

Aus dem Zentralinstitut für seelische Gesundheit
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Meyer-Lindenberg)

Die Rolle des mGlu-2/3 Rezeptors im Belohnungssystem und dessen Einfluss auf Suchtverhalten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu Heidelberg

vorgelegt von
Konstantin Philipp Johannes Wagner

aus
Mannheim
2022

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Wolfgang Sommer

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	7
1.1 Abhängigkeit und das neuronale Belohnungssystem	9
1.1.1 Das neuronale Belohnungssystem	9
1.1.2 Glutamat als Neurotransmitter	11
1.1.3 Die Rolle des mGlu-2 Rezeptors in der Abhängigkeit.....	12
1.1.4 Der mediale präfrontale Cortex und die Verhaltenskontrolle	15
1.2 Tiermodelle in der Suchtforschung	17
1.2.1 cFos als Proxymarker für neuronale Aktivität	17
1.2.2 Transgene Ratten cFos-lacZ Tiermodelle	19
1.2.3 Alkoholaufnahme und Entwicklung abhängigen Verhaltens	20
1.2.4 Modelle der Rückfall-Wahrscheinlichkeit und des Cravings	22
1.2.5 Manipulation der mRNA des mGluR-2 im IL des mPFC	23
1.3 Zielsetzung	26
2 MATERIAL UND METHODEN.....	28
2.1 cFos-lacZ-Projekt	28
2.1.1 Tiere	28
2.1.2 Handling und Perfusion	29
2.1.3 Hirnschnitte.....	29
2.1.4 X-Gal Staining	30
2.1.5 DAB Staining	30
2.1.6 Aufnahmen am Mikroskop	30

2.1.7	Auswertung der Aufnahmen	31
2.1.8	Statistik.....	32
2.2	Adenovirus basierter mGluR-2 Knockdown im infralimbischen Cortex	32
2.2.1	Tiere	32
2.2.2	Der Virus	32
2.2.3	Stereotaktische Adeno-assoziierte Virus-AAV-Injektion	33
2.2.4	Dekapitierung der Ratten.....	34
2.2.5	Schneiden und Färben der Hirne.....	34
2.2.6	Aufnahme der Bilder	35
2.2.7	Auswertung der Aufnahmen	36
3	ERGEBNISSE	38
3.1	Ergebnisse cFos-Mapping nach mGluR-2/3-Agonist-Injektion.....	38
3.1.1	Paraventriculärer Thalamus	39
3.1.2	Hippocampus CA1, CA3.....	40
3.1.3	Caudate Putamen dorsolateraler Quadrant.....	41
3.1.4	Nukleus Accumbens Shell & Cor.....	42
3.1.5	Medialer präfrontaler Cortex A24a & A25.....	43
3.2	Ergebnisse des mGlu-2R Knockdown mit Hilfe des AAV-Virus.....	44
3.2.1	Absolute Grauwerte im medialen präfrontalen Cortex	44
3.2.2	Vergleich des Quotienten mGluR-2-mRNA Signal in GFP + / GFP-....	45
4	DISKUSSION	47
4.1	Neuronale Aktivität in belohnungsrelevanten Regionen	48
4.1.1	Der Glutamatagonist LY379268	49
4.1.2	18FDG-PET nach Glutamatagonist LY379268 Behandlung.....	50

4.1.3	Interpretation nach der Region	52
4.1.4	Vor – und Nachteile der auf cFos basierenden Methoden.....	56
4.1.5	Methodische Stärken und Schwächen der Versuchsreihe	58
4.2	Diskussion Knockdown des mGlu-2 Rezeptors.....	60
4.2.1	Methodische Stärken und Schwächen	62
4.2.2	CAV2-Cre und shRNA-AAV-Kombination	65
4.2.3	Ausblick	66
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	69
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	71
7	TABELLARISCHER ANHANG.....	80
8	VERÖFFENTLICHUNG.....	95
9	LEBENS LAUF.....	96
10	DANKSAGUNG	97

Abkürzungsverzeichnis

5-HT2AR	Subtyp des Serotoninrezeptors
Aap	Assemblierung
AAV	Adeno-assoziierte Virus
Abb	Abbildung
ACC	Anteriorer cingulärer Cortex
Amy	Amygdala
BLA	Basolaterale Amygdala
Ca	Calcium
cAMP	Cyklisches Adenosin Monophosphat
Cap	Kapsid
cFos	Protoonkogen aus der Fos Familie
CIE	Chronisch intermittierende Ethanolexposition
CT	Computertomographie
CTb	Cholertoxin-Untereinheit B
DA	Dopamin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (Fluoreszenzfarbstoff)
Daun02	Substrat der β -Galactosidase, wird zu Daunorubicin
DNA	Desoxy - ribonucleic acid
DS	Dorsales Striatum
DSM-V	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders V
dsRNA	Doppelstrang RNA
EtOH	Ethanol
EXT	Extended
FDG	Fludeoxyglucose
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFP	Green fluorescent Protein
Gi-Prot	Inhibitorisches G-Protein
Glu	Glutamat
GPCR	GTP-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
Hipp	Hippocampus
HSV	Herpes-Simplex Virus
ICD	International code of disease

IEG	Immediatly early gen
iGluR	Ionotroper Glutamatrezeptor
IL	Infralimbischer Cortex
IP	Intraperitoneal
IR	Immunreaktivität
ITR	Inverted terminal Repeats
K	Kalium
KB	Kilobasenpaare
KG	Körpergewicht
LO	Lateraler orbitaler Cortex
LTP	Langzeitpotentiation
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
MGV	Mean Grey Value
MO	Medialer orbitaler Cortex
mPFC	Medialer präfrontaler Cortex
mRNA	Messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NAc	Nukleus accumbens
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD	Postdependent
PET	Positronen – Emissions – Tomographie
PFC	Präfrontaler Cortex
PrC	Präzentraler Cortex
PrL	Prälimbischer Cortex
PVT	Paraventriculäre Thalamus
Rep	Replikation
RISC	RNA induzierten Silencing-Komplex
RNA	Ribonucleic acid
ROI	Region of interest
SEM	Standard error of the mean
shRNA	Short hairpin RNA
siRNA	Small interfering RNA
β-Gal	β-Galactosidase

VP	Ventrales Pallidum
VTA	Ventrales tegmentales Areal
X-Gal	Substrat der β -Galactosidase, setzt Indoxyl frei
ZNS	Zentralnervensystem

1 EINLEITUNG

Der Konsum von Drogen und der übermäßige Konsum von Alkohol sind keine neuen gesellschaftlichen Phänomene (Dudley, 2000). Allerdings zeigt sich seit 1990 ein Anstieg um 44,2% auf weltweit über 100 Millionen Fälle von Alkoholmissbrauch und führt dementsprechend zu einem nie dagewesenen Einfluss des Alkohols auf unser Gesundheitswesen und unsere Volkswirtschaft (Degenhardt et al., 2018). Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind in den entwickelten Ländern 5,9 % aller Todesfälle auf Alkoholmissbrauch zurückzuführen (Peacock et al., 2018). In einer Untersuchung der Bundesregierung von 2019 (Drogen- und Suchtbericht der Bundesregierung) konsumierten 21,4% der Bevölkerung potentiell schädliche Mengen an Alkohol (>12 g Ethanol pro Tag für Frauen und >24 g Ethanol pro Tag für Männer) (Bundesregierung, 2019). Auch nach den Angaben der Deutschen Hauptstelle für Sucht konsumieren 1,4 Mio. Menschen in Deutschland Alkohol missbräuchlich. 1,6 Mio. sind nach DSM-V Kriterien alkoholabhängig (Atzendorf, Rauschert, Seitz, Lochbuhler, & Kraus, 2019).

Die physische und psychische Abhängigkeit von Alkohol ist gekennzeichnet durch die charakteristische Unfähigkeit, die Einnahme selbst einschätzen zu können. Weitere Charakteristika sind die Beeinträchtigung der Verhaltenskontrolle, das zunehmen des Verlangens nach Alkohol, die verminderte Fähigkeit zum Erkennen signifikanter Probleme des eigenen Verhaltens sowie der Vernachlässigung zwischenmenschlicher Beziehungen. Des Weiteren zeigen sich gestörte emotionale Reaktionen und Entzugssymptomatik. Alkoholabhängigkeit ist selbst nach vielen Jahren erfolgreicher Abstinenz durch Rückfälle gekennzeichnet (Kalivas & O'Brien, 2008). Diese Symptome werden auch im Diagnostischen und Statistischen Handbuch für psychische Störungen 5. (DSM-V) (Grant et al., 2015) als charakteristisch für eine Substanzgebrauchsstörung bezeichnet.

Es werden elf klinische Diagnosekriterien für Störungen des Alkoholkonsums aufgelistet. Das Vorhandensein von mindestens zwei dieser Symptome weist auf eine Substanzgebrauchsstörung hin. Treffen mehr als vier der elf Diagnosekriterien zu, spricht man von einer schweren Substanzgebrauchsstörung (DSM-V). Abhängigkeit wird als eine chronische und wiederkehrende Krankheit betrachtet. Wie andere

chronische Krankheiten, beinhaltet sie Zyklen von Rückfällen und Remissionen (Sommer, 2013; Spanagel, 2009). Ohne Behandlung oder intensivierete Entzugsbemühungen kann die Abhängigkeit fortschreitend verlaufen und zu einer Behinderung oder vorzeitigem Tod führen.

Neben den weitreichenden Folgen des chronischen Konsums, hat auch die akute Alkoholintoxikation starke Symptome, die folglich bis zum Tod führen können. Diese Wirkung hängt vom aktuellen Blutalkohol ab und reicht von stimulierend (0,5 - 1,5 Promille) bis hin zu starker Sedierung mit Vigilanzminderung (> 2,5 Promille) (Hendler, 2013; Vonghia et al., 2008). Neben der direkten Wirkung auf den Körper, führt die akute Alkoholintoxikation auch zu einem deutlich erhöhten Risiko in Hinblick auf Verletzungen und Traumafolgen (Schneiders et al., 2017).

Die körperlichen Folgen sind vielfältig: Alkohol schadet fast jedem Organsystem des Körpers inklusive des Immunsystems. Die gravierendsten Folgen sind Schäden der Leber, des Pankreas und des Gehirns. Durch Alkohol induzierte Hirnschäden sind besonders in der Schwangerschaft ein Problem, denn dort können sie zum fetalen Alkoholsyndrom führen. Dies ist mit 7/100.000 betroffenen Kleinkindern die häufigste Form der erworbenen geistigen Behinderung (Spanagel, 2009; Spanagel, Zink, & Sommer, 2016).

Der chronische Alkoholkonsum hat nicht nur weitreichende Folgen für die Betroffenen, sondern auch für deren Umfeld. Dazu zählt der Verlust der Sozialverträglichkeit, erhöhte Kriminalität und die steigenden Kosten für das Gesundheitswesen im Allgemeinen (Spanagel, 2009).

Die folgende Arbeit nähert sich durch zwei unterschiedliche Ansätze dieser Problematik an. Zuerst wird durch die Analyse glutamatabhängiger Stimulation in belohnungsrelevanten Regionen des Gehirns versucht, weitere Kenntnisse über die Entstehung und Aufrechterhaltung von abhängigem Verhalten zu erlangen. Der zweite Versuch beschäftigt sich vor allem mit der Problematik, die typisch ist für eine Abhängigkeit, dem Rückfall. Dabei wird versucht die Wirksamkeit eines Virus nachzuweisen, der es im lebenden Tiermodell möglich macht, die neuronalen Veränderungen einer Abhängigkeit besser abzubilden.

1.1 Abhängigkeit und das neuronale Belohnungssystem

Aufgrund dieser weltweit zunehmenden Bedeutung, widmen sich immer mehr Forscher diesem Thema und versuchen, die Mechanismen und Schäden des Alkoholmissbrauchs besser zu verstehen (Erdozain & Callado, 2014). Diese Anstrengungen haben schon zu ersten Erfolgen geführt. So ist es mittlerweile in der Suchttherapie, neben psychologischer Behandlung, möglich, den Betroffenen durch die zugelassenen Medikamente Disulfiram, Naltrexone und Acamprosat auch pharmakologische Hilfe zukommen zu lassen (Johnson et al., 2011)

Trotz dieser Möglichkeiten werden 85 % der Betroffenen rückfällig (WHO 2014). Viele Faktoren wie zum Beispiel Stress, Alkohol assoziierte Reize aber auch die ständige Konfrontation mit Alkohol in unserer Gesellschaft, führen zu einem erhöhten Risiko für einen Rückfall (O'Brien, 2005). Diese über Jahre hinweg bestehende Anfälligkeit für einen Rückfall hängt mit den Langzeitänderungen der cerebralen Strukturen und deren Funktion zusammen (Di Chiara, 1999). Seitdem die Anfälligkeit für einen Rückfall mit dem präfrontalen Cortex und einem Ungleichgewicht im Glutamathaushalt in Verbindung gebracht wurde, konzentriert sich die Forschung immer stärker auf dieses Gebiet (Heilig, Augier, Pfarr, & Sommer, 2019; Spanagel, 2010).

Das neuronale Belohnungssystem spielt eine zentrale Rolle in der Motivation, des Handelns und der Entstehung von Sucht und ihrer Aufrechterhaltung (Cooper, Robison, & Mazei-Robison, 2017). Bahnbrechend waren die Erkenntnisse von Olds und Milner (Olds & Milner, 1954). Sie untersuchten Ratten, welche sich abhängig von der Hirnregion in einer Skinner-Box über eine Elektrode bis zur Erschöpfung selbst stimulieren konnten. Da sie das immer wieder taten schlossen sie daraus, dass es belohnende neuronale Pfade innerhalb des Gehirns geben müsse.

1.1.1 Das neuronale Belohnungssystem

Einen Teil dieses komplexen Belohnungssystems stellt das mesolimbische dopaminerge System dar. Dieses bildet sich aus dem ventralen tegmentalen Areal (VTA) im Mesencephalon sowie den dopaminergen Verbindungsneuronen in den Nucleus accumbens (NAc). Außerdem stellen der mediale präfrontale Cortex (mPFC), die Amygdala (Amy) und der Hippocampus (Hipp) wichtige Bestandteile des

mesolimbischen Systems dar (Spanagel & Weiss, 1999). Soziale Interaktionen, Sexualverhalten und vor allem Nahrung aktivieren diesen Kreislauf, welcher es dem Organismus ermöglicht, Freude zu empfinden. Dies führt zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der freiwilligen Wiederholung und somit zum Erlernen einer bestimmten Verhaltensreaktion durch positive Verstärkung. Eine zentrale Rolle wird dabei vor allem der Verbindung zwischen dem mPFC und dem ventralen Striatum des NAc bei der Initiierung und Aufrechterhaltung adaptiver Verhaltensweisen zugeschrieben (Graybiel, 2008). Diese Projektion wird wiederum durch mesokortikolimbische dopaminerge Projektionen aus dem ventralen tegmentalen Areal reguliert, was das Erlernen der entsprechenden Verhaltensweise erleichtert (Redgrave & Gurney, 2006). Projektionen aus anderen Hirnarealen wie dem Hippocampus und der basolateralen Amygdala werden als notwendig erachtet, um zuvor gelernte, relevante und emotionale Informationen in Zusammenhang mit der Erfahrung zu bringen.

Auf dieses mesolimbische System wirken auch Alkohol und weitere psychoaktive Substanzen. Unter Alkoholeinfluss konnte eine erhöhte Aktivität von VTA-Neuronen (Gessa, 1985) und eine gesteigerte Dopaminfreisetzung in den NAc nachgewiesen werden (Di Chiara & Imperato, 1988). Es wird angenommen, dass dies durch eine reduzierte Hemmung von γ -Aminobuttersäure (GABA) ausschüttenden Neuronen und einer reduzierten Hemmung von mesolimbischen dopaminergen Neuronen vermittelt wird (Spanagel & Weiss, 1999). Psychoaktive Substanzen führen folglich zu einer stärkeren Aktivierung dieses Kreislaufs, was zu einer Dysregulation der Neurotransmitter und damit zu einem wiederholten und unkontrollierten Substanzkonsum führt (Everitt & Robbins, 2005). Eine Abnahme der Funktion des neuronalen Belohnungssystems, eine Aktivierung von Stressmechanismen und ein überfunktionelles glutamaterges System bereiten die neuronalen Grundlagen für den Übergang von chronischem Alkoholkonsum zu zwanghaftem Alkoholkonsum. (Vengeliene, Bilbao, Molander, & Spanagel, 2008)

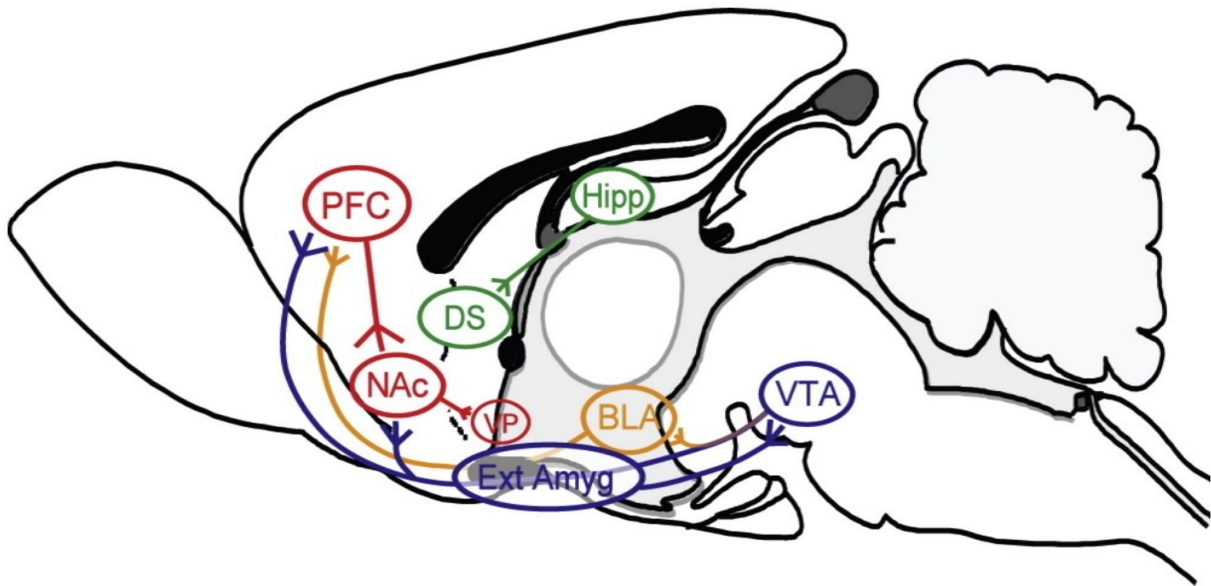


Abbildung 1 Sagitaler Schnitt durch das Nagetier Hirn mit an Belohnung und Rückfall beteiligten Neuronalen Strukturen. BLA, baso lateral amygdala, DS dorsal striatum, Ext Amyg extended amygdala; Hipp hippocampus; NAc nucleus accumbens, PFC prefrontal cortex, VP ventral pallidum, VTA ventral tegmental area (Moussawi & Kalivas, 2010) Copyright siehe Anhang

1.1.2 Glutamat als Neurotransmitter

Nicht nur das dopaminerge und GABAerge Neurotransmittersystem werden von Alkohol stark beeinflusst. Auch auf das auf Glutamat basierende Neurotransmittersystem hat der Alkohol einen starken Einfluss (Kalivas, 2009). Glutamat spielt sowohl der Entwicklung als auch der Aufrechterhaltung von Suchtverhalten eine entscheidende Rolle. Beispiele dafür wären Sensibilisierung und Substanzsuche. Die Entwicklung von abhängigem Verhalten erfordert eine Glutamatrezeptor-Stimulation in der VTA und ist verbunden mit erhöhter Glutamat-Freisetzung in dopaminergen Zellen (Kalivas, Lalumiere, Knackstedt, & Shen, 2009).

Glutamat ist der primäre exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn und vermittelt ungefähr 70% der synaptischen Übertragung. Dies beinhaltet die Kontrolle der basalen neuronalen Aktivität sowie die schnelle und langsame exzitatorische Neurotransmission (Olive, 2009). Die synaptische Plastizität, die erforderlich ist, damit Organismen ihr Verhalten an eine sich verändernde Umwelt anpassen können, wird ebenfalls von Glutamat vermittelt. Dies beruht vor allem auf der Beteiligung an kognitiven Funktionen wie dem Lernen und dem Gedächtnis (McEntee & Crook, 1993). Nervenimpulse an der Synapse lösen die Freisetzung von Glutamat in den synaptischen Spalt aus, welches dort eine Konzentration im mittleren mikromolaren

Bereich erreichen kann. Glutamat wird in Vesikeln im präsynaptischen Teil der Synapse gelagert und durch Verschmelzung mit der synaptischen Membran ausgeschüttet. Postsynaptisch bindet sich Glutamat an verschiedenen Rezeptoren, welche sich in zwei Klassen unterteilen lassen. Einerseits sind es ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluR), die Ionenkanalporen in der postsynaptischen Membran bilden, wenn Glutamat bindet. Andererseits metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR), die über G-Proteine eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen. GTP-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) bestehen aus sieben transmembranen Domänen, welche bei extrazellulärer Ligandenbindung intrazelluläre GTP-abhängige Signalkaskaden aktivieren. Diese Signaltransduktion ist langsamer als bei iGluRs. Sie birgt jedoch mehr Möglichkeiten modulatorisch einzuwirken.

Es werden drei Rezeptortypklassen aufgrund von pharmakologischen und signaltransduktorischen Eigenschaften unterschieden. MGluRs der Gruppe I (mGluR-1 und mGluR-5) sind vorwiegend postsynaptisch lokalisiert und aktivieren die Gq-Klasse der G-Proteine. Gruppe II (mGluR-2, mGluR-3) und Gruppe III (mGluR-4, mGluR-6, mGluR-7, mGluR-8) sind vorwiegend präsynaptisch lokalisiert und an Gi-Proteine gekoppelt (Olive, 2009). Die Aktivierung von Gi-Proteinen führt zu einer Inhibition der Adenylatcyclase, was wiederum zu einer Reduktion der intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat- (cAMP) Konzentration führt. Die Gi-Protein Kopplung von mGluR-2 kontrolliert die Glutamat Freisetzung durch verschiedene Mechanismen, darunter die Aktivierung präsynaptischer K⁺-Kanäle, die Hemmung präsynaptischer Ca²⁺-Kanäle oder die direkte Interferenz mit der vesikulären Freisetzung. mGluR-2 und mGluR-3 werden als klassische inhibitorische Autorezeptoren betrachtet, die in der Lage sind, eine übermäßige Freisetzung von Glutamat aus der präsynaptischen Membran zu unterdrücken (Schoepp, 2001).

1.1.3 Die Rolle des mGlu-2 Rezeptors in der Abhängigkeit

Metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe II bestehen aus den Subtypen mGluR-2 und mGluR-3. Metabotrope Glutamatrezeptoren des Subtyps 2 werden hauptsächlich auf präsynaptischen Glutamatneuronen exprimiert. Wenn sie aktiviert werden, geben sie eine negative Rückkopplung ab, um die Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter zu verringern. Metabotrope Glutamatrezeptoren vom Subtyp 3

werden sowohl auf postsynaptischen und präsynaptischen Neuronen als auch auf Gliazellen exprimiert. Ihre funktionelle Rolle ist weitgehend unbekannt (Schoepp, 2001)

Meinhardt et al. 2013 konnten nicht nur die Rolle von Glutamat im cortico-accumbens Signalweg darstellen, sondern auch die Rolle des Glutamat Rezeptors Typ 2 hervorheben. Dieser zeigte als Reaktion auf chronischen Alkoholkonsum eine reduzierte Expression in pyramidalen Neuronen des infralimbischen Cortex. Diese verminderte Expression konnten Meinhardt et al 2013 an Ratten nachweisen, welche in speziellen Kammern über sieben Wochen vernebelten Alkohol bekamen. Diese Ratten zeigten nach der Exposition ein Verhalten, bei dem sie deutlich mehr Alkohol zu sich nehmen wollten als üblich. Dieses Verhalten konnte in einem Versuch durch die Injektion eines Virus reduziert werden, der zu einer vermehrten Expression des mGlu-2 Rezeptors führte. Die Ratten hatten durch die Virusinjektion die Kontrolle über ihr alkoholabhängiges Verhalten zurückerlangt (Meinhardt et al., 2013). Daraus lässt sich schließen, dass der mGlu-2-Rezeptor eine wichtige Rolle für die Anfälligkeit zum Rückfall spielt und somit nach chronischem Alkoholkonsum weniger exprimiert wird.

Die weitverbreitete Expression des mGluR-2 und seine autoregulatorische Rolle lassen den mGluR-2 mit einer ganzen Reihe psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen wie Alzheimer, Demenz, Parkinson, Depression, Angststörungen und Epilepsie in Verbindung bringen (Niswender & Conn, 2010). Es ist bekannt, dass insbesondere die mGluR-2/3-Funktion nach wiederholter Exposition gegenüber psychotropen Substanzen verändert ist. Tierstudien konnten zeigen, dass mGlu-2/3-Rezeptoren sowohl die Verarbeitung von Belohnungsreizen als auch die Substanzsuche regulieren. Dies konnte an mGluR-2 Knockoutmäusen gezeigt werden, welche stärker auf Kokain induzierte Veränderungen reagierten als die Kontrollgruppe (Morishima et al., 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass serotonerge Halluzinogene einen modulierenden Einfluss auf den Glutamat-Haushalt über die mGluR-2 nehmen (Marek & Schoepp, 2021). Diese Verbindung des Serotonin- und des Glutamat-Systems stellt einen breiten molekularen Angriffspunkt für therapeutische Interventionen z.B. mit Psilocybin dar (Meinhardt et al, 2021)

Dies geschieht über die Veränderungen im durch den mGluR-2 regulierten Glutamat-Haushalt. Der negative Feedbackmechanismus an der präsynaptischen Membran hat einen großen Einfluss auf die Glutamat-Ausschüttung und somit auf die neuronale Plastizität. Diese Plastizität ist vor allem von zwei Faktoren abhängig: Einerseits von der Langzeitpotenzierung von Aktionspotentialen, welche durch eine höhere Rate an Aktionspotentialen an der postsynaptischen Membran hervorgerufen werden. Andererseits von einer Langzeitdepression, welche durch eine reduzierte Rate von Aktionspotentialen an der postsynaptischen Membran verursacht wird. MGLu-2-Rezeptoren haben vorrangig Einfluss auf die Langzeitpotenzierung. Durch chronischen Alkoholeinfluss wird die Expression des mGlu-2-Rezeptors herunterreguliert, was zu einem Wegfallen der Hemmung und zu einer verstärkten Glutamat-Ausschüttung in den synaptischen Spalt führt. Die daraus resultierende höhere Frequenz von Aktionspotentialen an der postsynaptischen Membran führt wiederum zu einer Induktion der Langzeitpotenzierung. Dies trägt wahrscheinlich zum generellen Zustand der Hyperreagibilität im zentralen Nervensystem bei (Bliss & Collingridge, 1993).

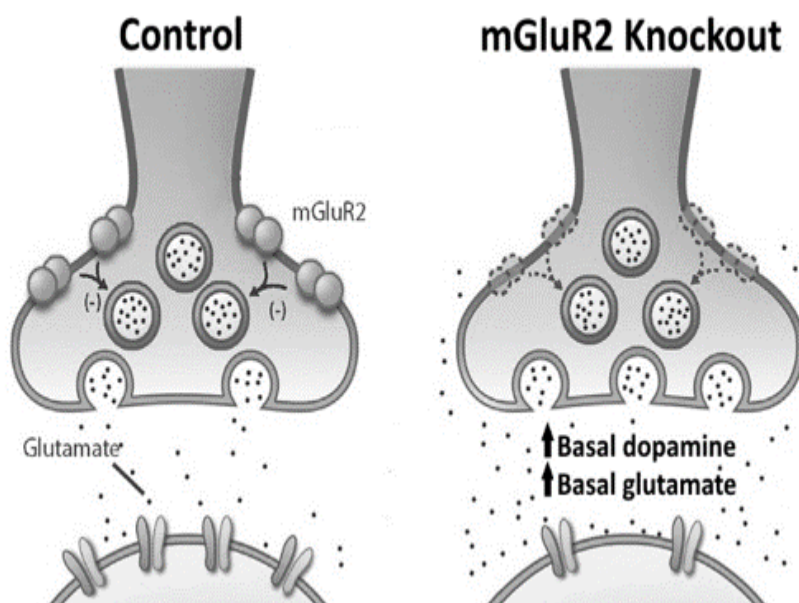


Abb. 2
 Die Glutamat- und Dopamin-Grundwerte sind bei mGluR2-Knockout-Ratten (rechts) im Vergleich zu Kontrollen mit mGluR2s (links) erhöht (Yang et al., 2017)
 Copyright im Anhang

Die autoregulatorische Funktion im Glutamat-Haushalt führt dazu, dass der Rezeptor eine wichtige Rolle in der Steuerung von Emotionen und daraus resultierendem Verhalten spielt und eine mögliche Zielstruktur für pharmazeutische

Behandlungsmöglichkeiten darstellt. Hinzu kommt, dass es in funktionalen Magnetresonanztomographie- (MRT) Aufnahmen an alkoholabhängigen Menschen gelungen ist, eine deutliche Veränderung für die Region des präfrontalen Cortex nachzuweisen (Wilson, Sayette, & Fiez, 2004).

1.1.4 Der mediale präfrontale Cortex und die Verhaltenskontrolle

Der mediale präfrontale Cortex (mPFC) ist eine zentrale Region, in der zahlreiche kortikale und subkortikale Informationen zusammengeführt werden. Dadurch spielt er bei vielen kognitiven Prozessen wie der Regulation von sozialem Verhalten, von Emotionen und von Motivation im Allgemeinen eine zentrale Rolle. Dysfunktionen in dieser zentralen Region werden mit der Entstehung zahlreicher neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen in Verbindung gebracht wie z.B. Alzheimer, Demenz, Parkinson, Schizophrenie Depression, Angststörungen und der Entstehung von Sucht (Xu, Chen, Li, Xing, & Lu, 2019).

Im Gegensatz zum Menschen lässt sich bei Ratten der mediale präfrontale Cortex nur schwer abgrenzen. Deswegen ergab sich eine Forschungsdebatte über die Vergleichbarkeit zwischen Mensch und Ratte (Uylings, Groenewegen, & Kolb, 2003). Aufgrund der großen Variation der Verknüpfungen zu anderen Arealen, der Zytoarchitektur sowie des Aufbaus wurde 1948 von Rose und Woolsey der präfrontale Cortex bei Ratten anhand einer einzigen Eigenschaft definiert: Es ist die Verbindung zum mediodorsalen Thalamus (Rose & Woolsey, 1948).

Entlang der dorsal-ventralen Achse kann der mediale präfrontale Cortex der Ratte in den anterioren cingulären Cortex (ACC), den prälimbischen Cortex (PrL) und den infralimbischen Cortex (IL) unterteilt werden. Es wird angenommen, dass der IL der Ratte analog zum Brodmann Areal 25 und der PrL zum Brodmann-Areal 32 bei Primaten und Menschen ist. Der dorsale Teil des mPFC, bestehend aus dem dorsalen ACC und dem dorsalen PrL, ist besonders an der zeitlichen Verschiebung von Verhaltensstrategien beteiligt. Der ventrale Teil des mPFC, der aus dem ventralen PrL und dem IL besteht, ist an der Verhaltensflexibilität und der Verarbeitung von räumlichen Schlüsselreizen beteiligt. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass der PrL

eine wichtige Rolle für freiwillige zielgerichtete Verhaltensweisen spielt, während der IL an der Gewohnheitsbildung beteiligt ist (Laubach et al., 2018)

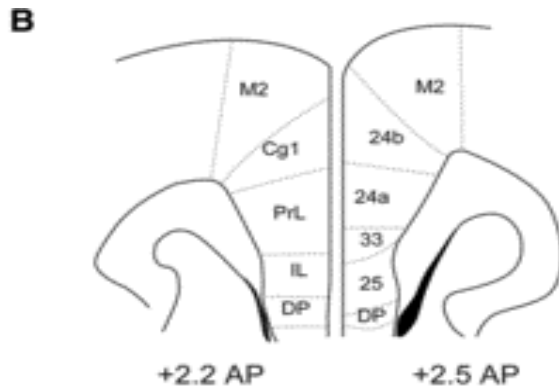


Abb. 3

Anatomische Bezeichnungen für PFC-Bereiche bei Nagetieren. Anteriores cinguläres (Cg1), PrL und infralimbisches (IL) wurden in der 4. Auflage des Atlas von Paxinos und Watson verwendet. In der 7. Auflage wurden die Bereiche 24 (a und b), 33 und 25 verwendet. (Laubach, Amarante, Swanson, & White, 2018)
Copyright siehe Anhang

Es konnte gezeigt werden, dass der mPFC sowohl bei Ratten als auch bei Menschen in die Belohnungssuche und die inhibitorische Verhaltenskontrolle eingebunden ist. Beides sind zentrale Verhaltensmuster in der Entstehung von Sucht (Perry et al., 2011).

Mehrere experimentelle Studien konnten dem IL-Cortex eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung Abhängigkeitsverhalten nachweisen. Es konnte zum einen gezeigt werden, dass glutamaterge Projektionsneurone sehr sensibel auf Alkoholeinfluss reagieren. Dies führte unter chronischer Alkoholexposition der Ratten zu einem Verlust der Kontrolle über das Alkoholverlangen, was mit einer signifikant verminderten Expression des mGluR-2 verbunden war (Meinhardt et al., 2013). Zum anderen konnte man nachweisen, dass vor allem spezielle Neuronenpopulationen im IL für die hemmende Kontrolle über das Verhalten verantwortlich sind (Pfarr et al., 2015).

1.2 Tiermodelle in der Suchtforschung

Es wird immer wieder kontrovers diskutiert, in welchem Umfang die Forschungsergebnisse zwischen Menschen und Labortieren vergleichbar sind. Vor allem geschieht dies auf dem Gebiet der Psychologie und Psychiatrie, welche komplexe Mechanismen im Gehirn behandeln. In der Abhängigkeitsforschung gibt es jedoch große Schnittmengen und Ähnlichkeiten im Verhalten von Menschen und Labortieren wie z.B. Affen, Ratten und Mäusen. So nehmen gerade Erwähnte großenteils freiwillig die abhängig machenden Substanzen ein. Dies kann bei Heroin oder Kokain so weit führen, dass sowohl Mensch als auch Labortier sich mit einer Überdosis selbst töten. Auch beim Alkoholkonsum neigen sowohl Menschen als auch Ratten zu einer freiwilligen Überdosierung bis hin zu einer starken Alkoholvergiftung (Spanagel, 2017). In der präklinischen Forschung sind Tiermodelle, welche auf selbstverabreichenden Mechanismen beruhen, weit verbreitet und gut validiert. Es wird angenommen, dass die neuroanatomischen Strukturen und auch die neurochemischen Substrate, die an der Entstehung und Aufrechterhaltung von abhängigem Verhalten beteiligt sind, sowohl beim Menschen als auch bei Labortieren weitestgehend ähnlich sind (Sanchis-Segura & Spanagel, 2006).

1.2.1 cFos als Proxymarker für neuronale Aktivität

Um komplexe Verhaltensmuster sowie daran beteiligte Neuronenpopulationen besser zu erforschen, bedarf es einer Möglichkeit gezielt Neuronenpopulationen zu identifizieren und kenntlich zu machen, woran sie beteiligt sind. Man geht davon aus, dass bestimmte Verhaltensmuster durch bestimmte Neuronensembles gesteuert werden (Wandres et al., 2021). Erst die Identifikation der beteiligten neuronalen Strukturen und ihrer Neurotransmitter ermöglicht die zielgenaue Manipulation. Diese Manipulation kann auf vielfältige Art und Weise erfolgen. Hierbei spielt die Suche nach neuen Zielstrukturen für eine pharmakologische Manipulation eine bedeutende Rolle (Heilig et al., 2019).

Zur Identifikation der beteiligten Strukturen benötigt es Proxymarker. Hierzu wird in dieser Arbeit und generell im Gebiet der Neurowissenschaften cFos verwendet. cFos ist das in der Verhaltensneurobiologie am häufigsten verwendete sogenannte immediatly early gen (IEG). Ein Gen, welches sich hervorragend zur Kartierung

neuronaler Aktivität und dem Detektieren neuronaler Ensembles eignet (Cruz, Javier Rubio, & Hope, 2015).

Das Proto-Onkogen cFos wird schnell transkribiert und in neuronalen Zellen nach Exposition gegenüber einem neuen Stimulus wie beispielsweise einer neuen Umgebung, einem neuen Stressor oder einem psychoaktiven Medikament, translatiert. Des Weiteren wird die cFos-Konzentration mit neuronaler Plastizität, dem Lernen und dem Gedächtnis assoziiert (Morgan & Curran, 1991). Dadurch kann die cFos-Immunreaktivität (cFos IR) als Proxy der neuronalen Aktivierung verwendet werden. Das cFos IR ermöglicht aus 2 Gründen eine gründliche Charakterisierung der neuroanatomischen Verteilung. Vor allem auf die Auswirkungen einer akuten Exposition gegenüber psychoaktiven Substanzen (in diesem Fall eines Glutamatagonisten). Zum einen kann das cFos IR auf diskrete Hirnregionen lokalisiert werden und zum anderen können unterscheidbare Struktur innerhalb des Gehirns für jedes Versuchstier untersucht werden.

Die beschriebenen neurochemischen und molekularbiologischen Mechanismen unterstützen alle die Idee, dass die Aktivierung des cFos-Promotors ein Indikator für einen starken und anhaltenden Kalziumeinstrom in Synapsen ist. Dies gilt vor allem für die Synapsen mit dem stärksten Reiz durch Glutamat. Drogeninduziertes Dopamin kann die Aktivierung des cFos-Promotors in diesen stark aktivierten Neuronen synergistisch verstärken. Eine fehlende Fos-Expression in einem Neuron bedeutet nicht einen vollständigen Mangel an neuronaler Aktivität. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration erreicht nur nicht das Level, um den Signalweg zu aktivieren (Cruz et al., 2015).

Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene psychoaktive Substanzen, wie z.B. Amphetamine oder Kokain, unterschiedliche Reaktionsmuster der Transkription von cFos in bestimmten Regionen des Striatums auslösen. Es konnte auch in diesen Arbeiten gezeigt werden, dass cFos einen relevanten Einfluss auf das Verhalten der Ratten haben kann (Graybiel, Moratalla, & Robertson, 1990; W. Sommer, Bjelke, Ganten, & Fuxe, 1993; W. Sommer & Fuxe, 1997). Der Nachweis von cFos gelingt post mortem durch Antikörper gegen das cFos-Protein.

1.2.2 Transgene Ratten cFos-lacZ Tiermodelle

Diese technischen Möglichkeiten und das stetig wachsende Wissen über Gene, wie z.B. das oben beschriebene IEG cFos, führten zur Entwicklung mehrerer cFos-basierter Tiermodelle und molekularer Methoden. Das am weitesten verbreitete cFos-basierte Rattenmodell ist die transgene Ratte cFos-lacZ, die von Dr. J. Morgan und T. Curran (St. Jude Children's Hospital, Memphis, TN) erstellt wurde und das bakterielle lacZ-Gen unter Kontrolle des cFos-Promotors exprimiert (Kasof et al., 1995). Diese Herangehensweise ebnete den Weg für eine weit verbreitete Methode zur Inaktivierung selektiv nur cFos exprimierender Hirnareale. Sie wird als Daun02 bezeichnet und hat einen großen Stellenwert in der Suchtforschung, da es mit ihr möglich ist, Neuronenpopulationen, die bei bestimmten Verhaltensmustern aktiv sind, zu identifizieren und zu inaktivieren.

In unserem Labor ist es gelungen, Neuronenpopulationen zu identifizieren, welche am alkoholabhängigen Verhalten von Ratten entscheidend beteiligt sind (Pfarr et al., 2015). Hierzu wurden in einem ersten Schritt durch die im vorherigen Kapitel beschriebene cFos-Methode Neuronensembles identifiziert, die in Ratten bei Präsentation eines Schlüsselreizes zu alkoholabhängigem Verhalten führen. Anschließend wurden diese aktivierten Neuronensembles durch Apoptose ausgeschaltet.

Dies wird durch die Tatsache ermöglicht, dass Fos-exprimierende Neuronen in diesen Ratten auch das bakterielle Protein β -Galactosidase (β -gal) in stark aktivierten Neuronen exprimieren. Wenn das Pro-Pharmakon Daun02 90 Minuten nach einem Verhalten (z.B. Drogensuche) in die Gehirne dieser Ratten injiziert wird, dann wird Daun02 durch β -gal in Daunorubicin umgewandelt, welches selektiv Fos- und β -gal-exprimierende Neuronen inaktiviert (Koya, Margetts-Smith, & Hope, 2016).

Es wurde eine weitere Methode in unserem Labor etabliert, um für eine Kontrollgruppe alle Neuronen einer bestimmten Region durch Daun02 zu inaktivieren. Hierzu wurden transgene pCAG-lacZ Rattenlinien benutzt. Diese exprimieren das bakterielle Protein β -Galactosidase ubiquitär. Nach einer Injektion von Daun02 in eine bestimmte Hirnregion kommt es zum generellen Untergang aller Neuronen durch Apoptose in diese Region.

Die Versuche zeigten, dass es zu einem signifikanten Anstieg von alkoholabhängigem Verhalten kommt, wenn bestimmte Neuronenpopulationen im IL durch die Daun02 Methode ausgeschaltet werden. Die Etablierung der pCAG-lacZ Rattenlinie war wichtig für den Nachweis, dass es sich dabei um ganz bestimmte Neuronenpopulationen handelt und nicht um den Einfluss einer gesamten Region. Das Ausschalten des gesamten IL zeigte keinen signifikanten Anstieg des Abhängigkeitsverhalten, welches durch das Drücken eines Hebels in der Erwartung einer alkoholhaltigen Lösung dargestellt werden sollte. Es zeigte sich, dass ca. 10% der Neuronen des IL an dem gesteigerten Abhängigkeitsverhalten beteiligt sind. Davon nutzten ca. 70% der Synapsen Glutamat als Neurotransmitter. Dies hebt nochmals den hohen Stellenwert des Neurotransmitters an der Entstehung und Aufrechterhaltung abhängigen Verhaltens in Bezug auf Alkohol hervor (Pfarr et al., 2015).

Hier muss man einwenden, dass die Ergebnisse nur in Bezug auf Alkohol gelten. Es wurden ähnliche Experimente mit anderen abhängig machenden Substanzen z.B. Kokain und Heroin durchgeführt (Guez-Barber et al., 2011; Willcocks & McNally, 2013). Diese Experimente zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied im Verhalten nach dem Ausschalten cFos-aktiver Neuronen im IL bzw. es kamen für die verschiedenen Substanzen jeweils unterschiedliche Ergebnisse heraus. Dies zeigt, dass die verschiedenen Substanzen trotz ihres ähnlichen Suchtpotenzials unterschiedliche Neuronenpopulationen im Erlernen abhängigen Verhaltens stimulieren und es somit dieser spezifischen Methoden bedarf, um ein tieferes Verständnis der Pathomechanismen zu erlangen.

1.2.3 Alkoholaufnahme und Entwicklung abhängigen Verhaltens

Prinzipiell lässt sich die Konditionierung aus verhaltenspsychologischer Perspektive in operante und nicht-operante Verfahren einteilen. Nicht operante Verfahren sind auf orale Selbstadministration beschränkt und werden meist mit zwei Flaschen im Käfig durchgeführt, wobei eine Flasche Wasser beinhaltet und die andere eine wässrige Alkohollösung. Hierbei gilt es zu beachten, dass verschiedene Einflussfaktoren wie die Alkoholkonzentration, der Geschmack der Lösung, der Zugang und die Anzahl der

Flaschen eine Rolle beim Konsumverhalten der Ratten spielen können (Spanagel, 2017). Hierbei wird in der Regel kein suchtähnliches Konsumverhalten in kurzer Zeit erzeugt, das gelingt nur bei Zugangszeiten von mehr als einem Jahr (Wolffgramm & Heyne, 1995).

Ein Verfahren zur Induktion abhängigen Verhaltens bei Ratten in kurzer Zeit ist die intermittierende Exposition von verdampftem Alkohol in speziellen Kammern. Dies ist über einen langen Zeitraum sehr kontrolliert möglich und führt zu langanhaltenden neuronalen und verhaltenstypischen Veränderungen bei den Labortieren. Der gleiche Effekt lässt sich auch nach längerer Abwesenheit von Alkohol nachweisen (Meinhardt & Sommer, 2015). Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, dass der Alkoholspiegel im Gehirn klinisch relevante Konzentrationen erreicht und leicht zu überwachen ist. Dies wird meist durch eine Exposition der Labortiere von 14-16h/Tag erreicht, wobei die Labortiere dem Ethanol Dampf für eine Dauer von Wochen bis Monate ausgesetzt sind. Diese Phasen der Exposition wechseln sich mit Phasen ohne Exposition gegenüber dem Ethanol Dampf ab (Rimondini, Arlinde, Sommer, & Heilig, 2002; W. H. Sommer et al., 2008). Die Tiere, die diesem Verfahren der chronisch intermittierenden Ethanolexposition (CIE) ausgesetzt werden und den Versuchsprozess durchlaufen haben, werden als „postdependent“ bezeichnet. Dies unterstreicht nochmals die Tatsache, dass bei diesem Verfahren Verhaltensweisen und Neuanspassungen hervorgerufen werden, die auch ohne fortlaufende Alkoholvergiftung bestehen bleiben. Darüber hinaus können sie auch nach langen Perioden der Abstinenz fortbestehen (Meinhardt & Sommer, 2015).

Operante Verfahren beruhen meist auf festen Verstärkerplänen nach einem bestimmten Schema. Hierbei unterscheidet man in feste und progressive Schemata. Bei festen Schemata bekommt das Labortier nach der vorher definierten Anzahl an Hebeldrücken eine kleine Menge der gewählten Substanz. Bei progressiven Schemata steigt die Anzahl der Hebeldrücke bis zu der gewünschten Verabreichung der Substanz an; meist nach einem exponentiellen Schema. Daraus lässt sich eine bedeutende Kenngröße der Abhängigkeit ableiten: der so genannte „breaking point“. Dieser definiert die Grenze, bei der das Labortier aufgibt den Hebel zu drücken, um die gewünschte Substanz zu erhalten. Dies ist ein Indikator für die Motivation. Denn je höher der „breaking point“, desto höher ist die Bereitschaft, eine bestimmte Arbeit zu

verrichten bzw. desto höher ist der Preis, um an die gewünschte Substanz zu kommen (Spanagel, 2017).

1.2.4 Modelle der Rückfall-Wahrscheinlichkeit und des Cravings

In der Therapie und der Abhängigkeitsforschung spielt die Rückfallwahrscheinlichkeit eine zentrale Rolle. Nicht nur als diagnostisches Kriterium im ICD10 und DSM5 sind der anhaltende Reiz und das weiterhin bestehende Verlangen selbst nach langer Zeit der Abstinenz ein eindeutiges Merkmal der Abhängigkeit (Grant et al., 2015). Um sie nachzuweisen, wird eine bestimmte Versuchsanordnung benutzt, durch welche die Faktoren für dieses Verhalten genauer untersucht werden können: das sogenannte „Reinstatement“ Modell. Hierbei erlernen Tiere sich selbst eine abhängig machende Substanz zu verabreichen. Dabei zeigen sie charakteristische Merkmale abhängigen Verhaltens. Dieses Verhalten wird dann so lange nicht ermöglicht, bis das Tier es wieder verlernt hat. Dies wird durch eine Nicht-Reaktion auf diverse substanz-assoziierte Stimuli getestet. Nun wird das Tier verschiedenen Faktoren ausgesetzt. Lösen diese Faktoren das alte substanzsuchende Verhalten wieder aus, zum Beispiel durch vermehrtes Drücken des Hebels, so gelten sie als Reiz, der den Rückfall wahrscheinlicher macht. Dazu zählen Stress, konditionierte Reize und das verabreichen kleiner Dosen der Substanz (Spanagel, 2017).

Die Wiederherstellung des Verhaltens bei der Substanzsuche kann zur Untersuchung der neurobiologischen sowie molekularen Grundlagen des Verlangens nach Drogen und der Reaktion auf Schlüsselreize verwendet werden. Es scheint eine gute Übereinstimmung zwischen den Ereignissen zu geben, die die Substanzsuche bei Versuchstieren auslösen, und denen, die das Verlangen nach abhängig machenden Substanzen und die Reaktion auf Schlüsselreize beim Menschen provozieren (Bossert, Marchant, Calu, & Shaham, 2013).

Craving bezeichnet das starke Verlangen nach einer bestimmten Substanz, in diesem Kontext Alkohol. Da es sich um ein komplexes Phänomen handelt, ist die genaue Definition schwierig. Verschiedene Forscher haben unterschiedliche Definitionen für Craving verwendet. Zum Beispiel wurde Craving von einigen als Verlangen und Drang beschrieben, während andere den Begriff Craving nur als das Verlangen definieren,

die Wirkungen einer Droge zu erfahren. Den Begriff „Drang“ beziehen sie auf die Verhaltensabsicht, diese Substanz zu konsumieren (Swift, 1999). Das Craving spielt im Verständnis der Entstehung von Abhängigkeit eine zentrale Rolle und wird deshalb intensiv beforscht.

Auf neurobiologischer Ebene wird die Dysregulation der Belohnungsverarbeitung im Gehirn, die durch Veränderungen von mesolimbischem Dopamin (DA), Glutamat, GABA und Stressschaltkreisen hervorgerufen wird, für den zwanghaften Substanzkonsum und den Kontrollverlust über die Drogeneinnahme verantwortlich gemacht. Dieses neuroadaptive Modell für Craving basiert auf der Theorie, dass eine Hypersensibilisierung gegenüber Substanzen (Alkohol, Schokolade, Kokain, Zigaretten) oder Verhaltensweisen (Essen, Sex, Spielen) mit Abhängigkeitspotenzial sowie substanzassoziierten Stimuli gewöhnliches "Wollen" in Craving umwandelt. Dies kann selbst nach längerer Abstinenz durch eine Reaktivierung des Belohnungsgedächtnis ausgelöst werden, wodurch Craving induziert wird (Robinson & Berridge, 1993). Hierbei spielt in der präklinischen Forschung das Inkubations-Modell eine wichtige Rolle, welches an kokainabhängigen Ratten nachweisen konnte, dass mit der Zeit das Verlangen trotz Abstinenz stetig zunimmt, also inkubiert wird. Dies konnte zuerst an Laborratten nachgewiesen werden und wurde daraufhin beim Menschen ebenfalls verifiziert (Bach et al., 2020; Grimm, Hope, Wise, & Shaham, 2001).

1.2.5 Manipulation der mRNA des mGluR-2 im IL des mPFC

Die vorher beschriebenen Möglichkeiten des Identifizierens von aktiven Neuronenpopulationen beim Erlernen und Aufrechterhalten von abhängigem Verhalten werfen die Frage der gezielten Manipulation an den identifizierten Strukturen auf. Dies spielt eine wichtige Rolle für die Reproduzierbarkeit der beobachteten Effekte. Hierzu wurden verschiedene Werkzeuge und experimentelle Ansätze entwickelt. Das in dieser Arbeit verwendete Werkzeug beruht auf der Manipulation der Genexpression in bestimmten Gehirnarealen per virus-induziertem RNA-Knockdown.

Aufgrund der Tatsache, dass Viren ihre Gene auf natürliche Weise in Wirtsgenome übertragen, werden sie häufig als molekulares Werkzeug zur Entwicklung von

Virusvektorsystemen für die Übertragung von Genen in Labortiere verwendet. Virale Vektoren, die häufig für Laborzwecke verwendet werden, sind DNA- oder RNA-basierte Viren, die viele verschiedene Eigenschaften sowie Vor- und Nachteile haben. DNA-basierte Viren, die für den Gentransfer verwendet werden, sind zum Beispiel Herpes-Simplex-Viren (HSV), Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren, während RNA-basierte Viren Retroviren und Lentiviren sind.

Gemeinsam haben all diese Virusarten, dass sie zu den Retroviren gehören. Diese zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, ihre RNA in die Wirts-DNA einzubauen. Die reverse Transkription von fragiler Einzelstrang-Viruspartikel-RNA in relativ stabile Doppelstrang-DNA kehrt den üblichen Fluss der genetischen Information um und führt zur Integration der Virus-RNA in das Wirtschromosomen (Kurth & Bannert, 2010).

Für vorliegende Versuchsanordnung wurde ein Adeno-assoziiertes Virus (AAV) als Vektor gewählt. Das Adeno-assoziierte Virus gehört zu den am gründlichsten untersuchten Viren in der Gentherapie. Vor allem der einfache Aufbau aus im Grunde nur einer Proteinhülle, welche das kleine Einzelstrang-DNA-Genom von ca. 4,8 Kilobasenpaaren (KB) schützt, macht es zu einem beliebten Werkzeug. Das AAV gehört zu der Familie der Parvoviren und ist zur Vermehrung auf eine Koinfektion mit anderen Viren, hauptsächlich Adenoviren, angewiesen. Das einzelsträngige Genom besteht aus drei Genen: Replikation (Rep), Kapsid (Cap) und Assemblierung (Aap). Dadurch entstehen mindestens neun Genprodukte. Inverted Terminal Repeats (ITRs) rahmen dieses kodierenden Sequenzen ein und regulieren die Replikation und die Verpackung des Genoms (Naso, Tomkowicz, Perry, & Strohl, 2017).

Doch es nicht nur der gut verstandene Aufbau, der den AAV zu einem weit verbreiteten Werkzeug macht. Dieser hat noch weitere zahlreiche erkenntnisbringenden Eigenschaften. Zu diesen positiven Eigenschaften zählen die Stabilität über lange Zeiträume, die einfache Klonierungsstrategie, die Vektorkapazität und die geringe Toxizität (Naso et al., 2017). Darüber hinaus wurden zahlreiche AAV-Serotypen identifiziert (Serotyp 1-9), die einen extrem breiten Zelltropismus und damit eine spezifischere Infektion aufweisen (Aschauer, Kreuz, & Rumpel, 2013).

Diese Fähigkeiten des AAV werden mit einer besonderen Art der RNA-Interferenz kombiniert. Dies ist die shRNA (short hairpin RNA), ein sehr stabiles Konstrukt, welches in der Molekularbiologie weithin zur Herunterregulierung von Zielgenen verwendet wird. Dieses RNAi-Werkzeug besteht aus kurzen RNAs, die durch Sequenzkomplementarität eine kurze Schleife bilden, wodurch eine haarnadelartige Struktur entsteht. Der Vorteil dieser RNAi besteht darin, dass sie in die Wirts-DNA integriert werden kann, um kontinuierlich in der Zelle exprimiert zu werden. ShRNA kann sowohl als Plasmid Vektor in Zellkulturen transfiziert, als auch durch virale Infektion in Zellen eingebracht werden. Des Weiteren ist es möglich, mit shRNA einen Langzeit-Knockdown der Zelllinie zu erzeugen. Darüber hinaus erlauben shRNAs als RNAi die Verwendung niedriger DNA-Dosen, wodurch die Entstehung hoher Konzentrationen zytoplasmatischer siRNA vermieden wird, die den Zieleffekt behindern können (Lambeth & Smith, 2013).

In der Alkoholsucht-Forschung haben sich Ratten als besonders beliebte Versuchstiere durchgesetzt. Sie scheinen den Menschen in Bezug auf Verhaltensweisen, die typisch für eine Abhängigkeit (z.B. ausgeprägte Alkoholentzugssymptomatik oder impulsives Trinkverhalten) sind, ähnlicher als Mäuse zu sein (Vengeliene, Bilbao, & Spanagel, 2014). Zeitgleich zur Entwicklung DSM-orientierter Tiermodelle in der Suchtforschung nahmen auch die Möglichkeiten der genetischen Veränderungen an Ratten stetig zu.

Durch transgene Tiere wird es möglich, verschiedene Aspekte der Genfunktion im lebenden Organismus zu untersuchen. Grundsätzlich bedarf es bei transgenen Tieren der Einführung fremder DNA in eine befruchtete Eizelle. Dazu gibt es die Möglichkeit, rekombinante DNA in den Vorkern zu injizieren. Eine weitere Methode stellt die Übertragung der Lentiviren in den perivitellinen Raum, welcher zwischen Zona pellucida und Zellmembran der zu befruchtenden Eizelle liegt (Reichardt & Fischer, 2016). Diese Kombination aus AAV und shRNA wurde verwendet um den mGlu-2-Rezeptor in den Synapsen der Versuchstiere herunter zu regulieren.

1.3 Zielsetzung

1. Versuchsanordnung

Das Zusammenspiel von Neuronenpopulationen in belohnungsrelevanten Hirnregionen ist entscheidend am Erlernen abhängigen Verhaltens beteiligt. Es ist von besonderer Bedeutung, welche Neuronen durch gesteigerte Aktivität daran beteiligt sind. Das immediate early Gene cFos ist ein Proxymarker für neuronale Aktivität. Dieser lässt sich post mortem in transgenen Ratten durch monoklonale Antikörper anfärben und kartographieren. Glutamat ist ein exzitatorischer Neurotransmitter, dessen Ausschüttung durch die autoregulatorischen Rezeptoren mGluR-2/3 reguliert wird. Durch die Expression in Regionen des ZNS, das die Belohnungsreize steuert, sind die Rezeptoren an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Sucht beteiligt. Diese Aktivitätsänderung nach mGluR-2/3 Agonisten Injektion wurde post mortem durch Färbung der mRNA mit Antikörpern quantitativ in belohnungsrelevanten Regionen des ZNS ausgewertet.

Hypothese 1: Systemische Administration des mGluR-2/3-Agonist LY379268 induziert die Expression des neuronalen Aktivitätsmarkers cFos im Belohnungssystem

Ziel 1: Evaluation der Anzahl cFos-positiver Zellen als Maß für neuronale Aktivierung in belohnungsrelevanten Hirnregionen nach Injektion des mGluR-2/3 Agonisten.

2. Versuchsanordnung

Bei alkoholabhängigen Menschen und Ratten kommt es zu einer langanhaltenden Reduktion der Expression des mGlu-2-Rezeptors. Es wird angenommen, dass dies zu einem Kontrollverlust über alkoholabhängiges Verhalten und zu reduzierter kognitiver Flexibilität führt. Hierbei handelt es sich um den Nachweis der Wirksamkeit eines neu synthetisierten Adeno-assoziierten Virus. Dieser wurde so konstruiert, dass mit Hilfe einer so genannten shRNA die Expression der mRNA für den mGlu-2-Rezeptor unterbunden werden kann. Das Virus wurde in einer stereotaktischen Operation sechs

Ratten injiziert, die anschließend dekapitiert wurden, um mit Hilfe von Fluoreszenz in situ Hybridisation den Nachweis einer verminderten Rezeptorexpression zu erbringen.

Hypothese 2: Die Expression des mGlu-2 Rezeptor im mPFC-NAC Signalweg spielt eine Rolle in der Kontrolle über alkoholabhängiges Verhalten.

Ziel 2: Nachweis der Wirksamkeit eines Werkzeuges, das einerseits spezifisch den mGlu-2 Rezeptor herunterreguliert und andererseits dies spezifisch nur in einer Region stattfinden lässt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 cFos-lacZ-Projekt

Das Kernelement dieses Versuches war es cFos-lacZ-transgenen Ratten einen selektiven mGlu-2/3-Rezeptoragonisten LY379268 zu injizieren. Die drei Gruppen aus Vehikel (NaCl), 2mg/kg KG und 5mg/kg KG (Battaglia et al., 2015) wurden 90 Minuten nach intraperitonealer Injektion perfundiert. Dies diente der Fixierung der Hirne, um sie anschließend am Vibratom schneiden zu können. Da es sich um ein Kartographie-Projekt handelt, wurde das komplette Gehirn geschnitten, gefärbt und anschließend unter dem Mikroskop ausgewertet. Hierbei wurden neuronal aktive Zellkerne, cFos-positive Nuclei pro Fläche gezählt.

2.1.1 Tiere

Für das vorliegende Projekt wurden 15 männliche transgene cFos-lacZ Spraque Dawley Ratten (Kasof et al., 1995) aus eigener Zucht am Zentralinstitut für Seelische Gesundheit ZI Mannheim genommen. Diese waren am 21./22./25.01. 2017 geboren und wurden 10 Monate in Käfigen gehalten. Dort waren sie jeweils zu viert pro Käfig untergebracht. Dabei haben sie unter einem umgekehrten Tag/Nacht Rhythmus gelebt mit Licht von 18 Uhr bis 6 Uhr und Dunkelheit von 6 Uhr bis 18 Uhr. Sowohl Wasser als auch Futter stand ihnen „ad libitum“ zur Verfügung und sie wogen am Ende jeweils zwischen 650g bis 850g (genauerer siehe Anhang). Die Bedingungen der Haltung waren übereinstimmend mit den ethischen Richtlinien für Haltung und Zucht von Labortieren und wurden überprüft sowie von der lokalen Aufsichtsbehörde, nämlich dem Regierungspräsidium Karlsruhe (Karlsruhe, Deutschland), anerkannt. Der Tierversuchsvorhabens-Antrag und die Genehmigung sind jeweils im Anhang zu finden.

2.1.2 Handling und Perfusion

Da bei diesem Versuch eine neuronale Aktivität nachgewiesen wurde, sollten die Ratten sich an das Prozedere einer intraperitonealen Injektion und an den ausführenden Studenten gewöhnen. Dazu bekamen die Ratten über 4 Tage täglich um 10 Uhr morgens 2 ml NaCl mit einer 2ml Spritze und einer Injektionsnadel (27 Gauge) injiziert. Dies fand vom 6. bis 9. November 2018 statt. Am Freitag, dem 10. November, wurden die Ratten in drei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe erhielt 1,5 ml NaCl, die zweite Gruppe den selektiven mGlu-2-Rezeptoragonisten LY379268 in einer Dosierung von 2ml/kg Körpergewicht und die dritte Gruppe erhielt den Glutamatagonisten in einer Dosierung von 5ml/kg Körpergewicht. Die Ratten bekamen nacheinander einzeln im 20 Minuten Rhythmus den Glutamatagonist gespritzt. 90 Minuten nach der Injektion des Glutamatagonisten (zu diesem Zeitpunkt soll die cFos-Expression ihren Gipfel erreichen) (Sheng & Greenberg, 1990) wurde jede Ratte einzeln mit Isofluran tief narkotisiert. Daraufhin wurde das Peritoneum geöffnet, um auf dem Weg Richtung Herz auch das Diaphragma zu durchtrennen. Nachdem das Herz dargestellt werden konnte, wurde eine Perfusionsnadel in den linken Ventrikel eingeführt sowie eine Schnittinzision in den rechten Ventrikel vollzogen. Anschließend flossen über eine Pumpe erst 100 ml einfach konzentrierte phosphatgepufferte Salzlösung PBS, anschließend 200 ml Fixierungsflüssigkeit, bestehend aus Phosphat Puffer, 4% Paraformaldehyd und 14% gesättigter Pikrinsäure, durch den Kreislauf der Ratte. Das Herz der Ratte war bei diesem Vorgehen noch am Schlagen. Die Ratten wurden daraufhin dekapitiert und das Hirn wurde entnommen. Nach 90 Minuten Lagerung bei Raumtemperatur in einer Fixierungsflüssigkeit kamen sie bis zum Schneiden in einen Kühlschrank mit 6°C.

2.1.3 Hirnschnitte

Die Hirne konnten dankenswerter Weise am CBTM Mannheim in einem Labor von Maren Engelhardt am Institut für Neuroanatomie geschnitten werden. Dies geschah an einem Vibratom HM650V der Marke Thermo Scientific. Bei einer Amplitude von 0,6 mit einer Frequenz von 90, konnten die 15 Hirne in free floating Technik (PBS) in 60 µm dünne coronare Scheiben geschnitten werden. Aufbewahrt in 12 Wellplatten gefüllt mit PBS wurden sie bei 4° C wieder in den Kühlschrank gelegt. Dabei konnten alles in allem um die 2800 Hirnschnitte gewonnen werden. Es wurde versucht, jede

zusammenhängende Scheibe von rostral nach okzipital aufzufangen. Dies führte zu ca. 180 Schnitten pro Hirn, wobei das Kleinhirn nicht mitgeschnitten wurde.

2.1.4 X-Gal Staining

Der Versuch, die Schnitte mit einem X-Gal Staining zu färben, verlief erfolglos. Es konnte keine Reaktion bzw. Färbung der Schnitte erreicht werden. Bei dieser Färbemethode wird die Restaktivität des Enzyms β -Galaktosidase genutzt, um eine einfache Färbung in dunklem Blau zu erzeugen. Das Enzym β -Galactosidase hydrolysiert X-Gal zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl (5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol). Das 5-Brom-4-chlor-indoxyl wird vom Sauerstoff der Luft zum tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert (Burn, 2012).

2.1.5 DAB Staining

Anstelle des misslungenen X-Gal-Stainings wurden die Hirnschnitte mit einem DAB-basierten Verfahren der Immunhistochemie angefärbt. Hierbei wurde ein Primärantikörper der Firma Cellsignaling (cFos (9F6) mAb no. 2250, Cell Signaling Technology, rabbit, 1:500) für cFos und als Sekundärantikörper ein Anti-Rabbit-Vectastain verwendet (A-21206, Invitrogen, 1:200). Die benötigte Zeit hierfür betrug ca. 36h. Durch die große Anzahl an Schnitten und durch die festen Zeiten des Färbeprotokolls war es nicht möglich, alle Schnitte zur gleichen Zeit zu färben. Deshalb musste das Färbeprotokoll mehrere Male abgearbeitet werden. Als letzter Schritt der Färbung wurde schließlich Nickelbromid hinzugefügt. Dieser Schritt wurde allerdings nicht bei allen Schnitten einheitlich vorgenommen, weshalb nach der ersten Auswertung nochmals Schnitte gefärbt werden mussten. Letztere wurden nicht mit Nickelbromid versetzt.

2.1.6 Aufnahmen am Mikroskop

Die AG Kelsch am ZI Mannheim überließ dankenswerter Weise ihr Mikroskop für die Aufnahme der Bilder. Es wurden mehrere Regionen von Interesse festgelegt, die aufgenommen werden sollten. Mit Hilfe des Rattenanatomieatlas von Watson wurden die entscheidenden Regionen mit 2,5-facher Vergrößerung im durch-Licht-Modus

aufgesucht und dann mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Das Mikroskop und die angeschlossene Software ImageJ boten zahlreiche Möglichkeiten der Bildbe- und -verarbeitung. Nach mehreren Testaufnahmen und Auswertungen wurde die Evaluation der Bilder anhand von Einzelaufnahmen der jeweiligen Regionen mit 20facher Vergrößerung vorgenommen. Dazu wurden je Hemisphäre und Region jeweils zwei Bilder aufgenommen, sodass von jeder Region vier Bilder pro Tier vorhanden waren. Bei fünf Ratten pro Gruppe lagen schließlich 20 Aufnahmen vor, welche für jede Region einzeln ausgewertet wurden. Bei fünf Regionen entstehen theoretisch 300 Aufnahmen. Allerdings konnten aus technischen Gründen jedoch nur 292 Aufnahmen akquiriert werden.

2.1.7 Auswertung der Aufnahmen

Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Programms Image J ausgewertet. Im Endeffekt sind auf den Aufnahmen cFos-positive Zellkerne zu sehen, welche manuell gezählt und ausgewertet werden mussten. Um ein einheitliches Vorgehen zu gewährleisten, wurden vor der Auszählung folgende einheitliche Kriterien definiert:

- Auswertung der originalen Tiff-Datei ohne Bearbeitung der Aufnahmen
- Jeder Zellkern und Zellschatten, welcher mit bloßem Auge sichtbar war, wurde erfasst
- Konstante, immer gleiche Umgebungslicht-Verhältnisse (dunkler Raum)
- Standardisierte Bildbegutachtung
- Blinde Evaluation (bei Auswertung war die Gruppeneinteilung nicht bekannt)

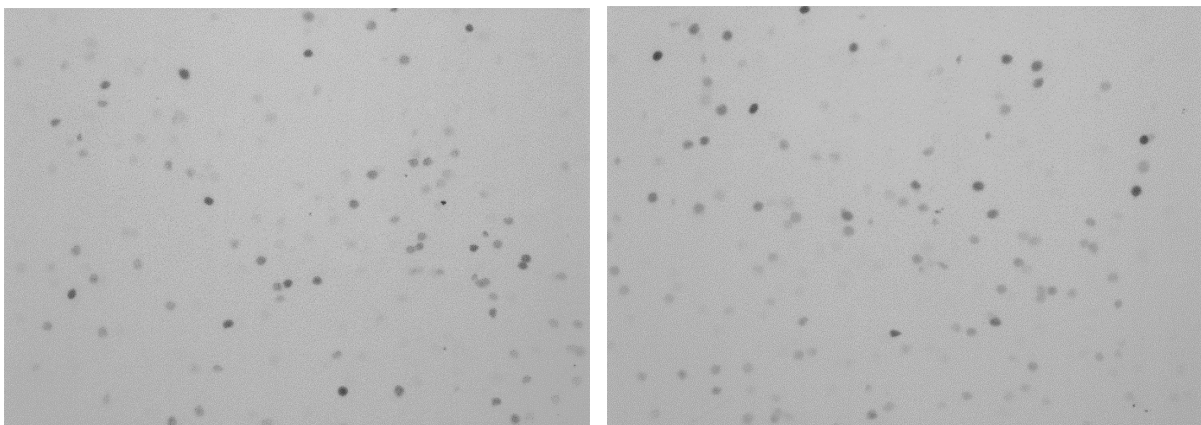


Abb.4 Beispiel Bilder linke und rechte Hemisphäre des mPFC des gleichen Tieres, zu sehen sind cFos positive Nuclei (Nr. 13)

2.1.8 Statistik

Die statistische Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Statistica 10 vorgenommen. Die Daten wurden mittels eines One-way-anova-Tests auf Signifikanz geprüft und anschließend als post-hoc-Test Lsd-Fisher und Dunnet angewendet. Die Daten wurden als mittlerer \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) ausgedrückt und der Alpha-Wert für signifikante Effekte wurde auf 0,05 gesetzt. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ angegeben.

2.2 Adenovirus basierter mGluR-2 Knockdown im infralimbischen Cortex

2.2.1 Tiere

Die sechs männlichen Wistar (Charls River Laboratories) Ratten wurden zu Dritt in einem Käfig gehalten, der in einem Raum mit umgekehrtem Tag/Nacht Rhythmus stand. Dies bedeutet 12h Dunkelheit von 6 Uhr bis 18 Uhr und Licht von 18 Uhr bis 6 Uhr. Sowohl Futter als auch Wasser stand ihnen „ad libidum“ zur Verfügung. Bei Dekapitieren am 22.02.2016 waren die Ratten 14 Wochen alt und wogen zwischen 373g-440g. Die Bedingungen der Haltung waren übereinstimmend mit den ethischen Richtlinien für Haltung und Zucht von Labortieren. Sie wurden von der lokalen Aufsichtsbehörde, dem Regierungspräsidium Karlsruhe (Karlsruhe, Deutschland) überprüft und anerkannt. Der Tierversuchsvorhabens-Antrag und die Genehmigung sind im Anhang zu finden.

2.2.2 Der Virus

Um einen Knockdown des mGluR-2 im IL zu erreichen, wurde ein shRNA Expressionssystem verwendet. Short Hairpin RNA (shRna) sind kleine Doppelstrang-RNA-Moleküle in haarnadelähnlicher Schleifenstruktur. Werden sie durch einen viralen Vektor in den Nukleus gebracht, wird die shRNA transkribiert und das Produkt in das perinukleäre Cytoplasma transportiert. Hier wird die shRNA durch den Endoribonuklease-Komplex, dem sogenannten Dicer, in kurze dsRNA zerteilt. Dies aktiviert den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC). Dieser baut sowohl den

Sensestrang der dsRNA als auch den Antisense Strang ab. Der Antisense Strang entspricht jedoch auch der Ziel-mRNA, was zu deren Abbau und gleichzeitig zu einer Reduktion der Ziel-Genexpression führt.

Das Virus selbst ist ein Adeno-assoziiertes Virus (U6-shRNA25-CamkII-eGFP AAV), welches aufgrund seiner geringen Pathogenität die Zelle ohne unerwünschte Folgen infizieren kann. Die daraus resultierende geringe Immunantwort ist ein weiterer Vorzug. Außerdem stellt die spezifische Integration der Zielstruktur durch das Virus einen Vorteil dar. Diese Zielstruktur darf jedoch nicht größer als 4,8 Kilobasenpaare sein. Dies ist vergleichsweise wenig und zeigt eine Limitation für Adenovirus-basierte Gentherapie auf.

2.2.3 Stereotaktische Adeno-assoziierte Virus-AAV-Injektion

Isofluran diente der Sedierung der sechs Ratten. Sobald diese so tief war, dass die Reflexe erloschen, wurde der Kopf in einen Rahmen eingespannt, um ihn zu fixieren, damit eine gerade und einheitliche Orientierung am Kopf jeder Ratte möglich wurde. Im Anschluss an eine Rasur des Kopfes, desinfizierte man mit 70% EtOH das Injektionsareal, in welches das 2%-Lidocain gespritzt wurde, um eine zusätzliche örtliche Analgesierung zu gewährleisten. Mit einer sterilen Skalpellklinge wurde die Haut über dem Schädelknochen mit einem kleinen Schnitt geöffnet. Als Orientierung dienten folgende Bregma Punkte, um die Injektionskanülen für die Virusinjektion zu positionieren: In beiden Hemisphären, links wie rechts, AP=3.02, ML=±0.5 und DV=-5.2 (Paxinos G, 1998). Damit steuerte man direkt den infralimbischen Cortex IL an. Mit einem Zahnbohrer wurden zwei kleine Löcher in den Schädelknochen getrieben. Durch diese wurden anschließend die Mikropipetten, befüllt mit 5 µl AAV-Lösung, geschoben, um sie dann im IL langsam und vorsichtig zu entleeren. Je nachdem zu welcher Gruppe die Ratte gehörte, wurde ihr entweder bilateral 1µl U6-shUnc-CamkII-eGFP AAV (Kontrolle) oder U6-shRNA25-CamkII-eGFP AAV (Knockdown) injiziert. Die Mikroinjektionen wurden mit einer 60 ml Einwegspritze, welche über einen Plastikschlauch an eine 5µl Glaspipette (Brand, Deutschland) verbunden war, für 5 Minuten durchgeführt.

2.2.4 Dekapitierung der Ratten

Vier Wochen nach der Injektion des Virus wurden die Ratten getötet. Aufgrund vorheriger Forschung gilt der Zeitraum von zwei bis vier Wochen nach Injektion eines Cre-induzierbaren AAV, gemessen in infizierten Zellen/mm², als derjenige mit der höchsten Infektionsrate. Im Übrigen wird von keinem weiteren Anstieg der infizierten Zellen in den Wochen vier bis sechs berichtet (Benskey et al., 2015). Die Ratten wurden mit einer Guillotine für kleine Säugetiere enthauptet. Dies geschah ohne vorherige Sedierung aufgrund der Instabilität der mRNA bzw. der möglichen Interaktion des Narkosegases mit der mRNA. Die Käfige mit den Ratten befanden sich in einem separaten dunklen Raum. Von dort wurden sie einzeln in den Raum mit der Guillotine gebracht. In direktem Anschluss bekamen die Ratten in einer kleinen Operation das Hirn entnommen. Die Hirne wurden umgehend für 2 Minuten in Isopentan eingelegt, welches durch Trockeneis (gefrorener Kohlenstoffdioxid) gekühlt wurde. Sie konnten daraufhin bei -80° C in einer Papierbox eingepackt und in Aluminiumfolie tiefgefroren werden.

2.2.5 Schneiden und Färben der Hirne

Die tiefgefrorenen Rattenhirne wurden in 20 µm dünne Scheiben geschnitten. Hierbei wurde ein Kryostat der Firma Leica (CM1950) verwendet. Die Hirne waren bei -80° C für zwei Wochen gefroren und wurden dann bei -17° C im Kryostat geschnitten. Das Ziel war es, den mPFC zu schneiden. Zur Lokalisierung wurde ein Anatomieatlas für Ratten von Watson genutzt, um den Startpunkt festlegen zu können. Die Schnitte wurden unter einem fluoreszierenden Mikroskop kontrolliert, da das Virus selbst-fluoreszierende Teile in sich trug. Sobald ein kräftiges und eindeutiges fluoreszierendes Signal zu sehen war, begann man damit die Schnitte auf Objektträger (Thermo Scientific Superfrost Plus®, Fisher Scientific) aufzuziehen. Dabei wurde immer der erste, der vierte und der siebte Schnitt auf einen Objektträger aufgenommen. Die Kollektion umfasste am Ende vier bis sieben Objektträger mit jeweils drei Schnitten darauf. Nachdem man die 20 µm dünnen Scheiben bei -17° C geschnitten hat, konnten sie wieder bei -80° C tiefgefroren werden ehe man vier Tage später mit dem Färben beginnen konnte.

Zum Färben wurde das RNAscope® Fluorescent Multiplex Kit (Advanced Cell Diagnostics) verwendet. RNAscope ist eine Methode der insitu-Hybridisierung, eine Sondensignalstrategie, die eine gleichzeitige Signalverstärkung und Hintergrundunterdrückung ermöglicht, um eine Visualisierung einzelner Moleküle unter Beibehaltung der Gewebemorphologie zu erreichen. Patentgeschützte RNA-spezifische Sonden verschmelzen mit der Ziel-RNA und werden dann in eine Kaskade eingebunden, in der am Ende signalverstärkende Moleküle akkumulieren und sich so als Signal erfassen lassen. Mit dieser Methode ist es möglich, drei Zielstrukturen simultan zu färben. Diese waren Probe0, um GFP, Probe1, um Dapi und Probe2, um mGluR-2-mRNA anzufärben. Insgesamt dauerte das Färben sechs Stunden, in denen wiederholt gewaschen, getrocknet und hybridisiert wurde.

2.2.6 Aufnahme der Bilder

Zur Aufnahme der Bilder wurden die Schnitte nach Heidelberg in die Abteilung für Zellbiologie am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Ruprecht-Karl-Universität Heidelberg gebracht, um dankenswerterweise das dortige Konfokal-Mikroskop Leika DM6000 CSF® verwenden zu können. Dieses war über die Schnittstelle STP6000® mit einem Controller der Firma Luigos & Neumann Display SM5® verbunden, wodurch die Technik sowie das Mikroskop als auch die drei Bildschirme gleichzeitig bedient werden konnten. Das Mikroskop war in der Lage mit einer Konfokal-Technik Bilder zu machen. Um die Region ausfindig zu machen, welche das Virus erfolgreich infiziert hat, wurde die 10-fache Vergrößerung des Mikroskops in einem Standard Grau Modus eingestellt. Nach der Lokalisierung des medialen präfrontalen Cortex wurde von der 10-fachen Grau-Vergrößerung zum Laser-Modus gewechselt, da in diesem Modus Bilder mit 63-facher Vergrößerung möglich sind. In diesem Modus wurden je drei Bilder von jeder Hemisphäre jeder Ratte gemacht.

Dies ergab bei sechs Ratten mit jeweils drei Schnitten aus dem mPFC und jeweils einem Übersichtsbild insgesamt 144 Bilder von fluoreszierenden Hirnschnitten. Aufgrund technischer Probleme, konnten lediglich zwei Tiere pro Gruppe ausgewertet werden. Hierbei wurden von jedem Tier drei Bilder des mPFC pro Hemisphäre aufgenommen. Es wurden auch jeweils drei Hirnschnitte des mPFC ausgewertet, sodass pro Tier 18 Bilder ausgewertet werden konnten. Das Mikroskop war in der

Lage, gleichzeitig Aufnahmen in verschiedenen Wellenlängen zu machen. Es wurden auf drei Kanälen verschiedene Signale auf einmal aufgenommen: ein DAPI-Signal, welches in blau die DNA des Nukleus färbte. Ein GFP-Signal, welches durch grüne Farbe den erfolgreichen Einbau der Virus DNA darstellte und das entscheidende mGluR-2-Signal, welches die mRNA für den mGlu-2-Rezeptor gelb markierte.

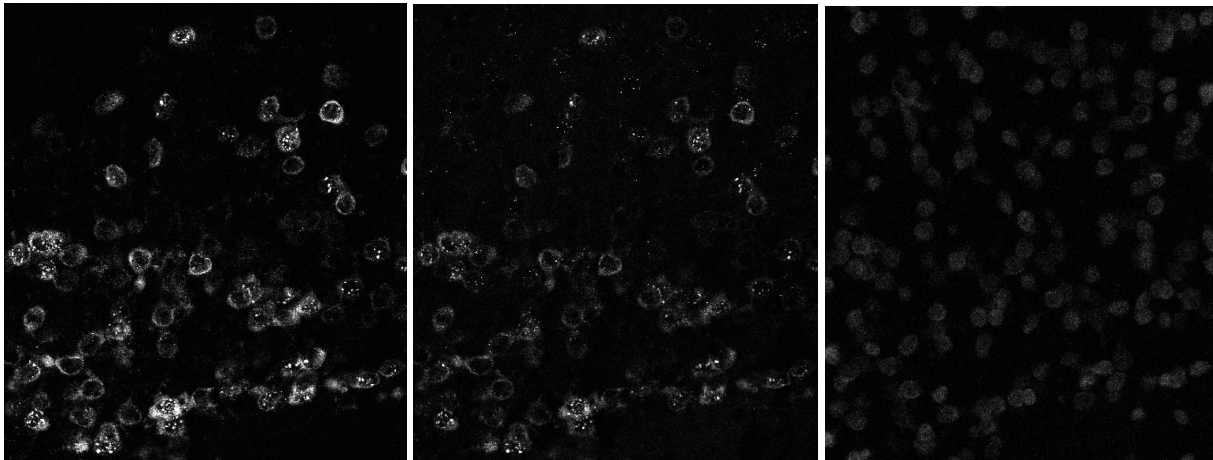
2.2.7 Auswertung der Aufnahmen

Mit Hilfe des Programms Image J wurden die Bilder am Computer digital ausgewertet. Hierbei spielte die Intensität der fluoreszierenden angefärbten Strukturen die entscheidende Rolle. Die verschiedenen Kanäle bestanden aus: Channel 00 ist das GFP- Signal und stellt einen Marker für infizierten Zellen dar. Channel 01 – mGluR-2-mRNA als die Zielstruktur des Knockdowns und Channel 02 – DAPI als Marker der DNA im Nukleus. Um die Intensität des fluoreszierenden Signals messen zu können, musste jede Zelle einzeln markiert werden. Mit der Maus wurden dann die sogenannten Regions of interest (kurz: ROI) für das Programm festgelegt und in ihnen gemessen. Das Programm erstellte dann für jedes ROI einen mittleren Grauwert (Mean Grey Value). Pro Bild kamen im Schnitt bei Markierung aller Zellen 67 ROI-Werte zustande. Diese wurden dann für jedes Bild gemittelt, so dass es für jedes Bild einen Wert ergab. Anschließend wurden dann alle Bild-Werte pro Tier gemittelt und verglichen.

Aufgrund großer Unterschiede in der Helligkeit der Bilder wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Bilder dennoch vergleichbar zu machen. Dies gelang durch erneute Aufnahmen in Grenzregionen der infizierten Gebiete. Hierdurch wurde letztlich ein Vergleich von GFP-positiven, also infizierten Zellen, mit GFP-negativen, also nicht infizierten Zellen, ermöglicht. Daraus wurde ein Quotient pro Bild gebildet, welcher die Helligkeitsunterschiede zwischen den Aufnahmen egalisierte. Dies stellte jedoch nicht den einzigen Unterschied in der Auswertung dar. Es wurden weitere Kriterien für die Auswertung definiert:

- Zellen mit eindeutig angeschnittenem Nukleus
- Eindeutige Zuordnung, ob GFP-positiv oder –negativ
- Überlagerung der Bilder mit dem DAPI Channel
- Beschränkung auf 30 Zellen pro Bild

- Modifikation des Kontrasts und der Intensität in einem weiteren Bild um die Identifikation eindeutiger zu gestalten



Channel 00

Channel 01

Channel 02

Abb.5 Darstellung der gleichen Aufnahme mit unterschiedlichen Wellenlängen des Konfokal Mikroskopes.

Channel 00 – GFP

Channel 01 – mGluR-2_mRNA

Channel 02 - DAPI

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse cFos-Mapping nach mGluR-2/3-Agonist-Injektion

Bei der Entstehung von alkoholabhängigem Verhalten spielen glutamaterge Neuronenpopulationen im Belohnungssystem eine entscheidende Rolle (Pfarr et al., 2015). Um ein tieferes Verständnis der beteiligten Regionen zu erlangen, wurde in diesem Versuch die neuronale Aktivität per cFos Nachweis in belohnungsrelevanten Regionen nach mGluR-2/3-Agonisten-Injektion gemessen. Es konnten signifikante Unterschiede in der neuronalen Aktivität in den verschiedenen Regionen des Belohnungssystems nachgewiesen werden. Als Marker hierfür sind die cFos-positiven Nuklei in den transgenen cFos-lacZ-Ratten zu werten, welche bei diesem Experiment benutzt wurden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Übersicht halber erst bezüglich jeder einzelnen Region besprochen und anschließend zusammengefasst. Es werden pro Region jeweils drei Gruppen miteinander verglichen: Ratten, welche nur Saline injiziert bekamen; Ratten, welche den selektiven mGlu-2/3-Rezeptoragonisten LY379268 in der Konzentration 2mg/kg injiziert bekamen; und Ratten mit einer injizierten Konzentration des Agonisten von 5mg/kg.

Jede Gruppe bestand aus fünf Ratten. Es wurden in der jeweiligen Region zwei Aufnahmen der linken Hemisphäre und zwei Aufnahmen der rechten Hemisphäre gemacht. Somit wurden für jede Gruppe und jede Region jeweils 20 Aufnahmen ausgewertet. Dies ergibt bei drei Gruppen und fünf Regionen theoretisch 300 Aufnahmen. Aufgrund technischer Umstände konnten jedoch nur 292 Aufnahmen ausgewertet werden. Zur besseren Übersichtlichkeit sind im folgenden Abschnitt nur die zusammengefassten Ergebnisse der jeweiligen Gruppe dargestellt und nicht der Anteil cFos-positiver Zellen in jedem einzelnen der 292 Bilder. Diese sind im Anhang zu finden. Die Aufnahme des Thalamus und Hippocampus des Tieres Nr.2 aus der 2mg/kg Gruppe waren nicht möglich.

Die Daten wurden als mittlerer \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben und der Alpha-Wert für signifikante Effekte wurde auf 0,05 gesetzt. Die statistische Signifikanz wurde mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ angegeben und bezieht sich auf den Vergleich zur Kontrollgruppe. # $p < 0,05$ bezieht sich auf den Unterschied zwischen den Interventionsgruppen.

3.1.1 Paraventriculärer Thalamus

In dieser Region konnten keine signifikanten Unterschiede der neuronalen Aktivität nach Injektion des selektiven mGlu-2/3-Rezeptoragonisten LY379268 festgestellt werden. Es wurden in der Kontrollgruppe durchschnittlich 57.91 ± 2.6 SEM ($n=20$) cFos-positive Nuclei gezählt. In der Gruppe, welche 2mg/KG Glutamatagonist injiziert bekam, waren es 70.12 ± 2.5 SEM ($n=16$) und in der Gruppe mit 5mg/KG Glutamatagonist 73.5 ± 4.12 SEM ($n=20$) cFos-positive Nuclei. Diese ergab in der One-Way Anova $F(2,12)=3,1424$, $p=0,07990$. Die zweiseitige post hoc Dunnett Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied bei p-Werten von $p=0.13$ zwischen Kontrollgruppe und 2mg/kg und $p=0.068$ zwischen der Kontrollgruppe und 5mg/kg, bei $MS=188,55$; $df=12$.

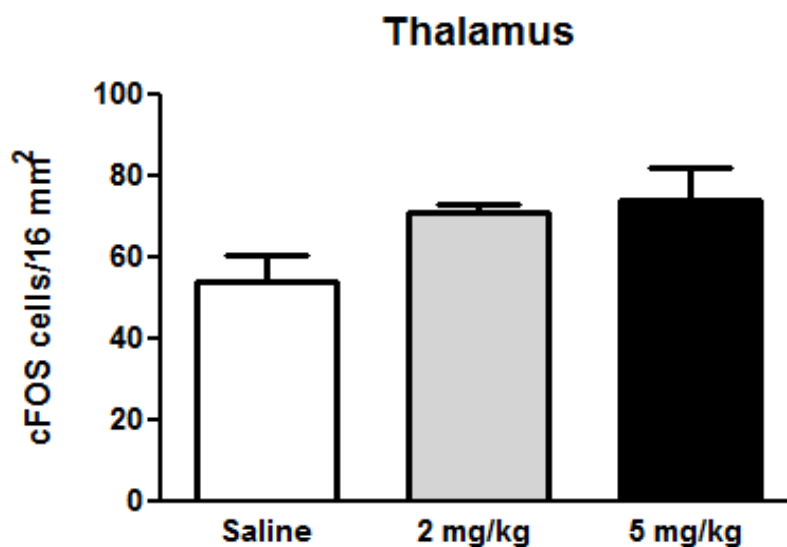


Abb. 5 zeigt die Anzahl an cFos positiven Nuclei pro 16 mm² für die Kontrollgruppe, 57.91 ± 2.6 SEM ($n=20$) die Interventionsgruppe 70.12 ± 2.5 SEM ($n=16$) mit 2 mg/kg KG und 73.5 ± 4.12 SEM ($n=20$) für die 5 mg/kg KG Gruppe, im paraventriculären Thalamus. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden bei $MS=188,55$, $df=12$, weitere Kennzahlen im Anhang

3.1.2 Hippocampus CA1, CA3

Im Hippocampus konnte ein signifikanter Anstieg der neuronalen Aktivität im Vergleich der Kontrollgruppe mit der 5mg/kg Gruppe gezeigt werden. In der Kontrollgruppe konnten im Durchschnitt 14.45 ± 1.13 SEM ($n=20$) cFos-positive Nuclei gezählt werden. In der Gruppe, die 2mg/kg ($n=16$) injiziert bekam, waren es 15.7 ± 2.17 SEM und in der Gruppe mit 5mg/kg 23.25 ± 3.5 SEM ($n=20$) cFos positive Nuclei. Dies ergab in der One-way Anova $F(2,12)=3,7124$, $p=0,05558$. Der anschließendem zweiseitige post-hoc Dunnet Test ergab einen p-Wert von $p=0,048610$ für den Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der 5mg/kg Gruppe. Für den Vergleich der Kontrollgruppe mit der 2mg/kg Gruppe ergab der Test einen p-Wert von $p=0.91$ und stellt somit kein signifikantes Ergebnis dar, bei $MS=30,529$; $df=12$.

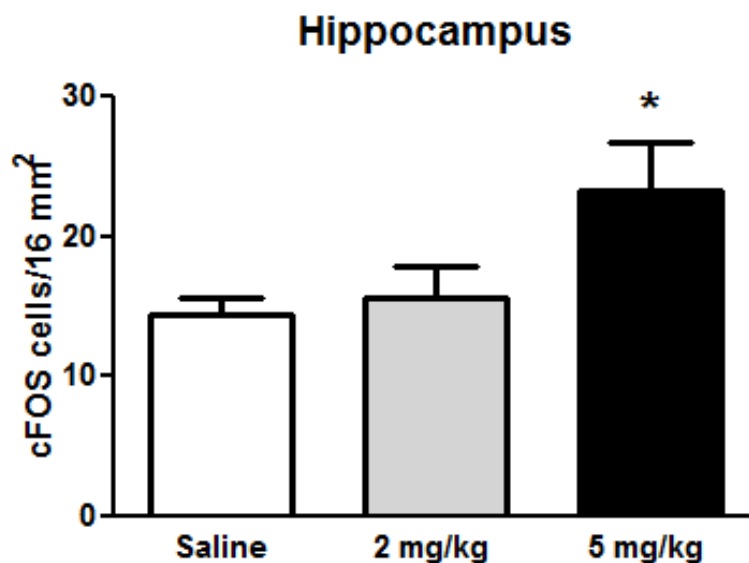


Abb. 7 zeigt die Anzahl an cFos positiven Nuclei pro 16 mm² für die Kontrollgruppe 14.45 ± 1.13 SEM ($n=20$), die Interventionsgruppe 15.7 ± 2.17 SEM ($n=16$) mit 2 mg/kg KG und 23.25 ± 3.5 SEM ($n=20$) für die 5 mg/kg KG Gruppe, im Hippocampus. Es konnte ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$ der 5 mg/kg KG Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden mit einem $MS=30,529$, $df=12$ und einem p-Wert von $p=0,048610$, weitere Kennzahlen im Anhang

3.1.3 Caudate Putamen dorsolateraler Quadrant

In der Caudate Putamen ist im Gegensatz zu den anderen Regionen eine verminderte neuronale Aktivität nach selektiven mGlu-2/3-Rezeptoragonisten LY379268 Injektion nachweisbar gewesen. Es wurde im Durchschnitt folgende Anzahl an cFos positiven Nuclei in den jeweiligen Gruppen gezählt: In der Kontrollgruppe 27.3 +/- 5.95 SEM (n=20), in der 2mg/kg Gruppe 19.85 +/- 1.04 SEM (n=20) und in der 5mg/kg Gruppe waren es 13.95 +/-2.05 SEM (n=20). Dies ergab in der One-Way Anova $F(2,12)=3,2972$, $p=0,07224$. Im zweiseitigen post-hoc Dunnett Test zeigte bei im Vergleich der Kontrollgruppe zu der 5mg/kg Gruppe ein signifikanter Unterschied mit dem p-Wert von $p=0.044925$. Im Dunnett Test fiel der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der 2mg/kg Gruppe fiel mit einem p-Wert von $p=0.29$ nicht signifikant aus, bei $MS=67,869$, $df=12$.

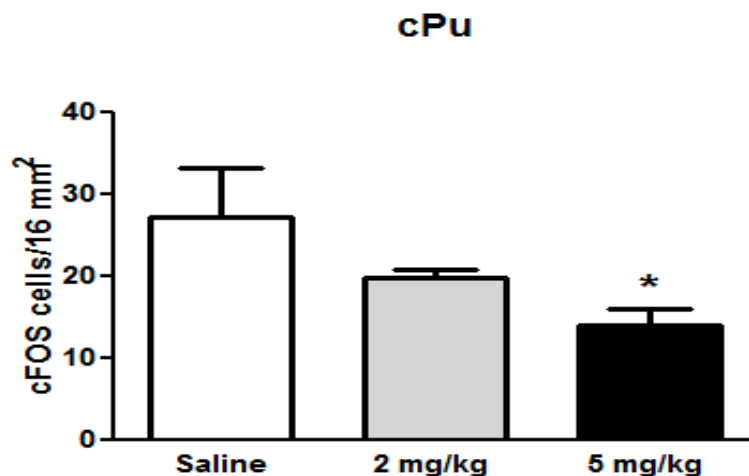


Abb. 8 zeigt die Anzahl an cFos positiven Nuclei pro 16 mm² für die Kontrollgruppe 27.3 +/- 5.95 SEM (n=20), die Interventionsgruppe 2mg/kg Gruppe 19.85 +/- 1.04 SEM (n=20) mit 2 mg/kg KG und 13.95 +/-2.05 SEM (n=20) für die 5 mg/kg KG-Gruppe, im dorsolateralen Quadranten des Putamen. Es konnte ein signifikanter Unterschied mit $p<0,05$ der 5 mg/kg KG-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden, mit $MS=67,869$, $df=12$ und $p=0,044925$. Hier zeigte sich im Gegensatz zu den anderen Regionen eine Abnahme der cFos-positiven Nuclei, weitere Kennzahlen im Anhang

3.1.4 Nucleus Accumbens Shell & Core

Im Nucleus Accumbens konnte eine signifikante Steigerung der cFos-positiven Zellen beobachtet werden, welche sowohl in der 2mg/kg Gruppe als auch in der 5mg/kg Gruppe signifikant war. Die Auswertung der cFos-positiven Zellen ergab für die Kontrollgruppe durchschnittlich $33.9 \pm 2.61\text{SEM}$ ($n=20$), für die Gruppe, welche 2mg/kg injiziert bekam $67 \pm 3.85\text{SEM}$ ($n=20$) und für die Gruppe mit der höchsten injizierten Konzentration mit 5mg/kg $63.25 \pm 6.65\text{SEM}$ ($n=20$). Dies ergab in der One-Way Anova $F(2,12)=14,944$, $p=0,0055$. Der anschließende zweiseitige post-hoc Dunnett-Test ergab p-Werte zwischen der Kontrollgruppe und der 2mg/kg Gruppe von $p_1=0,000313$ und zwischen der Kontrollgruppe und der 5mg/kg Glutamatagonist Gruppe von $p_2 = 0,000822$. Zwischen der 2mg/kg Gruppe und der 5mg/kg Gruppe konnte jedoch bei einem p-Wert von $p = 0.58$ kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, bei $MS=109,91$, $df=12$.

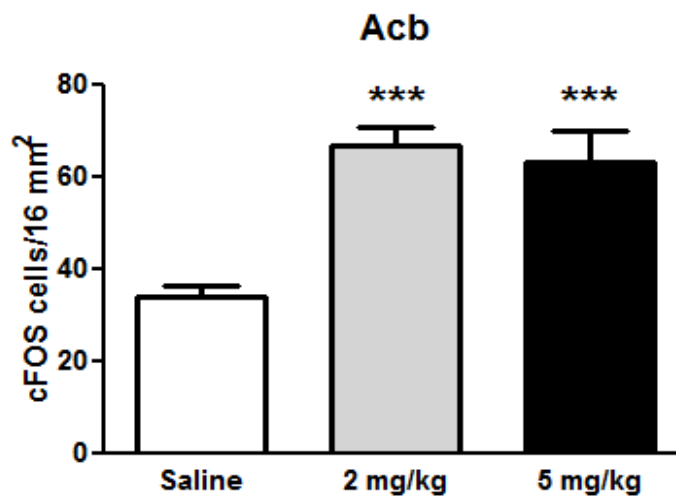


Abb. 9 zeigt die Anzahl an cFos positiven Nuclei pro 16 mm² für die Kontrollgruppe $33.9 \pm 2.61\text{SEM}$ ($n=20$), die Interventionsgruppe $67 \pm 3.85\text{SEM}$ ($n=20$) mit 2 mg/kg KG und $63.25 \pm 6.65\text{SEM}$ ($n=20$) für die 5 mg/kg KG Gruppe, im Nucleus Accumbens. Es konnte ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,001$ der 2mg/kg KG und 5 mg/kg KG Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Weitere Kennzahlen im Anhang

3.1.5 Medialer präfrontaler Cortex A24a & A25

Hier konnte nicht nur ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Interventionsgruppen gezeigt werden, sondern auch zwischen den beiden Interventionsgruppen unter sich. Dies ergab in der Kontrollgruppe 56.2 ± 5.81 SEM ($n=20$) cFos-positive Zellen. In der Interventionsgruppe, welche mit 2mg/kg Glutamatagonist behandelt wurde, waren es 90.85 ± 11.57 SEM ($n=20$) cFos-positive Zellen. Die Interventionsgruppe mit 5mg/kg konnte mit 123.5 ± 10.34 ($n=20$) cFos-positiven Zellen ausgewertet werden. Dies ergab in der One-Way Anova $F(2,12)=12,371$, $p=0,00121$. Dies ergab in der zweiseitigen post hoc Dunnett Analyse p-Werte zwischen der Kontrollgruppe und der 2mg/kg Gruppe von $p_1 = 0.045$. Zwischen Kontrolle und der 5mg/kg Gruppe ergab es einen p-Wert von $p_2 = 0.00062$. Zwischen den beiden Interventionsgruppen von 2mg/kg und 5mg/kg ergab sich ein signifikanter Unterschied mit einem p-Wert von $p_3 = 0.032$, bei $MS=457,80$ $df=12$.

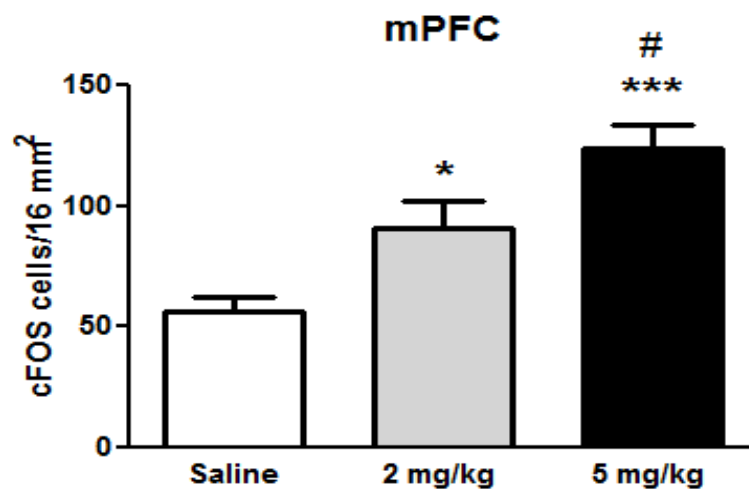


Abb. 10 zeigt die Anzahl an cFos-positiven Nuclei pro 16 mm² für die Kontrollgruppe 56.2 ± 5.81 SEM ($n=20$), die Interventionsgruppe 90.85 ± 11.57 SEM ($n=20$) mit 2 mg/kg KG und 123.5 ± 10.34 ($n=20$) für die 5 mg/kg KG-Gruppe, im medialen präfrontalen Cortex. Es konnte ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$ der 2 mg/kg KG-Gruppe und mit $p < 0,001$ gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden. Des Weiteren unterscheiden sich die beiden Interventionsgruppen signifikant mit $p < 0,05$.

3.2 Ergebnisse des mGlu-2 Rezeptor Knockdown mit Hilfe des AAV-Virus

Es konnte ein signifikanter Knockdown der mGluR-2 mRNA im medialen präfrontalen Cortex nachgewiesen werden. Die Tiere 403 und 407 sind Kontrolltiere, welche mit einem Virus infiziert wurden, der zwar ein GFP-Signal abgibt, also die erfolgreiche Infektion der Zelle mit dem Virus, jedoch kein Knockdown der mGluR-2 mRNA erreichen kann. Diese beiden Tiere bzw. Ihre vier Hemisphären wurden mit denen der Tiere 408 und 412 verglichen, welche mit dem Knockdown-Virus infiziert wurden. Es wurden dazu 64 Aufnahmen von Hirnschnitten ausgewertet. Die angestrebten 72 konnten aus technischen Gründen nicht realisiert werden. Durch die Intensitätsmessung der markierten mRNA konnte eine quantitative Auswertung vorgenommen werden. Dabei kam pro Bild ein durchschnittlicher Grauwert heraus. Dieser ist im folgendem mit MGV (mean grey value) abgekürzt. Der Übersicht wegen wurden die Werte jedes Tieres zusammengefasst. Hierbei konnten folgende absolute Grauwerte für die Kontrollgruppe bestehend aus Tier 403 von 116.29 MGV \pm 10.98 SEM (n=12) und für die Schnitte von Tier 407 mit 49.84 MGV \pm 1.74 SEM (n=18) gemessen werden. Für die Interventionsgruppe, bestehend aus Tier 408 und 412, wurden absolute Grauwerte von 23.62 MGV \pm 2.18 SEM (n=16) für Tier 408 und 66.86 MGV \pm 3.89 SEM (n=18) für Tier 412 bestimmt.

3.2.1 Absolute Grauwerte im medialen präfrontalen Cortex

Die Kontrollgruppe ergab bei der Zusammenfassung aller Messwerte einen durchschnittlichen absoluten Grauwert von 44.58 MGV \pm 5.4 SEM (n=30). Bei der mGluR-2 Knockdown-Gruppe wurde dieser mit 17.54 MGV \pm 3 SEM (n=34) gemessen. Dies ergab in einem ungepaartem zweiseitigen T-Test einen signifikanten Unterschied mit dem p-Wert = 0.0004.

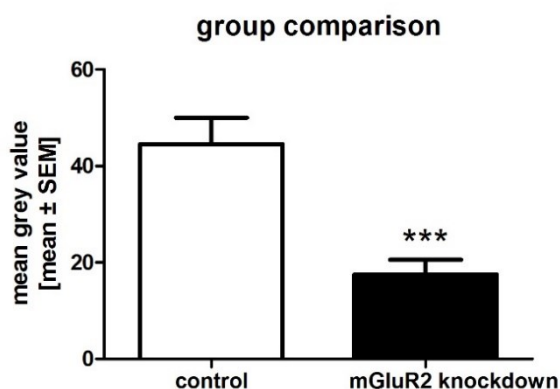


Abb. 11 zeigt die durchschnittlichen Grau Werte der mGluR-2_mRNA in der Kontrollgruppe 44.58 MGV \pm 5.4 SEM (n=30) und der Interventionsgruppe 17.54 MGV \pm 3 SEM (n=34) an. Es ist eine signifikante Abnahme mit $p < 0,001$ der mGluR-2_mRNA durch den injizierten Virus zu erkennen.

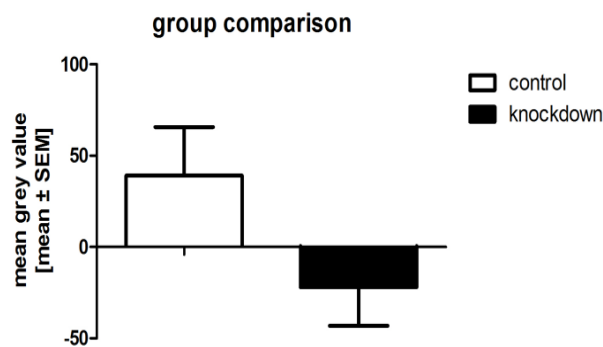


Abb. 12 Darstellung der Differenz. Dies entspricht einer Kockdown-Effizienz von - 60,65 % in vivo bei 44.58 MGV +/- 5.4 SEM der Kontrollgruppe und 17.54 MGV +/- 3 SEM. Bei der Konstruktion des Virus wurde in Vitro eine Kockdowneffizienz von 72.87% beschrieben (A.Gallego).

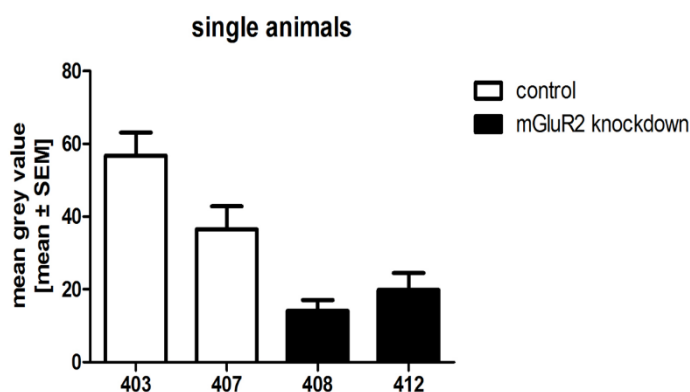


Abb. 13 zeigt den mittleren Grauwert der Aufnahmen dargestellt pro Tier.

Tier 403: 56.737 MGV +/- 6359 SEM
 Tier 407: 36.482 MGV +/- 6326 SEM
 Tier 408: 14.072 MGV +/- 3060 SEM
 Tier 412: 19.851 MGV +/- 5012 SEM

3.2.2 Vergleich des Quotienten mGluR-2-mRNA Signal in GFP + / GFP-

Hierbei wurde ein Vergleich des Quotienten des mGluR-2-mRNA-Signals in GFP + / GFP- angestellt, um die Helligkeitsunterschiede in den einzelnen Bildern zu minimieren, da nun die virusinfizierten Zellen jeweils mit dem Korrelat aus dem gleichen Bild ohne infizierte Zellen verglichen wurden. Somit konnte eine eindeutige Aussage über die reine Wirkung des Knockdowns oder des Kontrollvirus getroffen werden und die Unterschiede in der Intensität, welche bei der Aufnahme entstanden sind, reduziert werden. Es wurde aus dem mGluR 2 mRNA-Signal in GFP + und GFP- Zellen ein Quotient gebildet.

Hierbei ergab sich für die Tiere aus der Gruppe des Knockdowns (408,412) ein Wert für GFP positive Zellen von 34.48 MGV +/- 1.52 SEM (n=34) und für die GFP- von 50.01 MGV +/- 2.71 SEM (n=34). In der Kontrollgruppe wurden folgende Werte bestimmt: GFP+ 64.65 MGV +/- 2.4 SEM (n=30) und für GFP- 53.98 MGV +/- 1.96 SEM (n=30). Dies ergab einen Quotienten für die Tiere der Kontrollgruppe 403 von 1.23 +/-

0.03 SEM (n=12) und für das Tier 407 von 1.19 +/- 0.029 SEM (n=18). Der Quotient von den Tieren der Knockdown-Gruppe beträgt für das Tier 408: 0.69 +/- 0.03 SEM (n=16) und für das Tier 412: 0.73 +/- 0.04 (n=18).

group comparison (ratio [mGluR2+GFP]/[mGluR2])

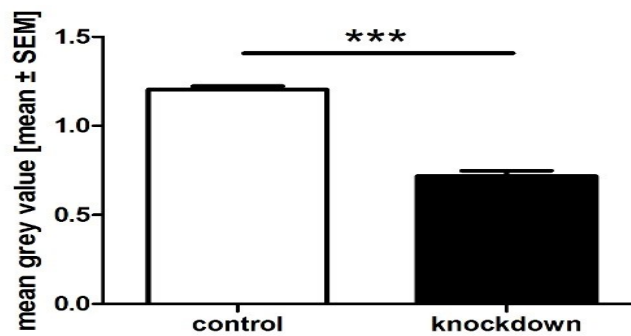


Abb.14. Hier wurden nun der Quotient der beiden Gruppen verglichen und es konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Hierbei betrug der Quotient der Kontrollgruppe 1,21 +/- 0.07 SEM (n=30) und der Interventionsgruppe 0.71 +/-0.04 SEM (n=34). Der zweiseitige T-Test ergab einen p- Wert von p= 0,0004.

4 DISKUSSION

Diese Arbeit setzt sich mit dem Erlernen abhängigen Verhaltens und den neuropharmakologischen Grundlagen dieses Verhaltens auseinander. Dazu wurden im ersten Versuch die Aktivität von Neuronenpopulationen des Belohnungssystems kenntlich gemacht. Hierzu wurde das IEG cFos als Proxymarker angefärbt, welches nach der Injektion eines Glutamatagonisten LY379268 die Aktivität von Neuronenpopulationen nachweist. Dabei zeigte sich ein differenziertes Aktivitätsmuster in den untersuchten Regionen. Diese Ergebnisse wurden mit den in unserem Labor gewonnenen FDG-PET Daten nach Injektion des Glutamatagonist LY379268 verglichen.

Der zweite Versuch zeigt die Möglichkeiten der Manipulation von Neuronalen Strukturen auf. Dem mGluR-2 wird eine zentrale Rolle in der Kontrolle über abhängiges Verhalten zugeschrieben. Deshalb wurde er Ziel der in-vivo-Manipulation. Hierzu wurde per Virusvektor die Expression des mGluR-2 im mPFC ausgeschaltet. Der Virus wurde in unserem Labor konstruiert und enthält die antisense mRNA des mGlu-2 Rezeptors, dessen mRNA zwar noch translatiert aber die Proteinbiosynthese nicht mehr transkribiert wird. Es ist gelungen den Nachweis über die Funktionalität des Virusvektors zu erbringen. Dies stellt ein weiteres Werkzeug zur Modifikation von Tiermodellen in der Suchtforschung dar.

Ergebnisse dieser Arbeit sind Teil einer Veröffentlichung, die von einer Therapiestrategie zur Reduktion der Rückfallwahrscheinlichkeit handelt (Meinhardt et al, 2021). Hierbei spielt der Ausgleich eines mGluR-2 Defizites durch Psylocibin die entscheidende Rolle. Die FDG-PET Daten, mit denen die Ergebnisse verglichen werden, lassen sich nutzen, um potentielle Gruppen zu identifizieren, welche von dieser Strategie profitieren könnten. Hierbei handelt es sich um den Nachweis fehlender Reduktion der Glucose Metabolisierung nach mGluR-2-Agonisten Injektion. Bei dieser Gruppe ist von einer reduzierten mGlu-2 Rezeptorexpression auszugehen. Dieser eingeschränkten Rezeptorexpression im mPFC konnte eine Rolle in der Reduktion kognitiver Flexibilität sowie Induktion von Craving zugeschrieben werden. Beides stellen Diagnosekriterien der Abhängigkeit im DSM-V für Menschen dar. Durch Wiederherstellung der mGluR-2 Expression konnten diese Effekte rückgängig

gemacht werden. Dies identifiziert die Expression des mGluR-2 als therapeutischen Ansatzpunkt. Es konnte gezeigt werden, dass die Psylocibin-abhängige Aktivierung von Serotoninrezeptoren diese wiederum desensibilisiert. Aufgrund wechselseitiger hemmender Einflüsse führt dies zu einer vermehrten Expression des mGluR-2. Psylocibin erhöht die mGluR-2 Expression und reduziert dadurch die Rückfallwahrscheinlichkeit alkoholabhängiger Ratten. Dies macht es zu einem neuen Pharmakologischen Ansatzpunkt der Therapie von Alkoholabhängigkeit (Meinhardt et al, 2021).

4.1 Neuronale Aktivität in belohnungsrelevanten Regionen

Es ist durch cFos in den Regionen, die zu den belohnungsrelevanten Hirnregionen gehören, gelungen, einen Nachweis der Aktivität zu erbringen (Linden, Bergeron, & Schoepp, 2005). Diese Aktivität war signifikant im Nucl. Accumbens, mediopräfrontalen Cortex (mPfc) und Hippocampus erhöht. Im Thalamus kam es zu einer nicht signifikanten Steigerung und in der caudate Putamen zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität. In einem vergleichbaren Versuch wurde ebenfalls Alkohol naiven männlichen Ratten 3mg LY379268 i.p injiziert. Anschließend konnte ein ausgeprägtes Muster neuronaler Effekte, welche durch eine erhöhte cFos-Expression innerhalb Stress-assoziierten Regionen des Gehirns und eine verminderte cFos-Expression im Hippocampus gekennzeichnet sind, nachgewiesen werden. (Zhao et al., 2006).

Der ebenfalls an Alkohol-naiven Ratten angestellte Vergleich zwischen dem Glutamatantagonisten LY341495 und dem selektiven mGlu-2/3-Rezeptoragonisten LY35470 kam zu dem gleichen Ergebnis wie eine Arbeitsgruppe des Institutes für Biomedizin der Universität Helsinki (Linden et al., 2005). Bei diesem Versuch war der Anstieg der cFos-positiven Nuclei in belohnungsrelevanten Regionen nach Injektion des Antagonisten zwar deutlich stärker, doch auch nach Injektion des selektiven mGlu-2/3-Rezeptoragonisten kam es zu einem Anstieg, wenn auch deutlich schwächer.

Diese Ergebnisse lassen jedoch noch keinen Rückschluss auf ein bestimmtes Verhalten zu, insbesondere nicht in Bezug auf das Erlernen von abhängigem Verhalten. Deshalb ist es an dieser Stelle von großer Bedeutung in vivo Experimente durchzuführen. Dies wurde durch Pfarr gezeigt. Es ist ihr gelungen, verschiedene

Neuronenpopulationen und deren Bedeutung sowohl für drogeninduzierte Belohnung (Ethanol) als auch für natürlich assoziierte Belohnung (Saccharin) nachzuweisen. Darüber hinaus gelang es ihr, Unterschiede in den nachgeschalteten Projektionszielen des jeweiligen Neuronen, welches auf einen bestimmten Reiz reagiert, nachzuweisen. (Pfarr, 2019).

4.1.1 Der Glutamatagonist LY379268

Metabotrope Glutamatrezeptoren der Gruppe II bestehen aus den Subtypen mGluR-2 und mGluR-3. Die metabotrope Glutamatrezeptoren des Subtyps 2 werden hauptsächlich auf präsynaptischen Glutamat- (und γ -Aminobuttersäure-)Neuronen exprimiert. Wenn sie aktiviert werden, geben sie eine negative Rückkopplung ab, um die Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter zu verringern. Metabotrope Glutamatrezeptoren vom Subtyp 3 werden sowohl auf postsynaptischen und präsynaptischen Neuronen als auch auf Gliazellen exprimiert. Studien konnten zeigen, dass auch der mGluR3 im mPFC eine Rolle als Modulator für Lernstörungen und Kognition spielt. Hierbei nimmt er an der Entstehung von abhängigem Verhalten und weiteren psychiatrischen Erkrankungen teil (Walker et al., 2015).

Im hier diskutierten Versuch wurde die Wirkung des selektiven mGlu-2/3-Rezeptoragonisten LY379268 auf belohnungsrelevante Hirnareale untersucht. Dies wurde durch die Bestimmung cFos-positiver Zellen in den zu untersuchenden Hirnregionen vorgenommen. Der Agonist bindet selektiv an mGlu-2/3 Rezeptoren mit einer hohen Affinität und guter Bioverfügbarkeit an, was zu deren Aktivierung führt. Daraufhin kommt es intrazellulär zur Aktivierung von Gi-Proteinen und einer Inhibition der Adenylatcyclase, was wiederum zu einer Reduktion der intrazellulären zyklischen Adenosin-Monophosphat (cAMP) Konzentration führt. Schließlich geschieht eine Reduktion exzitatorischer präsynaptischer Potentiale und endet in einer reduzierten Glutamat-Freisetzung in den synaptischen Spalt (Imre, 2007).

Aufgrund der weiten Verbreitung von Glutamat als Neurotransmitter als auch des mGluR-2, beeinflusst dieses System zahlreiche Verhaltensweisen und Erkrankungen. Abnormale Veränderungen der glutamatergen Neurotransmission, insbesondere eine übermäßige Glutamat-Freisetzung führen zu neuronalen Dysfunktionen, die eine

Vielzahl von neurologischen und psychiatrischen Störungen auslösen können. Dazu gehören Epilepsie, Entwicklung von Suchtverhalten, Schlaganfall, Schmerzen, Angstzustände und Psychosen (Imre, 2007).

Vor allem in Bezug auf abhängiges Verhalten gibt es zahlreiche Studien mit dem Glutamatagonisten LY379268 oder AZD8529. Diese zeigen, dass es durch den spezifischen mGluR-2-Agonisten zu einer dosisabhängigen Reduktion des Abhängigkeitsverhalten unter Stress oder dem Aussetzen von Schlüsselreizen kommt. (Augier et al., 2016; Zhao et al., 2006). Die Negativkontrolle mit Indian-P-Ratten, welche eine Nonsense-Mutation für den mGluR-2 tragen, zeigt keinen Effekt auf das Abhängigkeitsverhalten nach Glutamatagonist-Injektion. Es handelt sich somit um einen rezeptorspezifischen Effekt. Auch eine Reduktion der Alkoholselbstverabreichung konnte durch LY379268 gezeigt werden (Bäckström & Hyytiä, 2005). Diese vielversprechenden Ergebnisse konnten jedoch an Primaten nicht bestätigt werden. Der selbstbestimmte Kokainkonsum von Rhesusaffen wurde nicht durch den Glutamatagonist beeinflusst (Czoty, Blough, Landavazo, & Nader, 2020). Aufgrund der geringen Anzahl an Primatenstudien erfolgt hier der Vergleich zwischen Alkohol und Kokain. Beide zählen zu den Substanzen mit hohem Abhängigkeitspotential und sind auf dem Gebiet der Neurowissenschaften häufig verwendete Substanzen, vor allem im Kontext der hier beschriebenen Regionen des Belohnungssystems (Laubach et al., 2018).

4.1.2 18FDG-PET nach Glutamatagonist LY379268 Behandlung

Das FDG-PET ist ein bildgebendes Verfahren aus der Nuklearmedizin. Es beruht auf der sogenannten Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Hierbei werden zeitgleich eintreffende Gammaphotonen registriert. Dazu benötigt man ein radioaktives Kontrastmittel, auch Tracer genannt. Dafür wird zum Beispiel Glucose mit dem Radionuklid ^{18}F zu ^{18}F -Fluordesoxyglucose verbunden. Diese Glucose nimmt bis zu einem gewissen Punkt am physiologischen Stoffwechsel teil und wird metabolisiert. Hierbei kommt es dann zur Akkumulation des Radionuklids, abhängig vom Glucosestoffwechsel und somit zu einem verstärkten Signal in der Positronen-Emissions-Tomographie. Dieses Signal kann man in einem zweiten Schritt mit den anatomischen oder funktionalen Bildern eines MRT oder CT korrelieren. Anschließend

erhält man Informationen über Stoffwechselfvorgänge in anatomischen Regionen am lebenden Organismus (Eckelman, 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass intensiver Alkoholkonsum den Glukose-Metabolismus im Gehirn reduziert (Volkow et al., 2015). Alkoholabhängige Ratten mit mGluR-2-Defizit im infralimbischen Cortex und Kontrollgruppen nach Glutamat-Agonisten-Injektion wurden im PET untersucht. Dazu wurden die Tiere nach Köln gebracht und dort nach einer einwöchigen Habitierungsphase untersucht. Hierbei wurden ihnen intraperitoneal 2mg/kg LY379268 injiziert (Meinhardt et al, 2021). Eine Dosis welche auch in der cFos-post-mortem-Analyse dieser Arbeit Verwendung fand. Anschließend wurden die Tiere mit Isofluran anästhesiert und ein 30-minütiger Emissionsscan durchgeführt. In den Kontrolltieren zeigte sich ein reduziertes FDG-PET-Signal nach Glutamat Injektion, was auf einen reduzierten Glucosemetabolismus rückschließen lässt.

Diesen Effekt könnte man mit der autoregulatorischen inhibierenden Funktion des mGluR-2 erklären. Bei den alkoholabhängigen Tieren konnte dieser inhibitorische Effekt nicht beobachtet werden. Dort zeigte sich nach der LY379268-Injektion keine Änderung im FDG-PET-Signal und somit keine Aktivierung der autoregulatorischen Funktion des mGluR-2 (Meinhardt et al, 2021). Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der post mortem cFos-Analyse und in vivo PET-Analyse nach LY379268-Injektion anhand der einzelnen Regionen verglichen und diskutiert.

Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass zwei unterschiedliche Effekte gemessen und miteinander verglichen werden. In dieser Arbeit wurden cFos-positive Nuclei pro Fläche gezählt. Dies stellt die Gen-Expression im Zellkern dar. Bei den Untersuchungen des FDG-PET wird der metabolische Stoffumsatz des Tracers hauptsächlich in den Nervenendigungen als Signal aufgezeichnet. Hierbei handelt es sich um die von dem Tomographen gemessene Positronen-Emission, welche Gammaphotonen über die sogenannte „Line of Response“-Methode einem gemeinsamen Ursprung zuordnet. In dieser unterschiedlichen Darstellung können die Differenzen der Ergebnisse begründet sein.

4.1.3 Interpretation nach der Region

Thalamus

Der paraventriculäre Thalamus (PVT), der sich in der dorsalen Mittellinie des Thalamus befindet, ist ein möglicher Ort für Interaktionen zwischen Belohnung und Gefahr. Der PVT erhält Inputs von Hirnstamm- und Hypothalamusregionen, die zwischen Energiehaushalt und Motivation vermitteln (Choi & McNally, 2017). Er projiziert seinerseits auf Amygdala-, präfrontale und striatale Regionen, die für Belohnungs- und Angstlernen wichtig sind (Groenewegen & Berendse, 1994). Diese vielfältige Konnektivität unterstreicht die Bedeutung des PVT für verschiedene Aspekte des Lernens, der Motivation, der durch Drogen einsetzenden Belohnung und des Entzugs (Neumann et al., 2016) sowie die Wiederaufnahme der Drogensuche nach vorheriger Abstinenz (Hamlin, Clemens, Choi, & McNally, 2009).

Aufgrund dieser vielfältigen Eigenschaften wurde in vorliegender Untersuchung ein Fokus auf diese Region gelegt. Es konnte ein leichter, jedoch nicht signifikanter Anstieg festgestellt werden. Da die cFos-positiven Nuclei als Proxy für neuronale Aktivität gelten, erhöhte sich also im Thalamus die neuronale Aktivität nicht signifikant.

Die in unserem Labor ebenfalls durchgeführte Bildgebung, in diesem Fall eine 18F-FDG-Positronen-Emissions-Tomographie (PET), um die metabolische Hirnaktivität in Bezug auf die Glukoseverwertung nach der Injektion des Glutamatagonisten LY379268 zu messen, konnte auch keine signifikanten Unterschiede in dieser Region feststellen (Meinhardt et al, 2021).

Hippocampus CA1 & CA3

Der Hippocampus ist die Hirnregion, welche mit dem Übergang von Kurzzeit- in Langzeitgedächtnis in Verbindung steht. Dies kommt durch die Integration bzw. das Zusammenführen von Informationen zustande, welche wichtig für die Bildung räumlicher und kontextbezogener Erinnerungen sind (Kutlu & Gould, 2016). Neben der Beteiligung an der deklarativen Langzeitgedächtnisbildung ist der Hippocampus auch als eine der Hirnregionen bekannt, die eine hohe synaptische Plastizität aufweist. Diese wird anhand von Veränderungen der Langzeitpotentiation (LTP) beurteilt (Teyler & DiScenna, 1987). Die Kombination aus der Fähigkeit zur Bildung kontextbezogener Erinnerungen und der hohe Grad an Plastizität machen den Hippocampus anfällig für

substanzinduzierte Veränderungen, welche einen tiefgreifenden Einfluss auf das Verhalten haben können (Kutlu & Gould, 2016)

Im Hippocampus wurde ein signifikanter Anstieg der cFos⁺ Zellen im Vergleich der Kontrollgruppe mit der 5mg/kg-Gruppe nachgewiesen. Dies lässt auf eine erhöhte neuronale Aktivität in dieser Region schließen. Die Ergebnisse des 18F-FDG PET deuten in diesem Bereich auf eine reduzierte Glucoseaufnahme und somit auf eine verminderte neuronale Aktivität hin. Beide Methoden gelten als Proxy für neuronale Aktivität. Ein direkter Vergleich ist jedoch trotzdem schwierig.

Caudate Putamen

Das Putamen bildet zusammen mit dem Nucleus caudatus das Striatum. Dieses ist Teil der Basalganglien. Die Basalganglien arbeiten mit dem Cortex, dem Thalamus und den Hirnstammzentren zusammen, um geplante sowie motivierte Verhaltensweisen, die motorische, kognitive und limbische Schaltkreise erfordern, zu koordinieren und auszuführen. Am weitesten verbreitet ist das Wissen über ihre motorischen Funktionen und ihre Verbindung mit der Neuropathologie bei neurodegenerativen Erkrankungen. Ihnen wird jedoch nach neueren Erkenntnissen eine Schlüsselrolle bei belohnungsassoziiertem Verhalten und dessen Verstärkung zugeschrieben. Dadurch spielen sie auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von abhängigem Verhalten und der Entstehung von Gewohnheiten (Haber, 2016; Heinz et al., 2020).

In der Caudate Putamen wurde im Gegensatz zu allen anderen Regionen eine geringere Anzahl cFos⁺ Zellen nach Gabe des Glutamatagonisten nachgewiesen. Dies zeigte sich als signifikanter Unterschied der 5mg/kg-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies entspricht auch den Ergebnissen, welche im Versuch aus den 18F-FDG PET Bildern gewonnen wurden. Im Allgemeinen wurde eine reduzierte neuronale Aktivität sowohl bei der cFos-Immunreaktion, als auch im 18F-FDG-PET nachgewiesen, welches bei nicht abhängigen Tieren zu erwarten war. Bei nativen Tieren ist von einer regelgerechten Funktion und Konzentration des mGluR-2 auszugehen. Bei Injektion des Agonisten sollte es durch die autoregulatorisch inhibierende Wirkung des Rezeptors zu einer reduzierten Ausschüttung von Glutamat in den synaptischen Spalt kommen und somit auch zu einer reduzierten neuronalen

Aktivität. Diese reduzierte Aktivität konnte in dieser Region durch beide Methoden hier nachgewiesen werden.

Nukleus accumbens core & shell

Die NAc ist Teil des ventralen Striatalkomplexes. In dieser Region werden Informationen aus den limbischen Regionen mit motorischen Regelkreisen zusammengefasst. Dies initiiert über die Motivation ein zielorientiertes Verhalten (Sesack & Grace, 2010). Der NAC zählt zu den zentralen Strukturen des Schaltkreises, der die Reaktion auf Belohnungen und konditionierte Assoziationen optimiert. Dadurch sind Veränderungen in dieser Region stark mit der Entwicklung von Suchterkrankungen assoziiert (Kalivas & McFarland, 2003). Die Integration affektiver und kognitiver Prozesse, die ein zielgerichtetes Verhalten unterstützen, wird durch den frontalen Cortex reguliert. Ein unzureichender Output aus dieser Region trägt zu psychischen Störungen bei, die von Drogenmissbrauch über Depressionen bis hin zu Schizophrenie reichen (Sesack & Grace, 2010).

Die Ergebnisse für diese Region zeigen eine signifikante Steigerung der cFos-positiven Zellen, welche sowohl in der 2mg/kg-Gruppe als auch in der 5mg/kg-Gruppe stark signifikant waren. Somit konnte eine starke Aktivität des NAC nach der Injektion des Glutamat Agonisten LY379268 nachgewiesen werden. Diese gesteigerte Aktivität konnte auch in den aus dem Labor stammenden ¹⁸F-FDG-PET-Bildern für diese Region nachgewiesen werden. Hierbei wäre es interessant, dass in dieser Region besonders wichtige Zusammenspiel mit dopaminergen Synapsen zu untersuchen. Die dopaminergen Synapsen schaffen die Möglichkeit der Modulation der Glutamatübertragung auf distale dendritische Zellen. Diese strukturelle Konfiguration ermöglicht zudem präsynaptische Interaktionen zwischen Glutamat und Dopamin, indem die Diffusionsdistanz begrenzt wird. Dies führt zu einem schnelleren Signal an den extrasynaptische Rezeptoren auf der postsynaptischen Membran (Sesack & Grace, 2010). Hierbei könnte der hier untersuchte mGluR-2 eine wichtige Rolle spielen, da dieser vor allem an der präsynaptischen Membran zu finden ist und dort eine autoregulatorische Wirkung entfaltet.

Medialer präfrontaler Cortex

Der mPFC ist ein Schlüsselement des mesokortikolimbischen Systems, von dem angenommen wird, dass es das Verhalten beim Drogenkonsum reguliert (Kalivas, 2009). Der präfrontale Cortex ist wichtig für die Regulierung von Kognition sowie Verhalten und spielt dadurch eine wichtige Rolle bei der Suche bzw. Einnahme von Drogen. Er ist auch an der Auslöschung und Wiederaufnahme von drogenassoziiertem Verhalten beteiligt (Moorman, James, McGlinchey, & Aston-Jones, 2015).

Hier konnte ein signifikanter dosisabhängiger Anstieg der cFos⁺ Zellen zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Interventionsgruppen gezeigt werden. Dies spricht für eine starke Zunahme der neuronalen Aktivität in dieser Region nach Injektion des Glutamatagonisten LY379268. Eine solche Zunahme der Aktivität konnte in den 18F-FDG PET Versuch so jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sprechen eher für eine Abnahme der Aktivität nach der Injektion des Glutamat Agonisten LY379268. Die unterschiedlichen Ergebnisse können durch den unterschiedlichen Proxy, einerseits die zelluläre insbesondere synaptische Glucoseaufnahme und andererseits die cFos Genexpression im Zellkern, begründet werden. Dieses Phänomen wurde in mehreren Studien beschrieben, bei denen Stress in Ratten eine erhöhte cFos-Konzentration verursachte. Jedoch führte dies beim Menschen, im Vergleich zu fMRI- Daten, zu einem deutlich reduzierten Blutfluss. Dies zeigt, dass der Vergleich unterschiedlicher Methoden nicht ohne weiteres möglich ist (McReynolds, Christianson, Blacktop, & Mantsch, 2018).

Aktuelle Theorien zur Beziehung zwischen dem medialen präfrontalen Cortex (mPFC) und dem Verhalten bringen spezifische Funktionen mit bestimmten Subregionen in Zusammenhang. Der dorsale mPFC soll eine Rolle bei der Suche nach Drogen und Belohnungen spielen und der ventrale mPFC eine Rolle bei der Hemmung von Belohnungen sowie der Suche nach Drogen (Heilig et al., 2017; Moorman et al., 2015; Pfarr et al., 2015). Diese Unterscheidung wurden jedoch nicht im Nachweis der cFos⁺ Zellen vorgenommen, da mit dieser Methode die Subpopulationen nicht sauber zu trennen waren.

4.1.4 Vor – und Nachteile der auf cFos basierenden Methoden

Die einfache Bestimmung der cFos-mRNA und des cFos-Proteins sowie die Verwendung als Aktivitätsmarker führt zu zahlreichen Anwendungen in unzähligen Studien (W. Sommer et al., 1993). Durch die Verwendung von Tieren gleichen Alters, Geschlechts, Stammes sowie gleicher Art und durch den gleichen Zeitpunkt der Quantifizierung wird von einer Vergleichbarkeit der Studien ausgegangen (McReynolds et al., 2018). Die primären Methoden, die zur Visualisierung und Analyse der cFos-mRNA (In-situ-Hybridisierung) und der Fos-Proteinexpression (Immunhistochemie) verwendet werden, bieten eine hervorragende räumliche Auflösung, einschließlich der Analyse laminarer Expressionsmuster. Zudem ist es heute möglich, das Fos-Signal mit anderen zelltypspezifischen Markern oder retrograden Tracern zu koppeln.

Retrograde Tracer, wie Fluorgold, Cholera-Toxin-Untereinheit B (CTb), rote und grüne Retrobeads und retrograde Viruskonstrukte, werden in die Zielregionen des Gehirns infundiert, von den Axonterminals in dieser Region aufgenommen und in die Zellkörper zurücktransportiert (Köbber et al., 2000; S. Pfarr et al., 2018). Es ist gelungen, relevante Neuronenschaltkreise, welche an Stress und Suchtverhalten beteiligt sind, zu identifizieren. Dies kommt dadurch zustande, dass die cFos-Methode im Gegensatz zu anderen Methoden wie z.B. der in-vivo-Elektrophysiologie, nicht auf eine bestimmte Gehirnregion beschränkt ist. Mit ihr ist es möglich, Neuronenpopulationen zu untersuchen, welche sich durch das ganze Gehirn erstrecken (Kimbrough et al., 2020). Das macht die Methode zu einem nützlichen Instrument, um erste Anhaltspunkte zur Identifizierung bestimmter Hirnregionen zu bekommen, die bei einem bestimmten Verhalten aktiv sind. Das ganze gelingt relativ kostengünstig, einfach, schnell und man erhält eine große Menge an Informationen pro einzeltem Versuchstier (McReynolds et al., 2018).

Die vielen erwähnten Vorteile machen die cFos-Methode zu einem nützlichen Instrument, welches jedoch auch zahlreiche Limitationen und Einschränkungen mit sich bringt, die beim Umgang mit dieser Methode zu beachten sind. So ist es zwar möglich, einen Einblick in die neuronale Aktivierungsmuster durch eine Zunahme der Fos-Expression zu gewinnen, jedoch muss man bei der Interpretation von Nullbefunden vorsichtig sein, da das Fehlen von Veränderungen der Fos-Expression

das Vorliegen relevanter Veränderungen der neuronalen Aktivität nicht ausschließt (Cullinan, Herman, Battaglia, Akil, & Watson, 1995).

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von cFos auch einen Einfluss auf das Verhalten hat. Dies gelang durch die Beobachtung eines geänderten Rotationsverhaltens von Ratten nach Änderung der cFos-Konzentration in striatalen dopaminergen Neuronen (W. Sommer et al., 1993). Des Weiteren wird zwar angenommen, dass neuronale Stimulation in der Transkription von cFos resultiert, jedoch ist dies nicht immer der Fall. So wurden von Labiner zwar die Substantia Nigra stimuliert, es konnte jedoch kein Anstieg der cFos-Konzentration nachgewiesen werden (Labiner et al., 1993).

An dieser Stelle ist der Hinweis wichtig, dass Verhalten nicht von einzelnen Neuronenpopulationen und deren Neurotransmitter gesteuert wird. Entscheidend hierfür ist das Zusammenspiel großer neuronaler Netzwerke und Neuronen-Ensembles (Kimbrough et al., 2020). Diese Arbeit teilt das ZNS in drei funktionelle gemeinsame Gruppenmodule ein: Zunächst in das erweiterte Amygdala-Modul, dann das striatale Mittelhirn-Modul und letztlich das kortiko-hippokampo-thalamische Modul. Hier wurden Regionen identifiziert, welche eine Netzwerkdysfunktion und die funktionelle Umgestaltung verschiedener Ensembles in der Alkoholabhängigkeit steuern (Kimbrough et al., 2020).

Diese Methoden kamen auch bei Versuchen aus unserem Labor zum Einsatz. Dabei ging es um den Vergleich von Aktivierungsmustern in belohnungsrelevanten Regionen, wobei Ratten selbst zwischen Alkohol oder Saccharin entschieden haben (Wandres et al., 2021). Es hat sich gezeigt, dass natürliche und alkoholabhängige Belohnungssuche ähnliche neuronale Ensembles im Belohnungssystem des Gehirns aktivieren. Diese Ensembles zeigen jedoch unterschiedliche Ko-Aktivierungsmuster mit verschiedenen Regionen und bilden somit unterschiedliche Meta-Ensembles (Wandres et al., 2021).

Die auch in diesem Versuch verwendete Methode die cFos-Expression zu quantifizieren, ist das Zellenzählen. Hierbei wird dann in der zu untersuchenden Region eine bestimmte Fläche ausgewertet und die Ergebnisse dann, wie oben zu

sehen, in cFos-positive Nuclei / mm² angegeben. Dies setzt auf der einen Seite eine niedrige basale cFos-Expression in der Zelle und auf der anderen Seite das Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes voraus, um ein Signal zu erzeugen. Bei diesem Ansatz liefert die Fos-Bildgebung in erster Linie ein Ein/Aus-Signal und keine Information über den quantitativen Wert der Expression innerhalb einer Zelle. Veränderungen der Aktivität sind zwar experimentell zu erreichen, sie wirken sich jedoch nur auf das intrazelluläre cFos-Level aus und werden bei der Zellzählung nicht erfasst (McReynolds et al., 2018)

Pfarr et al. konnten zeigen, dass bei bestimmten Verhaltensweisen nur ca. 10% der Neuronen bei den betreffenden Hirnregionen beteiligt sind. Deshalb bedarf die Interpretation der Ergebnisse großer Vorsicht, da eine mangelnde Aktivierung in der Region nicht die verhaltensrelevante Plastizität widerspiegeln muss (Cruz et al., 2014; Pfarr et al., 2015; S. Pfarr et al., 2018).

cFos bietet im Gegensatz zur In-vivo-Elektrophysiologie und neueren In-vivo-Bildgebungsansätzen keine Echtzeit-Bewertung von Veränderungen der neuronalen Aktivität, obwohl es Informationen über Veränderungen auf zelltyp- und bahnspezifische Weise liefern kann. Da cFos in mehreren Zelltypen exprimiert wird ist es, trotz Ko-Lokalisationsstudien, nicht möglich Aussagen über die Auswirkungen der cFos-Transkription bzw. der Aktivität auf nachgeschaltete Neurone zu machen. Zum Beispiel würde die Aktivierung von GABAergen Interneuronen in einer Hirnregion ein positives cFos-Signal erzeugen, das wahrscheinlich mit einer allgemeinen Hemmung der neuronalen Ausgänge dieser Struktur verbunden wäre (McReynolds et al., 2018).

4.1.5 Methodische Stärken und Schwächen der Versuchsreihe

Die beiden im oben beschriebenen Versuch verwendeten Methoden, der Glutamatagonist auf der einen Seite und die cFos-Analyse auf der anderen, zeigen beide großes Potential. So besitzt LY379268 ein breites Wirkungsspektrum bei Störungen im Zusammenhang mit Glutamat-Neurotransmission. Die Nebenwirkungen sind gering. LY379268 und verwandte Verbindungen können als vielversprechende Mittel für pharmakologische Interventionen angesehen werden (Imre, 2007). Die cFos-Methode bietet vor allem in Kombination mit transgenen Tieren, wie z.B. cFos-lacZ

und der DaunO2 Inaktivierungsmethode, die Möglichkeit, spezifische Neuronenpopulationen bei bestimmten Verhalten zu detektieren und im Rückschluss genauere Erkenntnisse hinsichtlich belohnungsassoziierter Regionen und deren Verschaltung zu gewinnen.

Die Limitationen der vorliegenden Versuche setzten sich aus unterschiedlichen Aspekten zusammen. Zunächst ist die kleine Anzahl an Versuchstieren zu nennen. In unserem Versuch war $n=15$ und diese wurden nochmals in drei Gruppen eingeteilt. Dies schränkt die Aussagekraft der Ergebnisse ein. Des Weiteren handelte es sich für Laborratten um verhältnismäßig alte Tiere. Sie waren bei Versuchsbeginn 10 Monate alt und wurden in dieser Zeit in Käfigen zu viert im Institut für seelische Gesundheit gehalten. Die Ratten wogen im Schnitt 650-850g. Normalerweise werden deutlich jüngere Ratten mit einem Gewicht von 250-300g für Versuche in unserem und in weiteren Laboren verwendet (Meinhardt et al, 2021; Pfarr, 2019; Wandres et al., 2021). Dies führt eventuell zu einer geringeren Sensitivität gegenüber dem Glutamatagonisten. Auch wenn die Dosierungen pro Gramm Körpergewicht gewählt und somit die Dosen vergleichbar sind, so treffen diese jedoch auf neuronale Strukturen, welche mehr als doppelt so alt sind wie in vergleichbaren Versuchen.

Eine weitere Einschränkung in Hinblick auf die Generalisierbarkeit der Versuchsergebnisse besteht in der Verwendung von ausschließlich männlichen Ratten in unserem Versuch. Dieses Problem zeigt sich jedoch in vielen Tierstudien. Die Beschränkung auf männliche Versuchstiere soll den Einfluss des weiblichen Hormonhaushalts auf die Ergebnisse reduzieren (Meinhardt et al, 2021).

Eine weitere Einschränkung der Aussagekraft dieses Versuches besteht darin, dass wir sehr genau post mortem die Expression von cFos nachweisen konnten, jedoch nicht den Einfluss auf das Verhalten der Labortiere nachgewiesen haben. Dies ist prinzipiell möglich, wie schon Sommer et al. 1993 zeigen konnte. Allerdings hätte dies einen anderen Versuchsaufbau erfordert. CFos post mortem-Versuche sind im Allgemeinen in ihrer Aussagekraft eingeschränkt, weil in der Planung eine Festlegung auf bestimmte Regionen von Interesse stattfindet. Diese wird nach Fragestellung und aktuellem Wissenstand vorgenommen, birgt jedoch das Risiko unbekannte beteiligte Regionen zu übersehen. Man bemüht sich zunehmend, diese Schwäche durch neue

Versuchsanordnungen und stärker differenzierende Analysemethoden zu überwinden (Wandres et al., 2021).

4.2 Diskussion Knockdown des mGlu-2 Rezeptors

Es hat sich gezeigt, dass der präfrontale Cortex durch die Integration von neuronalen Verbindungen sowohl aus kortikalen als auch aus subkortikalen Hirnarealen in die Top-Down-Kontrolle der Informationsverarbeitung involviert ist. Diese komplexe Verschaltung macht den präfrontalen Cortex daher zu einer der komplexesten Strukturen innerhalb des Säugetiergehirns (Euston, 2012). Er ist an der Initiierung von Verhalten beteiligt, welches belohnungsabhängig gesteuert wird sowie an der Hemmung von Verhalten, welches potenziell schädlich sein könnte. Dies führt zu der Annahme, dass Alkohol wie auch andere psychoaktive Drogen die PFC-Funktion intensiv beeinflussen, indem sie kurzfristig in die Verhaltenskontrolle eingreifen, was langfristig die Entwicklung einer Drogenabhängigkeit begünstigen kann (Goldstein & Volkow, 2011). Alkoholinduzierte Veränderungen können sich auf den infralimbischen Cortex auswirken. Es hat sich gezeigt, dass infralimbische Projektionsneuronen sehr empfindlich auf eine langfristige Alkoholvergiftung reagieren und ein erhebliches Defizit des metabotropen Glutamaterezeptors 2 aufweisen (Meinhardt et al., 2013).

Hierbei gilt es einzuwenden, dass es zwar in Ratten einen infralimbischen Cortex gibt, der sich beim Menschen jedoch nicht in entsprechender Weise wiederfinden lässt. Die Region, welche beim Menschen dem infralimbischen Cortex der Ratten am ehesten entspricht ist der sogenannte subgenuale cingulate Cortex. Die zitierte Arbeit von Meinhardt zeigt jedoch, dass es sowohl bei alkoholabhängigen Ratten als auch bei alkoholabhängigen Menschen zu einem ausgeprägten mGluR-2 Defizit kommt (Meinhardt et al., 2013). Dies unterstreicht den hohen translationalen Stellenwert der Suchtforschung an Ratten, denn dieser Befund ist beim Menschen ebenfalls festzustellen.

Da dieses alkoholinduzierte Defizit des infralimbischen mGluR-2 mit dem Verlust der Kontrolle über das Alkoholkonsumverhalten, einer Hauptvoraussetzung für die Entwicklung der menschlichen Alkoholabhängigkeit verbunden war, wurde mGluR-2 als vielversprechendes Ziel für neue Medikamente vorgeschlagen. Es bleibt jedoch die

Frage offen, ob das IL-mGluR-2-Defizit nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend ist, um diesen Phänotyp zu induzieren (S. Pfarr et al., 2018). Zusätzlich zu seiner postulierten Rolle bei der Vermittlung der Kontrolle über Alkohol ist der präfrontale Cortex auch kritisch an exekutiven Funktionen wie geistiger Flexibilität, Strategiewechsel und Aufmerksamkeit beteiligt (Funahashi & Andreau, 2013).

Daher wurde ein adeno-assoziiertes Virus (AAV) konstruiert, das eine kurze Haarnadel (sh)RNA gegen mGluR-2-mRNA exprimiert. Dieses AAV wurde benutzt, um die Expression der mGluR-2-mRNA im IL von Wildtyp-Wistar-Ratten mit dem Effekt reduzierter IL mGluR-2-Expressionsstufen spezifisch herunter zu regulieren.

Eine frühere Studie aus dem gleichen Labor, in dem auch vorliegende Studie durchgeführt wurde, ergab einen Zusammenhang zwischen der Expression des infralimbischen (IL) metabotropen Glutamatrezeptors 2 (mGluR-2) und dem alkoholabhängigen Verhalten bei postdependenten (PD) Wistar-Ratten (Meinhardt et al., 2013). Es wurde festgestellt, dass bei PD-Ratten die IL- mGluR-2-mRNA-Expressionswerte nach chronischer intermittierender Alkoholdampf-Exposition und einer Periode längerer Abstinenz reduziert sind. Diese Reduktion der IL mGluR-2-mRNA war mit einer Zunahme des Abhängigkeitsverhalten verbunden. Nach der lentiviralen Wiederherstellung der mGluR-2-mRNA-Spiegels im IL von PD-Ratten, wurde die Alkoholsuche auf das Kontrollniveau normalisiert. Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen mGluR-2-Expression und Abhängigkeitsverhalten wurde in den Rattenlinien Indiana bezüglich Alkohol bevorzugend (P) und nicht bevorzugend (NP) gefunden (Ciccocioppo, 2001). Die Indiana P-Ratte trägt eine Punktmutation in der mGluR-2-Kodierungssequenz, die die funktionelle mGluR-2-Expression verhindert (Zhou et al., 2013).

In Übereinstimmung mit den bisherigen Ergebnissen führte die pharmakologische Blockade mit dem mGluR-2/3-Antagonisten LY341495 zu einer Eskalation der Alkohol-Selbstverabreichung bei Wistar-Ratten (Zhou et al., 2013). Die Behandlung mit dem mGluR-2/3-Agonisten LY379268 hat hingegen zu einem reduzierten Abhängigkeitsverhalten bei Ratten geführt (Bäckström & Hyytiä, 2005). Die oben genannten Ergebnisse deuten auf eine Rolle der mGluR-2-Expressionsstufen und -funktionen bei der Alkoholsuche hin. Während diese Studien belegen, dass das IL

mGluR-2-Defizit für übermäßiges Alkoholsuchen notwendig ist, bleibt unklar, ob ein IL mGluR-2-Defizit ausreicht, um diesen Phänotyp zu induzieren. Daher wurde ein adeno-assoziiertes Virus (AAV) konstruiert, das eine kurze Haarnadel (sh)RNA gegen mGluR-2 mRNA exprimiert.

Hierbei handelt es sich um den Nachweis der Wirksamkeit eines in unserem Labor entwickelten Adenovirusvektors. Dieser wurde so konstruiert, um mit Hilfe einer so genannten shRNA die Expression der mRNA für den mGlu-Rezeptor2 zu unterbinden. Das Virus wurde in einer stereotaktischen Operation sechs Ratten injiziert und diese anschließend dekapitiert, um mit Hilfe von Fluoreszenz in situ Hybridisation den Nachweis einer verminderten Rezeptorexpression zu erbringen.

In weiterführenden Versuchen mit diesem Virus ist es in unserem Labor gelungen die zentrale Rolle des mGluR-2 an zwei Säulen abhängigen Verhaltens nachzuweisen und zu publizieren. Die Einschränkung der kognitiven Flexibilität und der Kontrollverlust spiegeln sich auch in den Diagnosekriterien für Abhängigkeit beim Menschen DSM-V wider. Des Weiteren konnte durch einen neuronenspezifischen mGluR-2 Knockdown an Alkohol naiven Ratten, ein vergleichbares Verhalten wie bei alkoholabhängigen Ratten induziert und wieder rückgängig gemacht werden (Meinhardt et al, 2021).

4.2.1 Methodische Stärken und Schwächen

In allen Auswertungen konnte eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression des mGlu-2-Rezeptors gezeigt werden. Somit kann man davon ausgehen, dass der AAV-Vektor wirkt. Dies steht im Einklang mit den in vitro Ergebnissen aus anderen Versuchen in unserem Labor (Meinhardt et al, 2021). Die Knockdown Effizienz wurde hierbei mit 72 % angegeben. Diese wurde durch Messungen der Luciferase vermittelten Lichtemission aus infizierten HeLa-Zellen bestimmt (Román, 2016). In Vivo konnte eine Knockdown-Effizienz von 60 % im Vergleich zur Kontrollgruppe bestimmt werden. Das liegt in derselben Größenordnung, ist jedoch nicht identisch mit den Ergebnissen in vitro. Dies ist auf die zahlreichen Einflussfaktoren des in-vivo-Versuchs zurückzuführen. Gemeint sind dabei die Injektion des Virus, dem Befall der Zellen, der Verbreitung des Virus, dem Färben der Schnitte, der Aufnahme der Bilder

bis hin zu ihrer der Auswertung. Dies alles können mögliche Gründe für den Unterschied in der Knockdown Effizienz sein.

Die Herunterregulierung des mGluR-2-Proteins durch den oben dargelegten shRNA-Ansatz ist vergleichbar mit einer Studie im PL mit lentiviralen shRNA-Vektoren (Ding et al., 2017).

Alle hier gezeigten Knockdown-Daten wurden im Vergleich mit einer universellen Kontroll-shRNA (Mauceri, 2015) generiert, für die keine Ziele im Maus- oder Rattengenom bekannt sind. Der Vergleich mit shRNA, welche kein Ziel in der Zelle besitzt ist wichtig, da diese ebenfalls die gleiche enzymatische mRNA-Abbaumaschinerie induziert, einschließlich des Dicer-Enzyms und des RNA-induced silencing complex (RISC) (Moore, 2010). Der Vergleich mit Kontroll-shRNAs kann unspezifische Effekte auf das Verhalten durch die Rekrutierung der mRNA-Abbaumaschinerie aufzeigen. Mögliche Off-Target Knockdown-Effekte der mGluR-2 shRNA können nicht vollständig ausgeschlossen werden (Jackson & Linsley, 2010). Die in den zugrunde liegenden Studien verwendete shRNA-Sequenz hat jedoch wahrscheinlich keine anderen Ziele im Rattengenom, so dass Off-Target Knockdown-Effekte unwahrscheinlich sind.

Bei der Auswertung ist aufgefallen, dass der Helligkeitsunterschied zwischen den einzelnen Aufnahmen unabhängig von der Gruppe der Tiere eine große Rolle spielt. Dies ist das Ergebnis einer aufwändigen und komplizierten Aufnahmetechnik mit einem Konfokal-Mikroskop. Es ist gelungen, diese Helligkeitsunterschiede durch den GFP+/- Quotienten herauszurechnen. Dennoch stellt die Bildqualität der Aufnahmen einen großen Einflussfaktor dar.

Aus technischen Gründen konnten nicht alle vorhergesehenen Tiere für die Untersuchung genutzt werden, letztendlich standen zwei Tiere in der Knockdown- und zwei in der Kontrollgruppe zur Verfügung. Da jedoch in beiden Hemisphären das Virus injiziert wurde und da es gelang, viele Schnitte des mPFC auszuwerten, konnte trotzdem eine Anzahl von 64 Hirnschnitten ausgewertet werden. Hierbei erfolgte der signifikante Nachweis der Wirksamkeit des Virus für den Knockdown des mGlu-2 Rezeptors. Bei der Auswertung des vorliegenden Versuchs wurde die Signalintensität

der Fläche rund um den Nukleus ausgewertet und zwischen den Knockdown-Tieren und der Kontrollgruppe verglichen. Es gibt an dieser Stelle auch die Möglichkeit, einzelne Zellen zu zählen und diese miteinander zu vergleichen (Augier et al., 2018). Der Vorteil der absoluten Grauwerte ist die große Anzahl an Daten, die aus einem Bild gewonnen werden kann. Diese Menge an Daten erhöht die Validität, da in einem aufwendigen Prozess eine große Aufnahmefläche markiert wird, aus der die Informationen gewonnen werden können.

Auf molekularer Ebene ist nachgewiesen worden, dass das konstruierte Virus die erwartete Wirkung erzielt. Dies steht im Einklang mit verschiedenen anderen Experimenten, welche auf molekularer und funktionaler Ebene einen Nachweis über die Funktionalität des Virus erbracht haben (Meinhardt et al., 2021). Der Virus stellt eine effektive Option dar, die Expression des mGlu-2-Rezeptors in spezifischen Regionen des Rattenhirns zu regulieren. In unserem Versuch wird jedoch kein Nachweis über den Einfluss auf das Verhalten der Ratten erbracht.

Der Einfluss des Knockdowns auf das Verhalten wurde in unserem Labor ebenfalls untersucht (Pfarr, 2019). Hierbei kam es zu interessanten Ergebnissen. Erneut wurde der gleiche AAV-shRNA-Virus an Wistar-Wildtyp-Ratten benutzt. Es haben sich für einen generellen Knockdown des mGluR-2 keine Änderungen im Trinkverhalten gezeigt. Das beobachtete IL mGluR-2-Defizit (Meinhardt et al., 2013) wurde daraufhin getestet, ob es Auswirkungen auf das Abhängigkeitsverhalten bei Ratten hat. Dieser allgemeine Knockdown hatte jedoch keinen Einfluss auf das Verhalten bei Wildtyp-Wistar-Ratten, was darauf hinweisen könnte, dass die hemmende Kontrolle über die Alkoholaufnahme durch spezifische neuronale Subpopulationen und nicht durch einen allgemeinen hemmenden Einfluss der infralimbischen Region selbst vermittelt wird.

Oben Genanntes steht im Einklang mit weiteren Ergebnissen aus dem Labor (S. Pfarr et al., 2018), die zeigen konnten, dass eine nicht-selektive globale Inaktivierung von IL-Neuronen das Verhalten bei alkoholabhängigem Verhalten nicht beeinflusst. Alkoholabhängiges Verhalten hingegen konnte durch die spezifische Erregung von Neuronen, welche auf Alkoholreize reagieren, mit der neuartigen Daun02-Technik signifikant erhöht werden (Pfarr et al., 2015). Hierbei wird die inaktive Prodrug durch β -Galaktosidase, welche an das bakteriellen LacZ-Transgen gekoppelt ist, zu

Daunorubicin umgewandelt. Dies führt zu einer verminderten Erregbarkeit, entweder temporär durch Hemmung von Kalziumkanälen oder dauerhaft durch Induktion von Apoptose (Koya et al., 2016). Das Ausschalten spezifischer Neuronenpopulationen wird dadurch möglich. Wie immunhistochemische Untersuchungen gezeigt haben ist es hierbei von besonderer Bedeutung, dass die auf Alkoholreize reagierenden Neurone den Neurotransmitter Glutamat ausschütten.

Hier gibt es eine Übereinstimmung mit Meinhardt et al. (2013). Dieser macht deutlich, dass glutamaterge Neurone im IL sehr sensitiv auf Alkohol reagieren. Dies bestätigt den Ansatz, einen Zelltyp-spezifischen Knockdown in glutamatergen Neuronenpopulationen anzustreben. Dabei sollte vor allem die Anfälligkeit für einen Rückfall beachtet werden. Zur Untersuchung wären insbesondere solche Ratten geeignet, die nach einer Zeit des Alkoholkonsums wieder einige Zeit keinen Alkohol konsumiert haben (W. H. Sommer et al., 2008). Da Sucht und Abhängigkeit sehr komplexe Verhaltensmuster sind, gilt es nicht nur einzelne Hirnregionen zu verstehen, sondern auch die Kommunikation einzelner Regionen untereinander. Hierbei könnte die shRNA-AAV-Konstruktion eine Rolle spielen, welche durch ein Cre-loxP-Konstrukt in spezifischen Neuronenpopulationen aktiviert bzw. inaktiviert werden kann.

4.2.2 CAV2-Cre und shRNA-AAV-Kombination

Die Kombination von CAV2-Cre und shRNA-AAV fand im Labor statt. Dazu wurde einerseits der shRNA-AAV-Virus um ein cre-loxp-Konstrukt erweitert und andererseits eine Ratten-Linie benutzt, welche die cre-Rekombinase nur unter Anwesenheit eines CAMKII Promotors transkribiert. Dadurch lässt sich ein neuronenspezifischer Knockdown des mGluR-2 erreichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ein spezifischer Knockdown in glutamatergen Projektionsneuronen des IL zu einem erhöhten Abhängigkeitsverhalten führt. Dieses war im vorliegenden Versuch signifikant größer als bei der Kontrollgruppe, welche eine höhere Kontrolle über das Abhängigkeitsverhalten hatte (Pfarr, 2019). Diese Ergebnisse richten den Fokus auf eine direkte Verbindung zwischen einer Funktionseinschränkung des mGlu-2-Rezeptors in glutamatergen Projektionsneuronen des IL und einem erhöhten Abhängigkeitsverhalten. Der mGlu-2 Rezeptor hat eine autoregulatorische hemmende

Funktion auf die Glutamat-Ausschüttung am präsynaptischen axonalen Ende. Durch Defizite von mGluR-2, je nachdem ob sie durch Alkohol, Drogen oder Medikamente bedingt sind und die damit verbundene Störung der glutamatergen Neurotransmission, vermittelt der Rezeptor möglicherweise den Verlust der Kontrolle über das Abhängigkeitsverhalten. Dies könnte vor allem für glutamaterge Projektionsneuronen innerhalb des infralimbischen Cortex gelten, da der auf diese neuronale Subpopulation beschränkte mGluR-2-Knockdown eine ausgeprägte Eskalation des Abhängigkeitsverhalten zeigt.

4.2.3 Ausblick

Es bleibt die Frage offen, ob die Änderungen in der Expression des Rezeptors eher Ursache oder Folge des Alkoholmissbrauchs für das veränderte Verhalten sind. Die Tierversuche deuten in die Richtung, dass die Expression des Rezeptors wahrscheinlich die Ursache für das veränderte Verhalten ist. Dies eindeutig zu beantworten dürfte schwerfallen, da diese Region auch eine bedeutende Rolle in verschiedenen Funktionen wie Aufmerksamkeit, mentale Flexibilität und Strategieänderungen spielt (Funahashi & Andreau, 2013).

Alles in allem zeigt sich, dass es eine Beziehung zwischen einem mGlu-2 Rezeptordefizit im infralimbischen System und einem abhängigen Phänotyp bei Ratten gibt (Meinhardt et al., 2013). Bei Menschen ist der zwanghafte und übermäßige Alkoholkonsum (DSM5) ein essenzieller Bestandteil der Alkoholkrankung. Hier zeigt sich die große Relevanz der vorhergegangenen Versuche, denn in Ratten konnte dem mGlu-2-Rezeptor bei diesem Verhalten eine Rolle zugeschrieben werden. Dies könnte ein vielversprechendes Ziel zur medikamentösen Behandlung dieses Sucht aufrechterhaltenden Verhaltens bieten, um die Kontrolle über das eigene Verhalten wiederherzustellen und somit Rückfälle zu verhindern.

Hier wurde Psylocibin als interessante Zielstruktur identifiziert. Psylocibin führt zu einer Desensibilisierung von Serotoninrezeptoren (5-HT_{2A}R). Dies führt zu einer vermehrten Expression von mGluR-2 und über ihre autoregulatorische Funktion zu einer Reduktion von Glutamat im synaptischen Spalt (Marek & Schoepp, 2021). Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die Verabreichung von Psylocibin in der Lage

war, das mGluR-2-Defizit bei alkoholabhängigen Ratten zu reduzieren. Dies verringerte signifikant das Rückfallrisiko dieser Tiere (Meinhardt et al, 2021). Diese vielversprechenden Ergebnisse aus den Tiermodellen gilt es nun in klinischen Studien am Menschen zu wiederholen. Die ersten Ergebnisse zeigen vielversprechende Effekte in Bezug auf Depressionen und Alkohol Abhängigkeit (Bogenschutz et al., 2015; Davis et al., 2021)

Seit der Entdeckung belohnungsassoziierter Regionen durch Olds und Milner (Olds & Milner, 1954) vor über 60 Jahren haben sich unzählige Forschungsgruppen mit diesem zentralen Belohnungskreislauf beschäftigt, da dieser bei so grundlegenden Funktionen des biologischen Lebens wie Nahrungsaufnahme, Trinken, Sexualverhalten, mütterliche und väterliche Verhaltensweisen sowie soziale Interaktionen greift. Es wird angenommen, dass die Verstärkung, die durch eine solche normale Belohnung erzeugt wird, der Konsolidierung biologisch essenzieller Erinnerungen zugrunde liegt (Gardner, 2011). Doch nicht nur bei evolutionär bedingten alten Verhaltensweisen spielt der Belohnungskreislauf eine wichtige Rolle. Die Entstehung von Abhängigkeit durch psychotrope Substanzen beruht ebenfalls darauf.

Psychotrope Substanzen führen zu einer stärkeren Aktivierung dieses Kreislaufs, was zu einer Dysregulation der Neurotransmitter und damit zu einem wiederholten und unkontrollierten Substanzkonsum führt (Everitt & Robbins, 2005). Eine Abnahme der Funktion des neuronalen Belohnungssystems, eine Aktivierung von Stressmechanismen und ein überfunktionelles glutamaterges System schaffen die neuronale Grundlage für den Übergang von chronischem Alkoholkonsum hin zu zwanghaftem Alkoholkonsum (Vengeliene et al., 2008). Doch nicht nur bei den mittlerweile seit einiger Zeit bekannten psychotropen Substanzen spielt der Belohnungskreislauf eine zentrale Rolle.

Neue Phänomene wie Abhängigkeit gegenüber Computerspielen (Dong, Lin, Hu, Xie, & Du, 2015; Zendle & Bowden-Jones, 2019) oder dem exzessiven Nutzen sogenannter sozialen Medien, vor allem bei Heranwachsenden (Zendle & Bowden-Jones, 2019), werden mit dem belohnungsassozierten Erlernen von Verhaltensweisen in Verbindung gebracht. Somit bleibt das bessere Verständnis

einem stetigen Wandel unterworfen und darüber hinaus kommen ständig neue Themenfelder hinzu.

Die Versuche beleuchten auf dem großen Feld der Suchtforschung nur einen kleinen Bereich der Forschung. Genauer gesagt mit dem Schwerpunkt auf Tiermodellen. Doch das bessere Verständnis und das Erzeugen bessere Tiermodelle ist von essenzieller Bedeutung für das Entwickeln neuer Zielstrukturen am Menschen. Dies ist notwendig um die gesundheitlichen Folgen für jeden Einzelnen, die Belastung für das Gesundheitssystem und vor allem das Leid der Betroffenen und ihrer Angehörigen durch neue Therapiemöglichkeiten zu reduzieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit hat sich anhand von zwei verschiedenen Versuchsanordnungen mit den neurologischen Voraussetzungen und Veränderungen für das Erlernen abhängigen Verhaltens, besser gesagt mit der Entstehung von Sucht, auseinandergesetzt. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Aspekte dieser Thematik beleuchtet, welche auch in zwei separaten Versuchen angegangen wurden. Der erste Versuch untersucht das Monitoring bzw. das Kenntlichmachen der Aktivität von Neuronenpopulationen. Der zweite Versuch befasst sich mit der Manipulation der Aktivität von bestimmten Neuronenpopulationen und deren Bedeutung für das Verhalten von Ratten beim Erlernen von abhängigem Verhalten.

Begonnen haben wir mit dem Kartographie-Projekt. Hierbei wurden durch die Analyse aktiver Neuronen, nach der Injektion eines selektiven mGlu-2/3-Rezeptoragonisten in bestimmte Hirnregionen, welche bei belohnungsassoziiertem Verhalten eine zentrale Rolle spielen, die Grundlagen für die Entstehung von abhängigem Verhalten beleuchtet. Dafür wurden drei Gruppen gebildet. Eine Kontrollgruppe mit fünf Ratten und zwei Interventionsgruppen mit jeweils fünf Ratten. Den Ratten aus der Kontrollgruppe wurde eine NaCl-Lösung injiziert, den Ratten aus der Interventionsgruppe eine selektiver mGlu-2/3 Rezeptoragonist LY379268 in den Dosierungen 2ml/kg KG und 5m/kg KG. Anschließend wurden 15 Hirne mit einer Fixierungslösung perfundiert und in free floating Technik (PBS) in 60 µm dünne Coronare Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden anschließend immunhistochemisch gefärbt und in Bezug auf den Aktivitätsmarker cFos ausgewertet. Hierbei zeigte sich im Nukleus Accumbens, im medioprefrontalen Cortex und im Hippocampus eine signifikant erhöhte Aktivität. Im Thalamus kam es zu einer nicht signifikanten Steigerung und in der caudate Putamen zu einer signifikanten Abnahme der Aktivität. Weitere Versuche aus dem Labor konnten einen Bezug dieser Ergebnisse zum Verhalten und der Reaktion auf Belohnungsreize wie Saccharin sowie Ethanol feststellen. Dies zeigt die wichtige Bedeutung des Glutamathaushaltes sowie der untersuchten Hirnregionen bei der Entstehung von Sucht und abhängigem Verhalten von Ratten.

Der zweite Versuch befasst sich damit, wie das Rückfallrisiko von bereits alkoholabhängigen Ratten reduziert werden kann. Verschiedene Versuche haben den mGlu-2/3 Rezeptor als mögliche Zielstruktur identifiziert. Deshalb wurde im Labor ein

Virus entwickelt, welches zielgenau die Synthese dieses Rezeptors ausschaltet und somit auch die autoregulatorische Funktion des mGlu2/3-Rezeptors auf den Glutamathaushalt am präsynaptischen Spalt reduziert. Der signifikante Nachweis der Funktionalität dieses Virus und seine Möglichkeit den Rezeptor signifikant zu reduzieren, ist gelungen. Dies ist Teil einer Publikation zur Rolle von Psilocybin als Medikation zur Reduktion der Rückfallwahrscheinlichkeit in Rattenmodellen (Meinhardt et al, 2021). Dazu wurden sechs Ratten einer stereotaktischen Operation am Gehirn unterzogen. Hierbei wurden Dreien die aktive Form des Virus in den präfrontalen Cortex injiziert und abermals Dreien eine negative Kontrolle. Vier Wochen nach Injektion des Virus wurden die sechs Ratten dekapitiert und ihre Gehirne tiefgefroren. Die tiefgefrorenen Rattenhirne wurden mit Hilfe eines Kryostats in 20 µm dünne Scheiben geschnitten. Anschließend wurde die mRNA des mGlu-2/3-Rezeptors mit Hilfe der RNAscope Technik, einer Form der insitu-Hybridisierung, angefärbt. Bei der Auswertung konnte eine signifikante Abnahme der mRNA des mGlu-2/3 Rezeptors festgestellt werden. Dies bringt somit den Nachweis der Funktionalität des im Labor entwickelten Virus. Somit stellt dieser ein effektives Werkzeug dar, um Tiermodelle in der Suchtforschung zielgenau anzupassen. Damit wurde ein Ansatzpunkt zur medikamentösen Therapie der Suchterkrankung im Rattenmodell geschaffen (Meinhardt et al., 2021).

Der Glutamathaushalt spielt eine entscheidende Rolle im neuronalen Belohnungskreislauf bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von abhängigem Verhalten. Hier konnten wir im ersten Teil dieser Arbeit weitere wichtige Erkenntnisse zum besseren Verständnis der bei abhängigem Verhalten beteiligten Strukturen gewinnen. Der zweite Teil erbrachte den publizierten Nachweis über die Funktionalität des in unserem Labor konstruierten Virus zur Reduktion der mRNA für den mGlu-2 Rezeptor in Neuronen. Der Verlust dieses Rezeptors wird mit dem Verlust über die Kontrolle der Alkoholaufnahme und Reduktion kognitiver Flexibilität von Ratten in Verbindung gebracht. Dies stellt auch einen essenziellen Bestandteil der Suchtproblematik beim Menschen dar, welche sich in den Diagnosekriterien des DSM-V wiederfinden. Der Virus ist ein wertvolles Werkzeug in der Modulation von Tiermodellen für Alkoholabhängigkeit. Dies ermöglicht die Identifizierung neuer Ansatzpunkte in Hinblick auf eine medikamentöse Therapie von Abhängigkeit und somit zur Reduktion der soziökonomischen bzw. privaten Folgen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aschauer, D. F., Kreuz, S., & Rumpel, S. (2013). Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse brain. *PLoS One*, *8*(9), e76310. doi:10.1371/journal.pone.0076310
- Atzendorf, J., Rauschert, C., Seitz, N. N., Lochbuhler, K., & Kraus, L. (2019). The Use of Alcohol, Tobacco, Illegal Drugs and Medicines. *Dtsch Arztebl Int*, *116*(35-36), 577-584. doi:10.3238/arztebl.2019.0577
- Augier, E., Barbier, E., Dulman, R. S., Licheri, V., Augier, G., Domi, E., . . . Heilig, M. (2018). A molecular mechanism for choosing alcohol over an alternative reward. *Science*, *360*(6395), 1321-1326. doi:10.1126/science.aao1157
- Augier, E., Dulman, R. S., Rauffenbart, C., Augier, G., Cross, A. J., & Heilig, M. (2016). The mGluR2 Positive Allosteric Modulator, AZD8529, and Cue-Induced Relapse to Alcohol Seeking in Rats. *Neuropsychopharmacology*, *41*(12), 2932-2940. doi:10.1038/npp.2016.107
- Bach, P., Weil, G., Pompili, E., Hoffmann, S., Hermann, D., Vollstädt-Klein, S., . . . Sommer, W. H. (2020). Incubation of neural alcohol cue reactivity after withdrawal and its blockade by naltrexone. *Addict Biol*, *25*(1), e12717. doi:10.1111/adb.12717
- Bäckström, P., & Hyttiä, P. (2005). Suppression of alcohol self-administration and cue-induced reinstatement of alcohol seeking by the mGlu2/3 receptor agonist LY379268 and the mGlu8 receptor agonist (S)-3,4-DCPG. *Eur J Pharmacol*, *528*(1-3), 110-118. doi:10.1016/j.ejphar.2005.10.051
- Battaglia, G., Riozzi, B., Bucci, D., Di Menna, L., Molinaro, G., Pallottino, S., . . . Bruno, V. (2015). Activation of mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances GDNF and GLT-1 formation in the spinal cord and rescues motor neurons in the SOD-1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis*, *74*, 126-136. doi:10.1016/j.nbd.2014.11.012
- Benskey, M. J., Kuhn, N. C., Galligan, J. J., Garcia, J., Boye, S. E., Hauswirth, W. W., . . . Manfredsson, F. P. (2015). Targeted gene delivery to the enteric nervous system using AAV: a comparison across serotypes and capsid mutants. *Mol Ther*, *23*(3), 488-500. doi:10.1038/mt.2015.7
- Bliss, T. V., & Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, *361*(6407), 31-39. doi:10.1038/361031a0
- Bogenschutz, M. P., Forcehimes, A. A., Pommy, J. A., Wilcox, C. E., Barbosa, P. C., & Strassman, R. J. (2015). Psilocybin-assisted treatment for alcohol dependence: a proof-of-concept study. *J Psychopharmacol*, *29*(3), 289-299. doi:10.1177/0269881114565144
- Bossert, J. M., Marchant, N. J., Calu, D. J., & Shaham, Y. (2013). The reinstatement model of drug relapse: recent neurobiological findings, emerging research topics, and translational research. *Psychopharmacology (Berl)*, *229*(3), 453-476. doi:10.1007/s00213-013-3120-y
- Bundesregierung, D. D. d. (2019). Drogen- und Suchtbericht der Bundesregierung 2019. *Öffentlichkeitsarbeit der Drogenbeauftragten der Bundesregierung*.
- Burn, S. F. (2012). Detection of β -galactosidase activity: X-gal staining. *Methods Mol Biol*, *886*, 241-250. doi:10.1007/978-1-61779-851-1_21
- Choi, E. A., & McNally, G. P. (2017). Paraventricular Thalamus Balances Danger and Reward. *J Neurosci*, *37*(11), 3018-3029. doi:10.1523/jneurosci.3320-16.2017

- Ciccocioppo, R. A., S. Weiss, F. (2001). Long-lasting resistance to extinction of response reinstatement induced by ethanol-related stimuli: role of genetic ethanol preference. *Alcohol Clin Exp Res*, 25(10), 1414-1419. doi:10.1097/00000374-200110000-00002
- Cooper, S., Robison, A. J., & Mazei-Robison, M. S. (2017). Reward Circuitry in Addiction. *Neurotherapeutics*, 14(3), 687-697. doi:10.1007/s13311-017-0525-z
- Cruz, F. C., Babin, K. R., Leao, R. M., Goldart, E. M., Bossert, J. M., Shaham, Y., & Hope, B. T. (2014). Role of nucleus accumbens shell neuronal ensembles in context-induced reinstatement of cocaine-seeking. *J Neurosci*, 34(22), 7437-7446. doi:10.1523/jneurosci.0238-14.2014
- Cruz, F. C., Javier Rubio, F., & Hope, B. T. (2015). Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. *Brain Res*, 1628(Pt A), 157-173. doi:10.1016/j.brainres.2014.11.005
- Cullinan, W. E., Herman, J. P., Battaglia, D. F., Akil, H., & Watson, S. J. (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*, 64(2), 477-505. doi:10.1016/0306-4522(94)00355-9
- Czoty, P. W., Blough, B. E., Landavazo, A., & Nader, M. A. (2020). Effects of the mGluR2/3 receptor agonist LY379268 on the reinforcing strength of cocaine in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)*, 237(2), 409-417. doi:10.1007/s00213-019-05377-y
- Davis, A. K., Barrett, F. S., May, D. G., Cosimano, M. P., Sepeda, N. D., Johnson, M. W., . . . Griffiths, R. R. (2021). Effects of Psilocybin-Assisted Therapy on Major Depressive Disorder: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Psychiatry*, 78(5), 481-489. doi:10.1001/jamapsychiatry.2020.3285
- Degenhardt et al., F. C., Alize Ferrari, Damian Santomauro, Holly Erskine, Ana Mantilla-Herrera, Harvey Whiteford, Janni Leung, Mohsen Naghavi, Max Griswold, Jürgen Rehm, Wayne Hall, Benn Sartorius, James Scott, Stein Emil Vollset, Ann Kristin Knudsen, Josep Maria Haro, George Patton, Jacek Kopec, Deborah Carvalho Malta, Roman Topor-Madry, John McGrath, Juanita Haagsma, Peter Allebeck, Michael Phillips, Joshua Salomon, Simon Hay, Kyle Foreman, Stephen Lim, Ali Mokdad, Mari Smith, Emmanuela Gakidou, Christopher Murray, Theo Vos (2018). The global burden of disease attributable to alcohol and drug use in 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Psychiatry*, 5(12), 987-1012. doi:10.1016/s2215-0366(18)30337-7
- Di Chiara, G. (1999). Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol*, 375(1-3), 13-30. doi:10.1016/s0014-2999(99)00372-6
- Di Chiara, G., & Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(14), 5274-5278. doi:10.1073/pnas.85.14.5274
- Ding, Z. M., Ingraham, C. M., Hauser, S. R., Lasek, A. W., Bell, R. L., & McBride, W. J. (2017). Reduced Levels of mGlu2 Receptors within the Prelimbic Cortex Are Not Associated with Elevated Glutamate Transmission or High Alcohol Drinking. *Alcohol Clin Exp Res*, 41(11), 1896-1906. doi:10.1111/acer.13488
- Dong, G., Lin, X., Hu, Y., Xie, C., & Du, X. (2015). Imbalanced functional link between executive control network and reward network explain the online-game seeking behaviors in Internet gaming disorder. *Sci Rep*, 5, 9197. doi:10.1038/srep09197
- Dudley, R. (2000). Evolutionary origins of human alcoholism in primate frugivory. *Q Rev Biol*, 75(1), 3-15. doi:10.1086/393255

- Eckelman, W. C. (2003). The use of PET and knockout mice in the drug discovery process. *Drug Discov Today*, 8(9), 404-410. doi:10.1016/s1359-6446(03)02678-3
- Erdozain, A. M., & Callado, L. F. (2014). Neurobiological alterations in alcohol addiction: a review. *Adicciones*, 26(4), 360-370.
- Euston, D. R. G., A. J. McNaughton, B. L. (2012). The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron*, 76(6), 1057-1070. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.002
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci*, 8(11), 1481-1489. doi:10.1038/nn1579
- Funahashi, S., & Andreau, J. M. (2013). Prefrontal cortex and neural mechanisms of executive function. *J Physiol Paris*, 107(6), 471-482. doi:10.1016/j.jphysparis.2013.05.001
- Gardner, E. L. (2011). Addiction and brain reward and antireward pathways. *Adv Psychosom Med*, 30, 22-60. doi:10.1159/000324065
- Gessa, G. L. (1985). Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res*, 348(1), 201-203. doi:10.1016/0006-8993(85)90381-6
- Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2011). Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nat Rev Neurosci*, 12(11), 652-669. doi:10.1038/nrn3119
- Grant, B. F., Goldstein, R. B., Saha, T. D., Chou, S. P., Jung, J., Zhang, H., . . . Hasin, D. S. (2015). Epidemiology of DSM-5 Alcohol Use Disorder: Results From the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions III. *JAMA Psychiatry*, 72(8), 757-766. doi:10.1001/jamapsychiatry.2015.0584
- Graybiel, A. M. (2008). Habits, rituals, and the evaluative brain. *Annu Rev Neurosci*, 31, 359-387. doi:10.1146/annurev.neuro.29.051605.112851
- Graybiel, A. M., Moratalla, R., & Robertson, H. A. (1990). Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(17), 6912-6916. doi:10.1073/pnas.87.17.6912
- Grimm, J. W., Hope, B. T., Wise, R. A., & Shaham, Y. (2001). Neuroadaptation. Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature*, 412(6843), 141-142. doi:10.1038/35084134
- Groenewegen, H. J., & Berendse, H. W. (1994). The specificity of the 'nonspecific' midline and intralaminar thalamic nuclei. *Trends Neurosci*, 17(2), 52-57. doi:10.1016/0166-2236(94)90074-4
- Guez-Barber, D., Fanous, S., Golden, S. A., Schrama, R., Koya, E., Stern, A. L., . . . Hope, B. T. (2011). FACS identifies unique cocaine-induced gene regulation in selectively activated adult striatal neurons. *J Neurosci*, 31(11), 4251-4259. doi:10.1523/jneurosci.6195-10.2011
- Haber, S. N. (2016). Corticostriatal circuitry. *Dialogues Clin Neurosci*, 18(1), 7-21.
- Hamlin, A. S., Clemens, K. J., Choi, E. A., & McNally, G. P. (2009). Paraventricular thalamus mediates context-induced reinstatement (renewal) of extinguished reward seeking. *Eur J Neurosci*, 29(4), 802-812. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06623.x
- Heilig, M., Augier, E., Pfarr, S., & Sommer, W. H. (2019). Developing neuroscience-based treatments for alcohol addiction: A matter of choice? *Transl Psychiatry*, 9(1), 255. doi:10.1038/s41398-019-0591-6

- Heilig, M., Barbier, E., Johnstone, A. L., Tapocik, J., Meinhardt, M. W., Pfarr, S., . . . Sommer, W. H. (2017). Reprogramming of mPFC transcriptome and function in alcohol dependence. *Genes Brain Behav*, *16*(1), 86-100. doi:10.1111/gbb.12344
- Heinz, A., Kiefer, F., Smolka, M. N., Endrass, T., Beste, C., Beck, A., . . . Spanagel, R. (2020). Addiction Research Consortium: Losing and regaining control over drug intake (ReCoDe)-From trajectories to mechanisms and interventions. *Addict Biol*, *25*(2), e12866. doi:10.1111/adb.12866
- Hendler, R. A. R., V. A. Gilman, J. Hommer, D. W. (2013). Stimulant and sedative effects of alcohol. *Curr Top Behav Neurosci*, *13*, 489-509. doi:10.1007/7854_2011_135
- Imre, G. (2007). The preclinical properties of a novel group II metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *CNS Drug Rev*, *13*(4), 444-464. doi:10.1111/j.1527-3458.2007.00024.x
- Jackson, A. L., & Linsley, P. S. (2010). Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov*, *9*(1), 57-67. doi:10.1038/nrd3010
- Johnson, K. A., Niswender, C. M., Conn, P. J., Xiang, Z., Johnson, K. A., & Niswender, C. M. (2011). Activation of group II metabotropic glutamate receptors induces long-term depression of excitatory synaptic transmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neurosci Lett*, *504*(2), 102-106. doi:10.1016/j.neulet.2011.09.007
- Kalivas, P. W. (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat Rev Neurosci*, *10*(8), 561-572. doi:10.1038/nrn2515
- Kalivas, P. W., Lalumiere, R. T., Knackstedt, L., & Shen, H. (2009). Glutamate transmission in addiction. *Neuropharmacology*, *56 Suppl 1*(Suppl 1), 169-173. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.011
- Kalivas, P. W., & McFarland, K. (2003). Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology (Berl)*, *168*(1-2), 44-56. doi:10.1007/s00213-003-1393-2
- Kalivas, P. W., & O'Brien, C. (2008). Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology*, *33*(1), 166-180. doi:10.1038/sj.npp.1301564
- Kasof, G. M., Mandelzys, A., Maika, S. D., Hammer, R. E., Curran, T., & Morgan, J. I. (1995). Kainic acid-induced neuronal death is associated with DNA damage and a unique immediate-early gene response in c-fos-lacZ transgenic rats. *J Neurosci*, *15*(6), 4238-4249. doi:10.1523/jneurosci.15-06-04238.1995
- Kimbrough, A., Lurie, D. J., Collazo, A., Kreifeldt, M., Sidhu, H., Macedo, G. C., . . . George, O. (2020). Brain-wide functional architecture remodeling by alcohol dependence and abstinence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *117*(4), 2149-2159. doi:10.1073/pnas.1909915117
- Köbber, C., Apps, R., Bechmann, I., Lanciego, J. L., Mey, J., & Thanos, S. (2000). Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol*, *62*(4), 327-351. doi:10.1016/s0301-0082(00)00019-8
- Koya, E., Margetts-Smith, G., & Hope, B. T. (2016). Daun02 Inactivation of Behaviorally Activated Fos-Expressing Neuronal Ensembles. *Curr Protoc Neurosci*, *76*, 8.36.31-38.36.17. doi:10.1002/cpns.2
- Kurth, R., & Bannert, N. (2010). Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses. *Int J Cancer*, *126*(2), 306-314. doi:10.1002/ijc.24902
- Kutlu, M. G., & Gould, T. J. (2016). Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to

- development and maintenance of addiction. *Learn Mem*, 23(10), 515-533. doi:10.1101/lm.042192.116
- Labiner, D. M., Butler, L. S., Cao, Z., Hosford, D. A., Shin, C., & McNamara, J. O. (1993). Induction of c-fos mRNA by kindled seizures: complex relationship with neuronal burst firing. *J Neurosci*, 13(2), 744-751. doi:10.1523/jneurosci.13-02-00744.1993
- Lambeth, L. S., & Smith, C. A. (2013). Short hairpin RNA-mediated gene silencing. *Methods Mol Biol*, 942, 205-232. doi:10.1007/978-1-62703-119-6_12
- Laubach, M., Amarante, L. M., Swanson, K., & White, S. R. (2018). What, If Anything, Is Rodent Prefrontal Cortex? *eNeuro*, 5(5). doi:10.1523/eneuro.0315-18.2018
- Linden, A. M., Bergeron, M., & Schoepp, D. D. (2005). Comparison of c-Fos induction in the brain by the mGlu2/3 receptor antagonist LY341495 and agonist LY354740: evidence for widespread endogenous tone at brain mGlu2/3 receptors in vivo. *Neuropharmacology*, 49 Suppl 1, 120-134. doi:10.1016/j.neuropharm.2005.05.006
- Marek, G. J., & Schoepp, D. D. (2021). Cortical influences of serotonin and glutamate on layer V pyramidal neurons. *Prog Brain Res*, 261, 341-378. doi:10.1016/bs.pbr.2020.11.002
- Mauceri, D. H., A. M. Schramm, K. Weiss, U. Bading, H. (2015). Nuclear Calcium Buffering Capacity Shapes Neuronal Architecture. *J Biol Chem*, 290(38), 23039-23049. doi:10.1074/jbc.M115.654962
- McEntee, W. J., & Crook, T. H. (1993). Glutamate: its role in learning, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology (Berl)*, 111(4), 391-401. doi:10.1007/bf02253527
- McReynolds, J. R., Christianson, J. P., Blacktop, J. M., & Mantsch, J. R. (2018). What does the Fos say? Using Fos-based approaches to understand the contribution of stress to substance use disorders. *Neurobiol Stress*, 9, 271-285. doi:10.1016/j.ynstr.2018.05.004
- Meinhardt et al, S. P., Grégory Fouquet, Cathrin Rohleder, Manuela L. Meinhardt, Janet Barroso-Flores, Rebecca Hoffmann, Jérôme Jeanblanc, Elisabeth Paul, Konstantin Wagner, Anita C. Hansson, Georg Köhr, Nils Meier, Oliver von Bohlen und Halbach, Richard L. Bell, Heike Endepols, Bernd Neumaier, Kai Schönig, Dusan Bartsch, Mickaël Naassila, Rainer 10 Spanagel, Wolfgang H. Sommer. (2021). Psilocybin targets a common molecular mechanism for cognitive impairment and increased craving in alcoholism. *Science Advances*.
- Meinhardt, M. W., Hansson, A. C., Perreau-Lenz, S., Bauder-Wenz, C., Stahlin, O., Heilig, M., . . . Sommer, W. H. (2013). Rescue of infralimbic mGluR2 deficit restores control over drug-seeking behavior in alcohol dependence. *J Neurosci*, 33(7), 2794-2806. doi:10.1523/jneurosci.4062-12.2013
- Meinhardt, M. W., Pfarr, S., Fouquet, G., Rohleder, C., Meinhardt, M. L., Barroso-Flores, J., . . . Sommer, W. H. (2021). Psilocybin targets a common molecular mechanism for cognitive impairment and increased craving in alcoholism. *Sci Adv*, 7(47), eabh2399. doi:10.1126/sciadv.abh2399
- Meinhardt, M. W., & Sommer, W. H. (2015). Postdependent state in rats as a model for medication development in alcoholism. *Addict Biol*, 20(1), 1-21. doi:10.1111/adb.12187
- Moore, C. B. G., E. H. Huang, M. T. Taxman, D. J. (2010). Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol*, 629, 141-158. doi:10.1007/978-1-60761-657-3_10


- Moorman, D. E., James, M. H., McGlinchey, E. M., & Aston-Jones, G. (2015). Differential roles of medial prefrontal subregions in the regulation of drug seeking. *Brain Res*, *1628*(Pt A), 130-146. doi:10.1016/j.brainres.2014.12.024
- Morgan, J. I., & Curran, T. (1991). Stimulus-Transcription Coupling in the Nervous System: Involvement of the Inducible Proto-Oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience*, *14*(1), 421-451. doi:10.1146/annurev.ne.14.030191.002225
- Morishima, Y., Miyakawa, T., Furuyashiki, T., Tanaka, Y., Mizuma, H., & Nakanishi, S. (2005). Enhanced cocaine responsiveness and impaired motor coordination in metabotropic glutamate receptor subtype 2 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(11), 4170-4175. doi:10.1073/pnas.0500914102
- Moussawi, K., & Kalivas, P. W. (2010). Group II metabotropic glutamate receptors (mGlu2/3) in drug addiction. *Eur J Pharmacol*, *639*(1-3), 115-122. doi:10.1016/j.ejphar.2010.01.030
- Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., 3rd, & Strohl, W. R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs*, *31*(4), 317-334. doi:10.1007/s40259-017-0234-5
- Neumann, P. A., Wang, Y., Yan, Y., Wang, Y., Ishikawa, M., Cui, R., . . . Dong, Y. (2016). Cocaine-Induced Synaptic Alterations in Thalamus to Nucleus Accumbens Projection. *Neuropsychopharmacology*, *41*(9), 2399-2410. doi:10.1038/npp.2016.52
- Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *50*, 295-322. doi:10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533
- O'Brien, C. P. (2005). Anticraving medications for relapse prevention: a possible new class of psychoactive medications. *Am J Psychiatry*, *162*(8), 1423-1431. doi:10.1176/appi.ajp.162.8.1423
- Olds, J., & Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol*, *47*(6), 419-427. doi:10.1037/h0058775
- Olive, M. F. (2009). Metabotropic glutamate receptor ligands as potential therapeutics for addiction. *Curr Drug Abuse Rev*, *2*(1), 83-98.
- Paxinos G, W. C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th edition. San Diego: Academic Press. 4th edition. San Diego: Academic Press
- Peacock, A., Leung, J., Larney, S., Colledge, S., Hickman, M., Rehm, J., . . . Degenhardt, L. (2018). Global statistics on alcohol, tobacco and illicit drug use: 2017 status report. *Addiction*, *113*(10), 1905-1926. doi:10.1111/add.14234
- Perry, J. L., Joseph, J. E., Jiang, Y., Zimmerman, R. S., Kelly, T. H., Darna, M., . . . Bardo, M. T. (2011). Prefrontal cortex and drug abuse vulnerability: translation to prevention and treatment interventions. *Brain Res Rev*, *65*(2), 124-149. doi:10.1016/j.brainresrev.2010.09.001
- Pfarr. (2019). *The Role of the Infralimbic Prefrontal Cortex in Reward Seeking: Functional Evidence on Cellular and Molecular Mechanisms underlying Drug and Natural Reward Seeking*. (Doctor of Natural Sciences). Ruperto-Carola University of Heidelberg,
- Pfarr, Meinhardt, M. W., Klee, M. L., Hansson, A. C., Vengeliene, V., Schonig, K., . . . Sommer, W. H. (2015). Losing Control: Excessive Alcohol Seeking after Selective Inactivation of Cue-Responsive Neurons in the Infralimbic Cortex. *J Neurosci*, *35*(30), 10750-10761. doi:10.1523/JNEUROSCI.0684-15.2015

- Pfarr, S., Schaaf, L., Reinert, J. K., Paul, E., Herrmannsdörfer, F., Roßmanith, M., . . . Sommer, W. H. (2018). Choice for Drug or Natural Reward Engages Largely Overlapping Neuronal Ensembles in the Infralimbic Prefrontal Cortex. *J Neurosci*, *38*(14), 3507-3519. doi:10.1523/jneurosci.0026-18.2018
- Redgrave, P., & Gurney, K. (2006). The short-latency dopamine signal: a role in discovering novel actions? *Nat Rev Neurosci*, *7*(12), 967-975. doi:10.1038/nrn2022
- Reichardt, H. M., & Fischer, H. J. (2016). Generation of Transgenic Rats Using Lentiviral Vectors. *Methods Mol Biol*, *1304*, 25-37. doi:10.1007/7651_2014_107
- Rimondini, R., Arlinde, C., Sommer, W., & Heilig, M. (2002). Long-lasting increase in voluntary ethanol consumption and transcriptional regulation in the rat brain after intermittent exposure to alcohol. *Faseb j*, *16*(1), 27-35. doi:10.1096/fj.01-0593com
- Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev*, *18*(3), 247-291. doi:10.1016/0165-0173(93)90013-p
- Román, A. M. G. (2016). *THE EFFECT OF AAV-MEDIATED INFRALIMBIC MGLUR2 KNOCKDOWN ON ALCOHOL-SEEKING BEHAVIOR IN RATS*. (Master Degree Project in Molecular Biology Master Degree Project in Molecular Biology). University of Skoevde,
- Rose, J. E., & Woolsey, C. N. (1948). The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, *27* (1 vol.), 210-232.
- Sanchis-Segura, C., & Spanagel, R. (2006). Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addict Biol*, *11*(1), 2-38. doi:10.1111/j.1369-1600.2006.00012.x
- Schneiders, W., Niemann, G., Rammelt, S., Meyner, T., Rehberg, S., Schneiders, W., & Niemann, G. (2017). [Injuries under the influence of alcohol]. *Unfallchirurg*, *120*(7), 585-589. doi:10.1007/s00113-016-0164-6
- Schoepp, D. D. (2001). Unveiling the functions of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther*, *299*(1), 12-20.
- Sesack, S. R., & Grace, A. A. (2010). Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology*, *35*(1), 27-47. doi:10.1038/npp.2009.93
- Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, *4*(4), 477-485. doi:10.1016/0896-6273(90)90106-p
- Sommer. (2013). Pathophysiology of alcohol addiction. *Alcohol: Science, Policy and Public Health*, In: Oxford University Press;. doi:• 10.1093/acprof:oso/9780199655786.003.0010
- Sommer, W., Bjelke, B., Ganten, D., & Fuxe, K. (1993). Antisense oligonucleotide to c-fos induces ipsilateral rotational behaviour to d-amphetamine. *Neuroreport*, *5*(3), 277-280. doi:10.1097/00001756-199312000-00024
- Sommer, W., & Fuxe, K. (1997). On the role of c-fos expression in striatal transmission. The antisense oligonucleotide approach. *Neurochem Int*, *31*(3), 425-436. doi:10.1016/s0197-0186(96)00112-x
- Sommer, W. H., Rimondini, R., Hansson, A. C., Hipskind, P. A., Gehlert, D. R., Barr, C. S., & Heilig, M. A. (2008). Upregulation of voluntary alcohol intake, behavioral sensitivity to stress, and amygdala crhr1 expression following a history of dependence. *Biol Psychiatry*, *63*(2), 139-145. doi:10.1016/j.biopsych.2007.01.010

- Spanagel, R. (2009). Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior. *Physiol Rev*, 89(2), 649-705. doi:10.1152/physrev.00013.2008
- Spanagel, R. (2010). Are metabotropic glutamate receptors promising targets for the treatment of alcoholism? *Biological Psychiatry*, 67(9), 798-799. doi:10.1016/j.biopsych.2010.03.003
- Spanagel, R. (2017). Animal models of addiction. *Dialogues Clin Neurosci*, 19(3), 247-258.
- Spanagel, R., & Weiss, F. (1999). The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci*, 22(11), 521-527. doi:10.1016/s0166-2236(99)01447-2
- Spanagel, R., Zink, M., & Sommer, W. H. (2016). Alcohol: Neurobiology of Alcohol Addiction. In D. W. Pfaff & N. D. Volkow (Eds.), *Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical* (pp. 3593-3623). New York, NY: Springer New York.
- Swift, R. M. (1999). Medications and alcohol craving. *Alcohol Res Health*, 23(3), 207-213.
- Teyler, T. J., & DiScenna, P. (1987). Long-term potentiation. *Annu Rev Neurosci*, 10, 131-161. doi:10.1146/annurev.ne.10.030187.001023
- Uylings, H. B., Groenewegen, H. J., & Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res*, 146(1-2), 3-17. doi:10.1016/j.bbr.2003.09.028
- Vengeliene, V., Bilbao, A., Molander, A., & Spanagel, R. (2008). Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol*, 154(2), 299-315. doi:10.1038/bjp.2008.30
- Vengeliene, V., Bilbao, A., & Spanagel, R. (2014). The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: a comparison between rats and mice. *Alcohol*, 48(3), 313-320. doi:10.1016/j.alcohol.2014.03.002
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Shokri Kojori, E., Fowler, J. S., Benveniste, H., & Tomasi, D. (2015). Alcohol decreases baseline brain glucose metabolism more in heavy drinkers than controls but has no effect on stimulation-induced metabolic increases. *J Neurosci*, 35(7), 3248-3255. doi:10.1523/jneurosci.4877-14.2015
- Vonghia, L., Leggio, L., Ferrulli, A., Bertini, M., Gasbarrini, G., & Addolorato, G. (2008). Acute alcohol intoxication. *Eur J Intern Med*, 19(8), 561-567. doi:10.1016/j.ejim.2007.06.033
- Walker, A. G., Wenthur, C. J., Xiang, Z., Rook, J. M., Emmitte, K. A., Niswender, C. M., . . . Conn, P. J. (2015). Metabotropic glutamate receptor 3 activation is required for long-term depression in medial prefrontal cortex and fear extinction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(4), 1196-1201. doi:10.1073/pnas.1416196112
- Wandres, M., Pfarr, S., Molnár, B., Schöllkopf, U., Ercsey-Ravasz, M., Sommer, W. H., & Körber, C. (2021). Alcohol and sweet reward are encoded by distinct meta-ensembles. *Neuropharmacology*, 108496. doi:10.1016/j.neuropharm.2021.108496
- Willcocks, A. L., & McNally, G. P. (2013). The role of medial prefrontal cortex in extinction and reinstatement of alcohol-seeking in rats. *Eur J Neurosci*, 37(2), 259-268. doi:10.1111/ejn.12031
- Wilson, S. J., Sayette, M. A., & Fiez, J. A. (2004). Prefrontal responses to drug cues: a neurocognitive analysis. *Nat Neurosci*, 7(3), 211-214. doi:10.1038/nn1200
- Wolffgramm, J., & Heyne, A. (1995). From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. *Behav Brain Res*, 70(1), 77-94. doi:10.1016/0166-4328(95)00131-c

- Xu, P., Chen, A., Li, Y., Xing, X., & Lu, H. (2019). Medial prefrontal cortex in neurological diseases. *Physiol Genomics*, 51(9), 432-442. doi:10.1152/physiolgenomics.00006.2019
- Yang, H. J., Zhang, H. Y., Bi, G. H., He, Y., Gao, J. T., & Xi, Z. X. (2017). Deletion of Type 2 Metabotropic Glutamate Receptor Decreases Sensitivity to Cocaine Reward in Rats. *Cell Rep*, 20(2), 319-332. doi:10.1016/j.celrep.2017.06.046
- Zendle, D., & Bowden-Jones, H. (2019). Is excessive use of social media an addiction? *Bmj*, 365, l2171. doi:10.1136/bmj.l2171
- Zhao, Y., Dayas, C. V., Aujla, H., Baptista, M. A., Martin-Fardon, R., & Weiss, F. (2006). Activation of group II metabotropic glutamate receptors attenuates both stress and cue-induced ethanol-seeking and modulates c-fos expression in the hippocampus and amygdala. *J Neurosci*, 26(39), 9967-9974. doi:10.1523/jneurosci.2384-06.2006
- Zhou, Z. F., Karlsson, C., Liang, T. B., Xiong, W., Kimura, M., Tapocik, J. D., . . . Goldman, D. (2013). Loss of metabotropic glutamate receptor 2 escalates alcohol consumption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(42), 16963-16968. doi:10.1073/pnas.1309839110

7 TABELLARISCHER ANHANG



Baden-Württemberg
REGIERUNGSPRÄSIDIUM KARLSRUHE
ABTEILUNG 3 - LANDWIRTSCHAFT, LÄNDLICHER RAUM, VETERINÄR- UND LEBENSMITTELWESEN

Regierungspräsidium Karlsruhe · 76247 Karlsruhe

Karlsruhe 06.10.2015
Name Ute Corcilus
Durchwahl 0721 926-4319
Aktenzeichen 35-9185.81/G-30/15
(Bitte bei Antwort angeben)

Zentralinstitut für Seelische Gesundheit
Institut für Psychopharmakologie
z.H. Herrn Prof. Dr. Rainer Spanagel
J 5
68159 Mannheim

Kassenzeichen (Bitte bei Zahlung angeben):	
	1511220010068
BW Bank • BLZ 600 501 01 • Kto-Nr. 749 55301 02	
IBAN: DE02 6005 0101 7495 5301 02 • BIC: SOLADEST600	
Betrag:	339,00 EUR

 Tierschutz;
- Genehmigung von Versuchsvorhaben an lebenden Wirbeltieren
Ihr Antrag vom 26.01.2015; Ihr Schreiben vom 27.04.2015,
e-Mail vom 18.08.2015

Anlagen
1 Überweisungsträger

Sehr geehrte Damen und Herren,
sehr geehrter Herr Prof. Dr. Spanagel,

auf Ihren o.g. Antrag auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens erlassen wir
folgenden

Bescheid:

1. Das Tierversuchsvorhaben mit der Bezeichnung

„Belohnungsbezogenes Lernen“

- Leiter: Prof. Dr. Rainer Spanagel
- Stellvertreterin: Dr. Valentina Vengeliene
- Tierzahl/Tierart: 484 Ratten
- Ort: Institut für Psychopharmakologie
- Dauer: bis zum 31.10.2020

wird genehmigt.

Dienstgebäude Schlossplatz 4-6 · 76131 Karlsruhe · Telefon 0721 926 0 · Fax 0721 926 3801
abteilung3@rpk.bwl.de · www.rp.baden-wuerttemberg.de · www.service-bw.de
ÖPNV Haltestellen Marktplatz und Kronenplatz · Parkmöglichkeit Schlossplatz Tiefgarage

- Übersicht der Ergebnisse des mGlu2 Rezeptor Knockdowns

	MGlu2	GFP	SEM	Mittelwert Quotient	Mittelwert mGlu2	
403-13	48.165	40.086	1,20154169			
403-121	51.434	44.688	1,15095775			
403-219	51.684	46.103	1,12105503	1,18148449	56.737	
403-39	75.664	60.416	1,25238347			
407-115	23.724	15.835	1,49820019	1,194162		46.609
407-118	52.565	37.996	1,3834351			
407-25	20.996	14.889	1,41016858	1,20683853	36.482	
407-217	23.418	20.564	1,13878623			
407-33	54.130	52.953	1,02222726			
407-316	44.058	55.896	0,78821383			
408-14	6.341	7.176	0,88363991			
408-115	15.762	13.658	1,15404891			
408-26	21.064	22.685	0,92854309	0,89109303	14.072	16.961
408-216	13.122	21.938	0,59814021			
412-112	9.019	13.448	0,67065735	0,95157708		ttest übersicht
412-134	24.733	18.393	1,34469635			0,09420767
412-26	25.484	18.590	1,37084454	1,01206113	19.851	ttest quotient
412-217	37.560	41.027	0,91549467			0,0083828
412-35	12.824	15.375	0,8340813			
412-318	9.483	10.125	0,93659259			

- Übersicht Ergebnisse des cFos-Mapping nach mGlu2-Rezeptoragonisten Injektion

Tier	cFos Nuclei	Mittelwert	SEM
3l1-5mg	13	21,25	3,02851036
3l2	30		
3r1	20		
3r2	22		
4l1-2mg	24	19	2,15058132
4l2	22		
4r1	13		
4r2	17		
5l1-5	8	13,75	2,19017693
5l2	12		
5r1	20		
5r2	15		
6l1-VEH	16	20,25	1,74553001
6l2	25		
6r1	22		
6r2	18		
7l1-2mg	24	20,75	1,192424
7l2	18		
7r1	19		
7r2	22		
8l1-VEH	5	8,5	1,52069063
8l2	6		
8r1	11		
8r2	12		
9l1-5mg			
9l2			
9r1			
9r2			
10l1-2mg	25	23,5	2,01556444
10l2	29		
10r1	18		
10r2	22		
11l1-5mg	5	9	1,45773797
11l2	8		
11r1	13		
11r2	10		
12l1-VEH	34	39,25	3,43465792
12l2	31		
12r1	47		
12r2	45		
13l1-2mg	14	17,75	2,38156986

Tier	cFos Nuclei	Mittelwert	SEM
13l2	25		
13r1	13		
13r2	19		
14l1-5mg			
14l2			
14r1			
14r2			
15l1-VEH	41	40	2,0310096
15l2	38		
15r1	35		
15r2	46		
	VEH	27	2,18297204
	2mg	20,25	1,9350349
	5mg	14,6666667	2,22547509

Nukleus Accumbens

Tier	cFos Nuclei	Mittelwert	SEM
3l1-5mg	74	76,75	8,85561263
3l2	106		
3r1	68		
3r2	59		
4l1-2mg	57	60,25	5,60552183
4l2	78		
4r1	47		
4r2	59		
5l1-5	43	38,5	2,07665597
5l2	33		
5r1	42		
5r2	36		
6l1-VEH	25	25,25	1,43069039
6l2	26		
6r1	21		
6r2	29		
7l1-2mg	85	82	2,47487373
7l2	82		
7r1	74		
7r2	87		
8l1-VEH	37	33,25	2,70127285
8l2	39		
8r1	25		
8r2	32		
9l1-5mg			
9l2			
9r1			

Tier	cFos Nuclei	Mittelwert	SEM
10I1-2mg	57	65	4,43001129
10I2	80		
10r1	62		
10r2	61		
11I1-5mg	75	72	3,48209707
11I2	61		
11r1	72		
11r2	80		
12I1-VEH	40	40,75	5,23659002
12I2	24		
12r1	48		
12r2	51		
13I1-2mg	54	62,5	2,86138079
13I2	70		
13r1	62		
13r2	64		
14I1-5mg			
14I2			
14r1			
14r2			
15I1-VEH	38	37,5	3,40036763
15I2	46		
15r1	27		
15r2	39		
	VEH	34,1875	3,19223022
	2mg	67,4375	3,84294691
	5mg	62,4166667	4,80478855

Medialer Präfrontaler Cortex

Tier	cFos Nuclei	Mittelwert	SEM
3I1-5mg	153	142,75	3,61204582
3I2	135		
3r1	137		
3r2	146		
4I1-2mg	96	103,25	6,5705308
4I2	86		
4r1	120		
4r2	111		
5I1-5	85	87	2,23606798
5I2	81		
5r1	93		
5r2	89		
6I1-VEH	64	57	5,66789202
6I2	67		
6r1	59		
6r2	38		

Tier	cFos Nuclei	Mittelwert	SEM
7I1-2mg	51	52	1,45773797
7I2	48		
7r1	56		
7r2	53		
8I1-VEH	63	61,5	1,92028644
8I2	59		
8r1	67		
8r2	57		
9I1-5mg	154	142,5	4,85412196
9I2	149		
9r1	138		
9r2	129		
10I1-2mg	104	85,5	5,36772764
10I2	81		
10r1	78		
10r2	79		
11I1-5mg	145	116,5	8,76427407
11I2	115		
11r1	108		
11r2	98		
12I1-VEH	34	37,25	4,64186116
12I2	53		
12r1	29		
12r2	33		
13I1-2mg	118	122,25	9,49588727
13I2	93		
13r1	137		
13r2	141		
14I1-5mg			
14I2			
14r1			
14r2			
15I1-VEH	68	72,75	1,6345871
15I2	72		
15r1	77		
15r2	74		
	VEH	57,125	3,46615668
	2mg	90,75	5,72297092
	5mg	122,1875	4,86662746

Hippocampus

Tier	cFos Nuclei	Mittelwert	SEM
3l1-5mg	19	21,25	0,96014322
3l2	24		
3r1	22		
3r2	20		
4l1-2mg	12	14	0,79056942
4l2	13		
4r1	16		
4r2	15		
5l1-5	17	32	5,90550591
5l2	24		
5r1	42		
5r2	45		
6l1-VEH	11	12,75	0,73950997
6l2	12		
6r1	13		
6r2	15		
7l1-2mg	19	16,25	1,08253175
7l2	16		
7r1	17		
7r2	13		
8l1-VEH	9	13,25	1,74553001
8l2	11		
8r1	15		
8r2	18		
9l1-5mg	13	11,5	0,55901699
9l2	11		
9r1	10		
9r2	12		
10l1-2mg	18	22,75	2,76981498
10l2	32		
10r1	22		
10r2	19		
11l1-5mg	12	23	3,82426464
11l2	21		
11r1	33		
11r2	26		
12l1-VEH	13	18,25	2,21852992
12l2	25		
12r1	19		
12r2	16		
13l1-2mg	7	9,25	1,43069039
13l2	6		
13r1	13		
13r2	11		
14l1-5mg			

Tier	cFos Nuclei	Mittelwert	SEM
14l2			
14r1			
14r2			
15l1-VEH	14	15,75	1,192424
15l2	13		
15r1	17		
15r2	19		
	VEH	15	1,47399847
	2mg	15,5625	1,51840163
	5mg	21,9375	2,81223269

Thalamus

Tier	cFos Nuclei	Mittelwert	SEM
3l1-5mg	83	100	10,3621909
3l2	76		
3r1	123		
3r2	118		
4l1-2mg	74	74,25	1,81572988
4l2	80		
4r1	70		
4r2	73		
5l1-5	81	79	2,71569512
5l2	86		
5r1	78		
5r2	71		
6l1-VEH	42	41	2,29128785
6l2	38		
6r1	48		
6r2	36		
7l1-2mg	58	63,25	3,48882143
7l2	55		
7r1	68		
7r2	72		
8l1-VEH	41	50,75	4,29207118
8l2	44		
8r1	62		
8r2	56		
9l1-5mg	57	55,5	1,14564392
9l2	52		
9r1	55		
9r2	58		
10l1-2mg	66	71	2,20794022
10l2	69		
10r1	71		

Tier	cFos Nuclei	Mittelwert	SEM
10r2	78		
11l1-5mg	53	59,5	2,25
11l2	58		
11r1	62		
11r2	65		
12l1-VEH	46	43,75	1,98037244
12l2	47		
12r1	45		
12r2	37		
13l1-2mg	71	72	2,5
13l2	65		
13r1	73		
13r2	79		
14l1-5mg			
14l2			
14r1			
14r2			
15l1-VEH	74	79,25	1,98037244
15l2	78		
15r1	80		
15r2	85		
	VEH	57,9166667	2,63602598
	2mg	70,125	2,50312288
	5mg	73,5	4,11838248

• Perfusions- und Gewichtsprotokoll des cFos Mapping

	<i>Injektion</i>	Weight	Treatment	Agonist Menge			
Uhrzeit				in mg			
08.00	C5/1	773,3	Veh				
15	C5/2	705,9	2	1,4118			
30	C5/3	658,7	5	3,2935			
45	C5/4	691,14	2	1,38228			
09.00	C6/1	703	2	1,406			
15	C6/2	677,5	5	3,3875	Uhrzeit	<i>Perfusion</i>	Reihenfolge
30	C6/3	817,6	Veh		"9.30"	C5/1	1
45	C7/1	681,9	5	3,4095	"9.45"	C5/2	2
10.00	C7/2	726,3	2	1,4526	10.00	C5/3	3
15	C7/3	750,9	Veh		15	C5/4	4
30	C7/4	813,5	Veh		30	C6/1	5
45	C8/1	662,1	5	3,3105	45	C6/2	6
11.00	C8/2	694,5	5	3,4725	11.00	C6/3	7
15	C8/3	806,3	Veh		15	C7/1	8
30	C8/4	708,6	2	1,4172	30	C7/2	9
					45	C7/3	10
					12.00	C7/4	11
					15	C8/1	12
					30	C8/2	13
					45	C8/3	14
					13.00	C8/4	15

- Statistische Analyse der c-Foss Ergebnisse nach Regionen

- Caudate Putamen

treatment; Weighted Means (Konstantinklein) Current effect: F(2, 12)=3,2972, p=,07224 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	treatment	cpu Mean	cpu Std.Err.	cpu -95,00%	cpu +95,00%	N
1	0	27,3000	5,952625	10,77286	43,82714	5
2	1	19,8500	1,044625	16,94964	22,75036	5
3	2	13,9500	2,048475	8,26252	19,63748	5

Univariate Tests of Significance for cpu (Konstantinklein) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	6222,017	1	6222,017	91,67720	0,000001
treatment	447,558	2	223,779	3,29723	0,072241
Error	814,425	12	67,869		

Tests of Homogeneity of Variances (Konstantinklein) Effect: "treatment"					
	Hartley F-max	Cochran C	Bartlett Chi-Sqr.	df	p
cpu	32,47075	0,870154	9,846841	2	0,007274

Levene's Test for Homogeneity of Variances (Konstantinklein) Effect: "treatment" Degrees of freedom for all F's: 2, 12				
	MS Effect	MS Error	F	p
cpu	106,1407	18,08975	5,867448	0,016702

- Medialer präfrontaler Cortex

Univariate Tests of Significance for mPfc (Konstantinklein) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	121995,5	1	121995,5	266,4809	0,000015
treatment	11326,6	2	5663,3	12,3706	0,001214
Error	5493,6	12	457,8		

treatment; Weighted Means (Konstantinklein) Current effect: F(2, 12)=12,371, p=,00121 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	treatment	mPfc Mean	mPfc Std.Err.	mPfc -95,00%	mPfc +95,00%	N
1	0	56,2000	5,81130	40,06523	72,3348	5
2	1	90,8500	11,57114	58,72337	122,9766	5
3	2	123,5000	10,34499	94,77771	152,2222	5

LSD test; variable mPfc (Konstantinklein) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 457,80, df = 12,000				
Cell No.	treatment	{1} 56,200	{2} 90,850	{3} 123,50
1	0		0,024976	0,000323
2	1	0,024976		0,032747
3	2	0,000323	0,032747	

Dunnett test; variable mPfc (Konstantinklein) Probabilities for Post Hoc Tests (2-sided) Error: Between MS = 457,80, df = 12,000		
Cell No.	treatment	{1} 56,200
1	0	
2	1	0,045060
3	2	0,000624

○ Hippocampus

treatment; Weighted Means (Konstantinklein) Current effect: F(2, 12)=3,7124, p=,05558 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	treatment	Hippo Mean	Hippo Std.Err.	Hippo -95,00%	Hippo +95,00%	N
1	0	14,45000	1,124722	11,32727	17,57273	5
2	1	15,70000	2,177154	9,65525	21,74475	5
3	2	23,25000	3,508917	13,50768	32,99232	5

Dunnett test; variable Hippo (Konstantinklein) Probabilities for Post Hoc Tests (2-sided) Error: Between MS = 30,529, df = 12,000		
Cell No.	treatment	{1} 14,450
1	0	
2	1	0,911821
3	2	0,048610

○ Thalamus

Univariate Tests of Significance for Thal (Konstantinklein) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	65902,20	1	65902,20	349,5211	0,000031
treatment	1185,01	2	592,50	3,1424	0,079899
Error	2262,60	12	188,55		

treatment; Weighted Means (Konstantinklein) Current effect: F(2, 12)=3,1424, p=,07990 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	treatment	Thal Mean	Thal Std.Err.	Thal -95,00%	Thal +95,00%	N
1	0	53,85000	6,79089	34,9954	72,7045	5
2	1	70,90000	2,00717	65,3271	76,4728	5
3	2	74,10000	7,93630	52,0652	96,1347	5

Dunnett test; variable Thal (Konstantinklein) Probabilities for Post Hoc Tests (2-sided) Error: Between MS = 188,55, df = 12,000		
Cell No.	treatment	{1} 53,850
1	0	
2	1	0,127544
3	2	0,06768

o Nucleus accumbens

Univariate Tests of Significance for acb (Konstantinklein) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	44908,70	1	44908,70	408,5860	0,000010
treatment	3285,16	2	1642,58	14,9444	0,000553
Error	1318,95	12	109,91		

treatment; Weighted Means (Konstantinklein) Current effect: F(2, 12)=14,944, p=,00055 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	treatment	acb Mean	acb Std.Err.	acb -95,00%	acb +95,00%	N
1	0	33,90000	2,61199	26,6479	41,1520	5
2	1	67,00000	3,85924	56,2850	77,7149	5
3	2	63,25000	6,65065	44,7848	81,7151	5

LSD test; variable acb (Konstantinklein) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 109,91, df = 12,000				
Cell No.	treatment	{1} 33,900	{2} 67,000	{3} 63,250
1	0		0,000313	0,00082
2	1	0,000313		0,582114
3	2	0,00082	0,582114	

Dunnett test; variable acb (Konstantinklein) Probabilities for Post Hoc Tests (2-sided) Error: Between MS = 109,91, df = 12,000		
Cell No.	treatment	{1} 33,900
1	0	
2	1	0,000605
3	2	0,001571

- Copyright der dargestellten Abbildungen

Abbildung 1

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 25, 2022

This Agreement between University of Heidelberg -- Konstantin Wagner ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5395920216705
License date	Sep 25, 2022
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	European Journal of Pharmacology
Licensed Content Title	Group II metabotropic glutamate receptors (mGlu2/3) in drug addiction
Licensed Content Author	Khaled Moussawi, Peter W. Kalivas
Licensed Content Date	Aug 10, 2010
Licensed Content Volume	639
Licensed Content Issue	1-3
Licensed Content Pages	8
Start Page	115
End Page	122
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Die Rolle des mGlu-2/3 Rezeptors im Belohnungssystem und dessen Einfluss auf Suchtverhalten
Institution name	Medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität zu Heidelberg
Expected presentation date	Jun 2023
Portions	Figure 1
Requestor Location	University of Heidelberg Lenuastrße 36 Mannheim, 68167 Germany Attn: University of Heidelberg GB 494 6272 12
Publisher Tax ID	
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

Abbildung 2.



Deletion of Type 2 Metabotropic Glutamate Receptor Decreases Sensitivity to Cocaine Reward in Rats
Author: Hong-Ju Yang, Hai-Ying Zhang, Guo-Hua Bi, Yi He, Jun-Tao Gao, Zheng-Xiong Xi
Publication: CELL REPORTS
Publisher: Elsevier
Date: 11 July 2017
Copyright © 2017, Elsevier

Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivatives License (CC BY NC ND)

This article is published under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivatives License \(CC BY NC ND\)](#). For non-commercial purposes you may copy and distribute the article, use portions or extracts from the article in other works, and text or data mine the article, provided you do not alter or modify the article without permission from Elsevier. You may also create adaptations of the article for your own personal use only, but not distribute these to others. You must give appropriate credit to the original work, together with a link to the formal publication through the relevant DOI, and a link to the Creative Commons user license above. If changes are permitted, you must indicate if any changes are made but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use of the work.

Permission is not required for this non-commercial use. For commercial use please continue to request permission via RightsLink.

Abbildung 3.

Article Information

DOI <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0315-18.2018>

PubMed [30406193](#)

Published By [Society for Neuroscience](#)

History Received August 13, 2018
Revision received October 5, 2018
Accepted October 9, 2018
Published online October 18, 2018.

Copyright & Usage Copyright © 2018 Laubach et al.
This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](#), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

8 VERÖFFENTLICHUNG

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgendem Aufsatz vorab publiziert

1. Meinhardt, M. W., Pfarr, S., Fouquet, G., Rohleder, C., Meinhardt, M. L., Barroso-Flores, J., Hoffmann, R., Jeanblanc, J., Paul, E., Wagner, K., Hansson, A. C., Köhr, G., Meier, N., von Bohlen Und Halbach, O., Bell, R. L., Endepols, H., Neumaier, B., Schönig, K., Bartsch, D., Naassila, M., Sommer, W. H. (2021). Psilocybin targets a common molecular mechanism for cognitive impairment and increased craving in alcoholism. *Science advances*, 7(47), eabh2399. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh2399>

9 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Wagner, Konstantin
Geburtsdatum: 19.08.1992
Geburtsort: Mannheim
Familienstand: ledig
Vater: Dr. Martin Wagner
Mutter: Dr. Barbara Herrmann-Wagner

SCHULISCHER WERDEGANG

1999-2003 Grundschule Großsachsen
2003-2012 Werner-Heisenberg-Gymnasium Weinheim
14.06.2012 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2013 Beginn des Studiums Humanmedizin
An der Universität Ruprecht – Karls Universität Heidelberg
05.09.2015 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
2015-2019 Hauptstudium, Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
2019-2020 Praktisches Jahr
16.06.2020 Staatsexamen (M3)
13.07.2020 Erhalt der Approbation als Arzt

10 DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Rainer Spanagel sowie Prof. Dr. Wolfgang Sommer für die Möglichkeit bedanken, am Institut für Psychopharmakologie des Zentralinstituts für Seelische Gesundheit in Mannheim zu forschen.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Wolfgang Sommer für ein faszinierendes Forschungsthema, für die ständige Unterstützung mit technischem und theoretischem Wissen sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Die Betreuung über all die Jahre war hervorragend und ich habe mich über den Zeitraum dieser Dissertation am Institut gut aufgehoben gefühlt.

Simone Pfarr war eine kompetente und zuverlässige Betreuerin, ohne die ich mich in der neuen Umgebung eines großen Labors und in einer völlig neuen Welt außerhalb der Universität bzw eines Krankenhauses nicht zurechtgefunden hätte. Mit ihr ist es gelungen jedes noch so komplizierte Protokoll erfolgreich zu bewältigen.

Vielen Dank an Elisabeth Röbel für die technische und moralische Unterstützung während der Versuche im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und Freunden, welche mich uneingeschränkt unterstützt und durch die Höhen und Tiefen dieser Dissertation begleitet haben. Gewidmet ist diese Dissertation denjenigen die die Veröffentlichung nicht mehr miterleben dürfen.