflage (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
ISBN: 978-3-8274-2369-6.

Horner, A.E., Heath, C.J., Hvoslef-Eide, M., Kent, B.A., Kim, C.H., Nilsson, S.R.O., Alsiö, J., Oomen, C.A., Holmes, A., Saksida, L.M., et al. (2013).
The touchscreen operant platform for testing learning and memory in rats and mice.
Nature Protocols *8*, 1961–1984.

Hultman, R., Ulrich, K., Sachs, B.D., Blount, C., Carlson, D.E., Ndubuizu, N., Bagot, R.C., Parise, E.M., Vu, M.-A.T., Gallagher, N.M., et al. (2018).
Brain-wide Electrical Spatiotemporal Dynamics Encode Depression Vulnerability.
Cell *173, 1-15*.

Hwang, M.Y., Yum, S.Y., Losonczy, M.F., Mitchell, G., Kwon, J.S. (2006).
Schizophrenia with obsessive compulsive features.
Psychiatry (Edgmont) *3*, 34–41.

Jeste, S.S. (2015). Neurodevelopmental Behavioral and Cognitive Disorders.
CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology.
Behavioral Neurology and Neuropsychiatry, 690–714.

Jirkof, P. (2014). Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice.
Journal of Neuroscience *Methods 234*, 139–146.

Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T. (1995). Neurowissenschaften: Eine Einführung.
1. Auflage (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
ISBN: 978-3-8274-2905-6.

Kim, I.H., Carlson, B.R., Heindel, C.C., Kim, H., Soderling, S.H. (2012).
Disruption of wave-associated Rac GTPase-activating protein (Wrp) leads to abnormal adult neural progenitor migration associated with hydrocephalus.
Journal of Biological Chemistry *287*, 39263–39274.

Koschützke, L., Bertram, J., Hartmann, B., Bartsch, D., Lotze, M.,
von Bohlen Und Halbach, O. (2015).
SrGAP3 knockout mice display enlarged lateral ventricles and specific cilia disturbances of ependymal cells in the third ventricle.
Cell Tissue Research *361, 645-650.*

Kumbier, E., Domes, G., Herpertz-Dahlmann, B., Herpertz, S.C. (2010).
Autismus und autistische Störungen.
Der Nervenarzt *81*, 55–65.

Liu, X.S., Wu, H., Krzisch, M., Wu, X., Graef, J., Muffat, J., Hnisz, D., Li, C.H., Yuan, B.,
Xu, C., et al. (2018).
Rescue of Fragile X Syndrome Neurons by DNA Methylation Editing of the FMR1 Gene.
Cell *172*, 979–992.e6.

Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Kevin, S.L., et al. (2015).
Structural and functional features of central nervous system lymphatics.
Nature *523*, 337–341.

Mar, A.C., Horner, A.E., Nilsson, S.R.O., Alsiö, J., Kent, B.A., Kim, C.H., Holmes, A., Saksida, L.M., Bussey, T.J. (2013).
The touchscreen operant platform for assessing executive function in rats and mice.
Nature Protocols *8*, 1985–2005.

McGrath, J., Saha, S., Chant, D., Welham, J. (2008).
Schizophrenia: A Concise Overview of Incidence, Prevalence, and Mortality.
Epidemiologic Reviews *30*, 67–76.

Miki, H., Suetsugu, S., Takenawa, T. (1998).
WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac.
EMBO Journal *17*, 6932–6941.

Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat.
Journal of Neuroscience *Methods 11*, 47–60.

Murray, R.M., Lewis, S.W. (1987). Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? Britisch Medical Journal (Clinical Research Edition) *295*, 681–682.

Naldini, L. (2015). Gene therapy returns to centre stage.
Nature *526*, 351–360.

Olds, J.L. (2016). The rise of team neuroscience.
Nature Reviews Neuroscience *17, 601-602.*

Perlman, R.L. (2016). Mouse models of human disease.
Evolution, Medicine and Public Health *2016*, 170–176.

Pound, P., Ebrahim, S., Sandercock, P., Bracken, M.B., Roberts, I. (2004).
Where is the evidence that animal research benefits humans?
British Medical Journal *328*, 514–517.

Puma, C., Deschaux, O., Molimard, R., Bizot, J.-C. (1999).
Nicotine improves memory in an object recognition task in rats.
European Neuropsychopharmacology *9*, 323–327.

Ramakers, G.J. (2000). Rho proteins and the cellular mechanisms of mental retardation.
American Journal of Medical Genetics *94*, 367–371.

Rapoport, J., Giedd, J., Gogtay, N. (2012).
Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012.
Molecular Psychiatry *17*, 1228–1238.

Ropers, H.H. (2010). Genetics of Early Onset Cognitive Impairment.
Annual Review of Genomics and Human Genetics *11*, 161–187.

Rost, B.R., Schneider-Warme, F., Schmitz, D., Hegemann, P. (2017).
Optogenetic Tools for Subcellular Applications in Neuroscience.
Neuron *96*, 572–603.

Saha, S., Chant, D., Welham, J., McGrath, J. (2005).
A Systematic Review of the Prevalence of Schizophrenia.
PLoS Medicine *2.5, 0413-0433.*

Schmitt, A., Hasan, A., Gruber, O., Falkai, P. (2011).
Schizophrenia as a disorder of disconnectivity.
European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience *261*, 150–154.

Schomerus, G., Matschinger, H., Angermeyer, M.C. (2013).
Continuum beliefs and stigmatizing attitudes towards persons with schizophrenia, depression and alcohol dependence.
Psychiatry Research *209*, 665–669.

Silverman, J.L., Mu Yang, Lord, C., Crawley, J.N., Yang, M. (2010).
Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism.
Nature Reviews Neuroscience *11*, 490–502.

Soderling, S.H., Langeberg, L.K., Soderling, J.A., Davee, S.M., Simerly, R., Raber, J., Scott, J.D. (2003).
Loss of WAVE-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice.
Proceedings of the National Academy of Science USA *100*, 1723–1728.

Sontheimer, H. (2015). Diseases of the Nervous System.
1. Auflage (San Diego: Academic Press).
DOI: 10.1016/B978-0-12-800244-5.00011-2.

Takemiya, T., Fumizawa, K., Yamagata, K., Iwakura, Y., Kawakami, M. (2017).
Brain Interleukin-1 Facilitates Learning of a Water Maze Spatial Memory Task in Young Mice.
Frontiers in Behavioural Neuroscience *11*, Article 202, *1-10.*

Tracy, J.I., de Leon, J., Qureshi, G., McCann, E.M., McGrory, A., Josiassen, R.C. (1996). Repetitive behaviors in schizophrenia: a single disturbance or discrete symptoms? Schizophrenia Research *20*, 221–229.

Trahan, L., Stuebing, K.K., Hiscock, M.K., Fletcher, J.M. (2014).
The Flynn Effect: A Meta-analysis.
Psychological Bulletin *140*, 1332–1360.

Vaillend, C., Poirier, R., Laroche, S. (2008). Genes, plasticity and mental retardation. Behavioural Brain Research *192*, 88–105.

Van Essen, D.C., Smith, S.M., Barch, D.M., Behrens, T.E.J., Yacoub, E., Ugurbil, K. (2013). The WU-Minn Human Connectome Project: An Overview.
NeuroImage *80*, 62–79.

Vorhees, C.V., Williams, M.T. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory.
Nature Protocols *1*, 848–858.

Waltereit, R., Leimer, U., von Bohlen Und Halbach, O., Panke, J., Hölter, S.M., Garrett, L., Wittig, K., Schneider, M., Schmitt, C., Calzada-Wack, J., et al. (2012).
Srgap3^{-}/$^{-}$ mice present a neurodevelopmental disorder with schizophrenia-related intermediate phenotypes.
FASEB Journal *26*, 4418–4428.

Wang, S.-H., Morris, R.G.M. (2010).
Hippocampal-neocortical interactions in memory formation, consolidation, and reconsolidation.
Annual Reviews of Psychology *61*, 49–79, C1-4.

Wimmer, M., Hernandez, P., Blackwell, J., Abel, T. (2012).
Aging impairs hippocampus-dependent long-term memory for object location in mice.
Neurobiology of Aging *33*, 2220–2224.

Wong, K., Ren, X.R., Huang, Y.Z., Xie, Y., Liu, G., Saito, H., Tang, H., Wen, L., Brady-Kalnay, S.M., Mei, L., et al. (2001).
Signal transduction in neuronal migration: roles of GTPase activating proteins and the small GTPase Cdc42 in the Slit-Robo pathway.
Cell *107*, 209–221.

Xavier, J., Bursztejn, C., Stiskin, M., Canitano, R., Cohen, D. (2015).
Autism spectrum disorders: An historical synthesis and a multidimensional assessment toward a tailored therapeutic program.
Research of Autism Spectrum Disorders *18*, 21–33.

Xiao, Z., Qiu, T., Ke, X., Xiao, X., Xiao, T., Liang, F., Zou, B., Huang, H., Fang, H., Chu, K., et al. (2014).
Autism Spectrum Disorder as Early Neurodevelopmental Disorder: Evidence from the Brain Imaging Abnormalities in 2–3 Years Old Toddlers.
Journal of Autism and Developmental Disorders *44*, 1633–1640.

Yang, Y., Marcello, M., Endris, V., Saffrich, R., Fischer, R., Trendelenburg, M.F., Sprengel, R., Rappold, G. (2006).
MEGAP impedes cell migration via regulating actin and microtubule dynamics and focal complex formation.
Experimental Cell Research *312*, 2379–2393.

Yeargin-Allsopp, M., Boyle, C. (2002).
Overview: The epidemiology of neurodevelopmental disorders.
Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews *8*, 113–116.

Yeung, A.W.K., Goto, T.K., Leung, W.K. (2017).
The Changing Landscape of Neuroscience Research, 2006–2015: A Bibliometric Study.
Frontiers in Neuroscience *11*, Article 120, *1-10.*

7. Anhang

7.1 Eidesstattliche Erklärung

Auf die Darstellung wurde in der allgemein zugänglichen Veröffentlichung verzichtet.

7.2 Lebenslauf

Auf die Darstellung wurde in der allgemein zugänglichen Veröffentlichung verzichtet.

7.3 Liste der Veröffentlichungen

7.3.1 Originalarbeiten

(I)

Jonathan Bertram, **Leif Koschützke**, Jörg P. Pfannmöller, Jennifer Esche, Laura van Diepen, Andreas W. Kuss, Bianca Hartmann, Dusan Bartsch, Martin Lotze, Oliver von Bohlen und Halbach

Morphological and behavioral characterization of adult mice deficient for SrGAP3.

Erstmals online veröffentlicht am 17. Mai 2016
in Cell Tissue Research
DOI: 10.1007/s00441-016-2413-y

(II)

Leif Koschützke, Jonathan Bertram, Bianca Hartmann, Dusan Bartsch, Martin Lotze, Oliver von Bohlen und Halbach

SrGAP3 knockout mice display enlarged lateral ventricles and specific cilia disturbances of ependymal cells in the third ventricle.

Erstmals online veröffentlicht am 24. Juni 2015
In Cell Tissue Research
DOI: 10.1007/s00441-015-2224-6

Leif Koschützke und Jonathan Bertram haben jeweils gleichwertig zur Entstehung der Publikationen beigetragen.

7.3.2 Kongressbeiträge

Leif Koschützke, Jonathan Bertram, Jörg P. Pfannmöller, Jennifer Esche,
Laura van Diepen, Andreas W. Kuss, Dusan Bartsch, Martin Lotze,
Oliver von Bohlen und Halbach

Srgap3 knockout mice display enlarges lateral ventricles, altered hippocampal architecture and are not able to solve the marble burying task.

Beitrag zur Posterpräsentation
auf der 31. Jahrestagung der Deutschen Anatomischen Gesellschaft
23.-25. September 2015
in Würzburg

7.3.3 Vorträge

Leif Koschützke, Oliver von Bohlen und Halbach

Einfluss einer Deletion von SrGAP3 auf Lern- und Gedächtnisprozesse

Beitrag zur Abschlusspräsentation
des
Gerhard-Domagk-Nachwuchsförderprogramms
der Universitätsmedizin Greifswald
25. März 2014
in Greifswald

7.4 Danksagung

Zuvorderst möchte ich Professor Oliver von Bohlen und Halbach und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Neuroanatomie danken. Durch die enorme Unterstützung konnte ich meine Arbeit bewältigen und habe immer aufschlussreiche und informative Gespräche führen können. Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Anatomischen Instituts sagen, dass es mir immer eine Freude war zur Arbeit zu kommen.

Ich möchte meiner Freundin und meinen Freunden für all die aufmunternden Worte, anregende Kritik und unvergesslichen Momente danken, die mich durch mein Studium begleiteten und Greifswald zu einem neuen Zuhause haben werden lassen.

Das letzte Dankeswort gebührt meinen Eltern. Auch wenn diese Dankbarkeit schwer in Worte zu fassen ist, versuche ich es. Ohne ihre Unterstützung, Geborgenheit und Zuverlässigkeit hätte ich nicht den Weg einschlagen können, auf dem ich mich jetzt befinde.