

Aus dem Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Versuchstierkunde  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der  
Freien Universität Berlin

**Wirkung der transkraniellen magnetisch applizierten  
intermittierenden Theta-Burst Stimulation auf die  
Entwicklung eines psychiatrischen Phänotyps im  
Rattenmodell maternaler Immunstimulation**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Nadine Rittweger**  
Tierärztin aus Neustadt an der Waldnaab

Berlin 2019  
Journal-Nr.: 4128







Aus dem Institut für Tierschutz, Tierverhalten und Versuchstierkunde  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der  
Freien Universität Berlin

**Wirkung der transkraniellen magnetisch applizierten  
intermittierenden Theta-Burst Stimulation auf die Entwicklung eines  
psychiatrischen Phänotyps im Rattenmodell maternaler  
Immunstimulation**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Nadine Rittweger  
Tierärztin  
aus Neustadt an der Waldnaab

Berlin 2019

Journal-Nr.: 4128

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Christa Thöne-Reineke  
Zweiter Gutachter: Prof. apl. Dr. Klaus Funke  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Bäumer

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):  
rats, animal models, schizophrenia, animal behaviour, transcranial magnetic  
stimulation (MeSH), immunohistochemistry*

Tag der Promotion: 11.07.2019

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-994-5

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2019**

Dissertation, Freie Universität Berlin  
**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2019 Choriner Str. 85 - 10119 Berlin  
verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>1. <u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
1.1. Schizophrenie	1
1.1.1. Ursachen	1
1.1.2. Symptome	2
1.1.3. Verlauf	3
1.1.4. Behandlung	3
1.1.5. Makro- und Mikroskopische Auffälligkeiten im Gehirn	4
1.1.6. Aktivitätsmarker	6
1.2. Poly(I:C)-Tiermodell für die Schizophrenie des Menschen	8
1.2.1. Wirkungsweise der Poly(I:C)	8
1.2.2. Makro- und Mikroskopische Auffälligkeiten im Gehirn	9
1.2.3. Auffälligkeiten im Verhalten	9
1.2.4. Beurteilung des Schizophreniemodells	10
1.3. Transkranielle Magnetstimulation (TMS)	12
1.3.1. Geschichte	12
1.3.2. Physikalische Grundlagen	13
1.3.3. Aufbau des Stimulators	13
1.3.4. Stimulationsspulen	14
1.3.5. Repetitive transkranielle Magnetstimulation	15
1.3.6. Anwendung der TMS	15
1.3.7. Nebenwirkungen	16
1.3.8. Zelluläre Wirkung	17
1.4. Ziel der Arbeit	18
<b>2. <u>Material und Methoden</u></b>	<b>19</b>
2.1. Ethikstatement	19
2.2. Studiendesign	19
2.3. Versuchstiere und Gruppen	20
2.4. Poly(I:C)-Injektion	20
2.5. Intermittierende Theta-Burst-Stimulation	20
2.6. Verhaltensversuche	21
2.6.1. Elevated Plus Maze (EPM)	21
2.6.2. Novel Object Recognition (NOB)	21
2.6.3. Porsolt Forced Swim Test (PF)	22
2.6.4. Morris Water Maze (WM)	22
2.6.5. Sucrose Consumption Test (SC)	23
2.6.6. Pre-Pulse Inhibition Test (PPI)	23
2.7. Perfusion	24
2.8. Histologie	24
2.8.1. Nissl Färbung	24
2.8.2. Untersuchte Gehirnregionen	25
2.8.3. Immunhistochemie	29
2.9. Auswertung	30
2.9.1. Mikroskopie	30
2.9.2. Zellzählung	30
2.9.3. Messung der optischen Dichte	30
2.9.4. Statistik	30

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1. Ergebnisse der Verhaltensversuche	32
3.1.1. Ergebnisse Elevated Plus Maze	32
3.1.2. Ergebnisse Novel Object Recognition	32
3.1.3. Ergebnisse Porsolt Forced Swim Test	33
3.1.4. Ergebnisse Morris Water Maze	34
3.1.4.1. Gesamtzeit	34
3.1.4.1.1. Nach Tagen	34
3.1.4.1.2. Nach Trials	36
3.1.4.2. Zurückgelegte Strecke	37
3.1.4.2.1. Nach Tagen	37
3.1.4.2.2. Nach Trials	39
3.1.4.3. Durchschnittsgeschwindigkeit	39
3.1.4.3.1. Nach Tagen	39
3.1.4.3.2. Nach Trials	40
3.1.4.4. Durchschnittsabstand vom Target	40
3.1.4.4.1. Nach Tagen	40
3.1.4.4.2. Nach Trials	42
3.1.4.5. Durchschnittsabstand vom Zentrum	43
3.1.4.5.1. Nach Tagen	43
3.1.4.5.2. Nach Trials	43
3.1.4.6. Verhaltenstyp	43
3.1.4.6.1. Nach Tagen	44
3.1.4.6.2. Nach Trials	45
3.1.4.7. Tag 5	45
3.1.5. Ergebnisse Sucrose Consumption Test	45
3.1.6. Ergebnisse Pre-Pulse Inhibition Test	45
3.2. Ergebnisse der Immunhistochemie	47
3.2.1. Parvalbumin	47
3.2.2. Calbindin	50
3.2.3. GAD 67	55
3.2.4. cFos	58
3.2.5. BDNF	62
<b>4. Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1. Methodische Aspekte	64
4.1.1. Wirkung des Poly(I:C)s	64
4.1.2. Durchführung der iTBS	67
4.2. Diskussion der Ergebnisse der Verhaltensversuche	69
4.2.1. Beeinflussung des Angstverhaltens	69
4.2.2. Beeinflussung der verschiedenen Gedächtnisformen sowie des räumlichen Orientierungsvermögens	70
4.2.3. Beeinflussung von depressiven Verhaltenszügen	72
4.2.4. Beeinflussung der Anhedonie	73
4.2.5. Beeinflussung des sensomotorischen Gatings	73
4.3. Diskussion der Ergebnisse der Immunhistochemie	74
4.3.1. Beeinflussung der Expression von PV	75
4.3.2. Beeinflussung der Expression von CB	75
4.3.3. Beeinflussung der Expression von GAD 67	76
4.3.4. Beeinflussung der Expression von cFos	77
4.3.5. Beeinflussung der Expression von BDNF	78
4.4. Abschließende Beurteilung	80
4.5. Ausblick	80



<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>82</b>
<b>6. Summary</b>	<b>83</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>8. Anhang</b>	<b>105</b>

**Publikationen**

**Danksagung**

**Finanzierungsquellen**

**Interessenkonflikt**

**Selbstständigkeitserklärung**

## Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
Aqua dest.	Aqua destillata
b-GAR	Biotinylated Goat Anti-Rabbit
b-HAM	Biotinylated Horse Anti-Mouse
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CA	Cornu ammonis
CB	Calbindin
CR	Calretinin
cTBS	kontinuierliche Theta-Burst Stimulation
D	Dopaminrezeptor
DAB	Diaminobenzidin
dHipp	dorsaler Hippocampus
DI	Diskriminations-Index
Dia.	Diagramm
eANOVA	einfaktorielle ANOVA
EPM	Elevated Plus Maze
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GAP43	Growth Associated Protein 43
GD	Gyrus dendatus
GFAP	Gliafaserprotein
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff
IF- $\alpha$	Interferon- $\alpha$
IF- $\beta$	Interferon- $\beta$
IF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IHC	Immunhistochemie
IL	infralimbischer Kortex
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
i.p.	intraperitoneal
iTBS	intermittierende Theta-Burst Stimulation
i.v.	intravenös
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
LI	Latent Inhibition Test
IPFC	lateraler präfrontaler Kortex
MAP	Mikrotubuli-assoziierten Protein
MEP	motorisch evoziertes Potential
mk	monoklonal
mPFC	medialer präfrontaler Kortex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NAcc	Nucleus accumbens
NaOH	Natriumhydroxid
NaCl	Natrium-Chlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NOB	Novel Object Recognition Test

oPFC	orbitofrontaler präfrontaler Kortex
PAS	Paarig-assoziative Stimulation
PBS	Phosphatpuffer
PBS-TX	TritonX100 in Phosphatpuffer
PF	Porsolt Forced Swim Test
PFA	Paraformaldehyd
PFC	präfrontaler Kortex
Poly(I:C)	Polyriboinosinic-Polyribocytidilic Säure
pk	polyklonal
PPI	Pre-Pulse Inhibition Test
PrL	prälimbischer Kortex
PV	Parvalbumin
rb	rabbit
RNA	Ribonukleinsäure
rTMS	repetitive transkranielle Magnetstimulation
SC	Sucrose Consumption Test
s.c.	subcutan
SNAP-25	Synaptosomal-assoziertes Protein 25
Str.	Stratum
Tab.	Tabelle
TBS	Theta-Burst Stimulation
TH	Tyrosinhydroxylase
TLR3	Toll-like Rezeptor 3
TMS	Transkranielle Magnetstimulation
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
TX	TritonX100
U-Test	Mann-Whitney-U-Test
vHipp	ventraler Hippocampus
VTA	ventrales tegmentales Areal
WM	Morris Water Maze
zANOVA	zweifaktorielle ANOVA



## 1. Einleitung

### 1.1. Schizophrenie

Schizophrenie ist eine schwere psychiatrische Erkrankung des Menschen, die den endogenen Psychosen zugeordnet wird. Endogen, weil die Erkrankung vermutlich „von innen heraus“ hervorgerufen wird und der genaue Entstehungsgrund nicht eindeutig benannt werden kann. Eine Psychose geht einher mit einer veränderten, abnormalen Auffassung und Verarbeitung der Wirklichkeit. Weltweit liegt das Risiko mindestens einmal im Leben an Schizophrenie zu erkranken, die sogenannte Lebenszeitprävalenz, bei durchschnittlich 1 % (Rössler et al. 2005).

#### 1.1.1. Ursachen

Man geht davon aus, dass das Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren die Erkrankung auslöst. Dazu gehört zum einen eine genetische Prädisposition, welche durch zahlreiche Familien-, Zwillings-, und Adoptionsstudien belegt wurde (z.B. Kety et al. 1994, Kendler et al. 1994, Gottesmann und Erlenmeyer-Kimling 2001). Ist ein Elternteil an Schizophrenie erkrankt, ist das Kind mit einer Wahrscheinlichkeit von 10 % ebenfalls betroffen. Sind beide Elternteile betroffen, steigt das Risiko auf 40 %. Bei eineiigen Zwillingen erkrankt das Geschwister sogar mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % ebenfalls (Modifiziert nach Häfner, 1993, 1995). Wissenschaftler der Forschungsgruppe „Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium“ konnten mittlerweile eine große Anzahl von Genen, die nur bei an Schizophrenie erkrankten Menschen vorkommen, aufdecken (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Dass die Genetik aber nicht der einzige auslösende Faktor ist, zeigt die Tatsache, dass 80 % der Schizophreniefälle in nicht vorbelasteten Familien auftreten.

Zum anderen besitzen an Schizophrenie erkrankte Menschen eine veränderte Gehirnstruktur und gestörte Stoffwechselforgänge im Nervengewebe, die sich vor allem in einer von der Norm abweichenden Botenstoffkonzentration äußern. Auf diese Veränderungen im Gehirn wird im Abschnitt 1.1.5. genauer eingegangen.

Der wichtigste Neurotransmitter, welcher für die Symptomatik verantwortlich gemacht wird, ist das Dopamin. Dopamin zählt, neben Adrenalin und Noradrenalin, zu den Catecholaminen. Dopaminerge Neurone kommen vor allem im Mittelhirn vor. Nach dem Auslösen eines Aktionspotentials wird Dopamin aus der Präsynapse in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Dieses bindet dann an die Dopaminrezeptoren (D) auf der Postsynapse. Je nach Rezeptortyp ist die Wirkung unterschiedlich: D<sub>1</sub> und D<sub>5</sub> lösen eine Depolarisation und somit ein erregendes Signal aus, D<sub>2</sub>–D<sub>4</sub> eine Hyperpolarisation und somit ein Hemmendes. Die Vermutung, dass durch eine veränderte dopaminerge Signalübertragung Schizophrenie ausgelöst wird, stammt aus der Beobachtung, dass das erste Neuroleptikum Chlorpromazin die Symptome deutlich besserte. Chlorpromazin wirkt antagonistisch am Dopaminrezeptor. Die Einteilung der Symptome bei Schizophrenie erfolgt in Positiv- und Negativsymptomatik, was im Abschnitt 1.1.2. genauer erläutert wird. Nach der Dopaminhypothese ist eine zu hohe Dopaminkonzentration Ursache der Positivsymptomatik. Gegen die Dopaminhypothese spricht, dass die Anwendung von Dopaminantagonisten keinen Einfluss auf die Negativsymptomatik hat oder diese sogar auslöst. Mittlerweile ist klar, dass das Dopamin nicht alleine für die Symptomatik verantwortlich ist, sondern auch andere Neurotransmittersysteme eine Rolle spielen. Dazu gehört auch Glutamat. Glutamat wirkt erregend über die Bindung an verschiedene Rezeptoren, wobei der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor der Wichtigste ist. Die Glutamathypothese entstand durch die Entdeckung der antagonistischen Wirkung von Phencyclidin am NMDA-Rezeptor, welches der Schizophrenie sehr ähnliche Symptome verursachte. Glutamat kann auch den

dopaminergen Signalweg beeinflussen. Bindet es direkt an dopaminerge Neurone, führt es zu einer Dopaminausschüttung. Wird Glutamat zu Gamma-Aminobuttersäure (GABA) umgewandelt und bindet an GABA-Interneurone, kommt es im weiteren Signalweg zur Hemmung der Dopaminausschüttung. Auch über eine Beteiligung von Serotoninrezeptoren, den sogenannten 5-Hydroxytryptamin (5-HT)-Rezeptoren, wird gesprochen. Serotoninrezeptorantagonisten, welche an 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren binden und diesen blockieren, können zur Verminderung der Symptome führen. Mittlerweile geht man davon aus, dass Veränderungen im dopaminergen und serotonergen System zusammen für die Symptomatik der Schizophrenie verantwortlich sind (Kapur und Remington et al. 1996).

Zahlreiche Studien belegen in den letzten Jahren, dass auch pränatale Infektionen im letzten Drittel der Schwangerschaft ein auslösender Faktor für Schizophrenie sein können (Mednick et al. 1988, Brown und Susser 2002, Brown et al. 2000, Brown et al. 2001). Infektionen lösen Entzündungsprozesse im Gehirn des Feten aus, welche zu Veränderungen an den neuronalen Strukturen führen. Möglicherweise spielen auch Komplikationen während der Geburt und Infektionen im frühen Kindesalter mit Herpesviren, Toxoplasma gondii oder Borellien eine Rolle bei der Entstehung der Schizophrenie. Dies ist jedoch noch nicht ausreichend wissenschaftlich belegt.

Der Verlauf der Erkrankung kann durch kritische Lebensereignisse, wie z.B. den Verlust eines geliebten Menschen durch Tod oder Trennung, eine berufliche Veränderung oder einen Wohnortwechsel oder auch bestimmte Kommunikationsmuster, Unstimmigkeiten und Erziehungsmethoden innerhalb der Familie, beeinflusst werden. Ebenso durch Konsum von Drogen oder Alkohol. Diese Faktoren können jedoch nicht als Ursachen der Erkrankung angesehen werden.

### **1.1.2. Symptome**

Die Symptome werden in zwei Kategorien eingeteilt: Positivsymptomatik und Negativsymptomatik.

Die Positivsymptomatik tritt meistens in der akuten Phase der Erkrankung auf und beinhaltet Wahnvorstellungen, Halluzinationen, Ich-Störungen, kognitive Störungen sowie Bewegungsstörungen. Menschen die an Wahnvorstellungen leiden, bilden sich Bedrohungen ein, die nicht real sind, wie z.B. verfolgt oder vergiftet zu werden oder schwer krank zu sein. Ebenfalls möglich ist ein Kontrollwahn. Halluzinationen sind bei Schizophrenie oft akustischer Art. Die betroffene Person leidet am sogenannten „Stimmenhören“, bei dem Handlungen der Person kommentiert, sie beschimpft oder ihr Befehle erteilt werden. Eher selten sind andere Sinneswahrnehmungen, wie Sehen, Riechen, Schmecken oder Fühlen, betroffen. Bei einer Ich-Störung kommt es zu einer fehlerhaften Wahrnehmung der Grenze zwischen der eigenen Person und der Umwelt, die sich als Entfremdung von der eigenen Person oder als Gefühl, dass die eigenen Handlungen von außen manipuliert werden, äußert. Dies kann wiederum in die Richtung eines Wahns führen. Zu den kognitiven Störungen zählen Beeinträchtigungen der Konzentrationsfähigkeit, der Aufmerksamkeit, der Gedächtnisbildung oder der Fähigkeit Probleme zu lösen oder Handlungen zu planen. Bewegungsstörungen können sich entweder durch eine starke motorische Erregung, welche sich z.B. durch Stereotypien, wie ziellosem Hin- und Herlaufen, oder durch eine völlige Bewegungs- und Reaktionslosigkeit, äußern.

In der chronischen Phase überwiegt die Negativsymptomatik. Sie ist durch sozialen Rückzug, Mangel an Emotionen, Interessenabnahme oder -verlust an bestimmten Aktivitäten, wie Hobbies oder anderen Freizeitbeschäftigungen, Antriebslosigkeit und Sprachverarmung gekennzeichnet. Oft fällt es Betroffenen schwer Entscheidungen zu treffen oder Freude, Lust und Genuss zu empfinden (Anhedonie). Auch depressive Phasen und

Schlafstörungen sind möglich und meistens ein frühes Anzeichen für die Entwicklung der Schizophrenie. Irrtümlicherweise wird aufgrund der Begriffsherkunft (altgriechisch, schizein=abspalten, phrēn=Seele) auch immer wieder eine Spaltung der Persönlichkeit als Symptom der Schizophrenie erwähnt, was jedoch nicht der Fall ist.

### 1.1.3. Verlauf

Die Schizophrenie ist eine Erkrankung, welche in Schüben oder chronisch auftritt, wobei die schubweise Form häufiger ist. Wie bereits erwähnt, gibt es bestimmte Frühzeichen, die auf die Entwicklung einer Schizophrenie hinweisen. Ob sie sich schleichend über einen längeren Zeitraum entwickelt oder plötzlich auftritt, ist von Mensch zu Mensch unterschiedlich. In der Akutphase, welche zwischen Wochen und Monaten andauern kann, treten vorwiegend Positivsymptome auf. Nach dieser kommt es zur Ausbildung der Negativsymptomatik und anschließend bei den meisten Patienten zum Abklingen der Symptome, der sogenannten Remission. Bei einem kleinen Anteil der Patienten bleibt jedoch eine Restsymptomatik. Der Abstand zwischen den einzelnen Schüben ist unterschiedlich groß.

Für die Langzeitprognose bedient man sich der „Drittelregel“: bei einem Drittel kommt es zur starken Verbesserung oder der Heilung, bei einem Drittel zeigt sich eine leichte Verbesserung oder ein Gleichbleiben und bei einem Drittel verschlimmern sich die Symptome. Bei weiblichen Patienten, Berufstätigkeit, Patienten in einer festen Partnerschaft, Patienten mit einem guten sozialen Umfeld, mit überwiegend Positivsymptomatik, mit einem erkennbaren Auslöser der Erkrankung und einem akuten Verlauf ist die Prognose besser.

### 1.1.4. Behandlung

Die Behandlung besteht hauptsächlich aus 2 Teilen: der Pharmakotherapie und der Psychotherapie. Welcher Teil überwiegt, hängt von der Schwere der Erkrankung und dem Verlauf ab. Als Medikamente werden Antipsychotika, die die Wirkung bestimmter Transmitter im Gehirn, vor allem von Dopamin, hemmen, eingesetzt um die Erregung und Aggressivität der Patienten zu senken. Welche Neuroleptika welcher Wirkstoffgruppe, in welcher Dosierung und über welchen Zeitraum eingesetzt werden, ist für jeden Patienten individuell festzulegen. Heutzutage werden vermehrt atypische Antipsychotika eingesetzt, da diese geringere Nebenwirkungen auf die Körpermotorik, als die klassischen Antipsychotika, haben. Allerdings haben auch diese Medikamente Nebenwirkungen, wie eine Gewichtszunahme und Stoffwechselstörungen. Des Weiteren werden Antidepressiva eingesetzt. Generell gilt, dass die Positiv- besser als die Negativsymptomatik auf eine Behandlung anspricht.

Der erste Schritt der Psychotherapie ist, zwischen Patient und Therapeut Vertrauen aufzubauen und dem Patienten das Gefühl zu vermitteln, verstanden zu werden. Im Gespräch wird nach einem möglichen Auslöser der Erkrankung gesucht und dem Patienten geholfen das Erlebte zu verarbeiten. Die Aufklärung über die Erkrankung ist ein wichtiger Teil der Therapie. Möglichst sollen auch Familie und Freunde in die Behandlung einbezogen werden. Durch die Vorgabe von strukturierten Tagesabläufen, Verhaltenstherapien, berufsrehabilitierende Maßnahmen und verschiedenen Trainingsprogrammen werden die Patienten auf eine Wiedereingliederung vorbereitet.

Da trotz der modernen Medizin immer noch rund 30 % der Betroffenen an Rückfällen und Therapieresistenzen, vor allem bei akustischen Halluzinationen, leiden (Robert Koch-Institut 2010), wird weiterhin nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten gesucht. Gegen die depressiven Symptome werden bereits Licht-, Elektrokrampf- oder Wachtherapien angewendet.

Lichttherapien werden in depressiven Phasen, vor allem in den Wintermonaten, verwendet. Dazu werden die Patienten, am besten direkt nach dem Erwachen, für beispielsweise 30 min vor eine 10.000 Lux helle künstliche Lichtquelle gesetzt. Die Augen müssen dabei geöffnet sein, damit das Licht auf die Netzhaut trifft (Lam und Levitt et al. 2002). Mehrere Studien zeigen, dass eine Lichttherapie bei saisonaler Depression die Symptome deutlich abschwächt (Golden et al. 2005), jedoch meist nur kurz über das Therapieende hinaus wirksam ist.

Die Elektrokrampftherapie wird bei therapieresistenten oder sehr stark ausgeprägten Depressionen angewendet. Unter einer Kurznarkose wird durch aufeinanderfolgende Stromimpulse, welche über eine an der Kopfhaut angebrachte Elektrode appliziert werden, ein Krampfanfall ausgelöst. Dieser dauert 30–90 s und stimuliert die Neubildung von Nervenzellen und deren plastische Veränderung (Madsen et al. 2000, Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde 2015).

Bei einer Wachtherapie wird dem Patienten der Schlaf in der zweiten Nachthälfte oder auch vollständig entzogen. Schon am gleichen Tag kann hier eine deutliche Verbesserung der Symptome beobachtet werden, allerdings ist diese meist nicht langanhaltend (Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde 2015).

Die Hirnstimulationen sind als alternative Therapieoption immer häufiger im Gespräch und Gegenstand zahlreicher Forschungen. Dazu gehört zum einen die transkranielle Gleichstromstimulation (tDCS). Über zwei an der Kopfhaut angebrachte Elektroden wird ein Gleichstrom appliziert, der eine Depolarisation oder Hyperpolarisation an den Nervenzellen auslöst, je nach Polung der Stimulation. Dadurch wird die neuronale Aktivität beeinflusst. Bereits angewendet wird dieses Verfahren bei Schlaganfallpatienten, um bei der Rehabilitation motorische und kognitive Funktionen leichter wieder zu erlernen. Des Weiteren konnten einige Studien einen antidepressiven Effekt nachweisen (Boggio et al. 2008, Loo et al. 2012, Brunoni et al. 2013). Nach den Untersuchungen von Brunoni et al. 2017 ist die Reduktion der Symptome gegenüber einer medikamentösen Behandlung jedoch zu gering (Brunoni et al. 2017).

Ein weiterer vielversprechender, neuer Therapieansatz ist die transkranielle Magnetstimulation, da sie schmerzfrei und nicht-invasiv am wachen Patienten angewendet werden kann. Auf ihre Wirkungsweise wird im Abschnitt 1.3 genauer eingegangen.

#### **1.1.5. Makro- und Mikroskopische Auffälligkeiten im Gehirn**

Bei betroffenen Personen lassen sich verschiedene Abweichungen von der normalen Gehirnstruktur feststellen. Bereits 1978 stellen Johnstone et al. fest, dass das Ventrikelvolumen bei an Schizophrenie erkrankten Menschen größer ist (Johnstone et al. 1976). Dies wurde in nachfolgenden CT und MRT Studien sowie Meta-Analysen zahlreich bestätigt (Weinberger et al. 1979, Raz et al. 1990, Horn et al. 1992, Wright et al. 2000). Hauptsächlich betroffen sind die Seitenventrikel und der dritte Ventrikel. Des Weiteren wurde ein reduziertes Volumen bestimmter Gehirnstrukturen festgestellt. Betroffen sind hierbei der Temporallappen sowie mediale Bereiche, wie Hippocampus, Gyrus parahippocampalis und Amygdala (Lawrie et al. 1998, Nelson et al. 1998). Aber auch der Nucleus caudatus (Keshavan et al. 1994) sowie der Thalamus (Andreasen et al. 1994) zeigen ein reduziertes Volumen. Der Thalamus zeigt zusätzlich eine verringerte neuronale Aktivität (Buchsbaum et al. 1996). Von der Volumenreduktion ist hauptsächlich die graue Substanz betroffen (Lawrie et al. 1998). Ob sich die Veränderungen im Gehirn mit der Zeit verschlimmern oder der Zustand gleichbleibend ist, sind sich die Forscher nicht einig. Das klinische Bild korreliert



nicht mit der Stärke der pathologischen Veränderungen (Marsh et al. 1994, DeLisi 1997, Nair et al. 1997). Ein weiteres Merkmal ist eine verringerte Dicke des Kortex und eine weniger starke Faltung der Gehirnoberfläche (Hirjka et al. 2014).

Neben den MRT und CT-Studien, wurden auch in Autopsien die Vergrößerung der Ventrikel, die Volumenreduktion, die verringerte Dicke, das verringerte Gewicht und eine verringerte Länge des Gehirns festgestellt (Brown et al. 1986, Pakkenberg 1987, Bruton et al. 1990).

Auf zellulärer Ebene wurde eine von der Norm abweichenden Anordnung der Pyramidenzellen im Hippocampus beobachtet (Kovelman et al. 1984, Altshuler et al. 1987, Conrad et al. 1991, Jönsson et al. 1997). Auch eine verringerte Neuronendichte im Hippocampus (Jönsson et al. 1997, Jeste et al. 1989), sowie eine verringerte Anzahl an Pyramidenzellen konnte nachgewiesen werden (Falkai et al. 1986), was allerdings in späteren Untersuchungen nicht noch einmal belegt wurde. Die Größe der Pyramidenzellen ist bei Schizophrenie im Hippocampus und dem dorsolateralen präfrontalen Kortex (PFC) reduziert (Benes et al. 1991, Arnold et al. 1995, Rajkowska et al. 1998). Selemon et al. stellte eine erhöhte Zelldichte im dorsolateralen PFC fest, wobei den Hauptanteil kleine bis mittelgroße Neurone ausmachen (Selemon et al. 1995, Selemon et al. 1998). Derselbe Trend war ebenfalls im Frontallappen sichtbar (Pakkenberg 1993).

Eine veränderte synaptische Verschaltung der Neurone ist eine weitere Auffälligkeit im Gehirn schizophrener Patienten. So werden bestimmte Proteine, welche Bestandteil der Synapsen sind, verringert exprimiert, wie z.B. Synapsin und Synaptophysin (Browning et al. 1993, Eastwood und Harrison 1995), Synaptosomal-assoziiertes Protein 25 (SNAP-25) (Young et al. 1998) und Complexin II im Hippocampus (Eastwood und Harrison et al. 1998). Das Growth Associated Protein 43 (GAP43), welches ein Marker für neuronale Plastizität ist, wird im Hippocampus Betroffener weniger exprimiert (Eastwood und Harrison et al. 1998). Im dorsolateralen PFC ist Synaptophysin ebenfalls verringert, GAP43 hingegen erhöht (Perrone-Bizzozero et al. 1996, Glantz et al. 1997).

Auch eine verringerte Dichte der dendritischen Dornfortsätze (Garey et al. 1998) sowie eine weniger starke Verzweigung der Dendriten ist zu erkennen. Dies wird z.B. durch eine verringerte Expression des Mikrotubuli-assoziierten Proteins (MAP) sichtbar (Arnold et al. 1991). Die verringerte Verzweigung der Dendriten und Axone und verringerte Anzahl an Synapsen, und damit ein geringeres Volumen des Neuropils, ist eine mögliche Erklärung für die erhöhte Zelldichte in manchen Regionen, da hierdurch die Neuronen dichter zusammenliegen (Schlaug et al. 1993). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Schizophrenie die synaptischen Verknüpfungen und Aktivitäten verändert sind, deren Ausprägung je nach Region unterschiedlich stark ausfällt.

Um die Dopaminhypothese zu beweisen, wurden auch einige Untersuchungen zu den Dopaminrezeptoren durchgeführt. So konnte eine höhere D<sub>2</sub>-messenger Ribonukleinsäuren (mRNA) Konzentration bei Schizophrenie im Kortex (Tallerico et al. 2001) und eine erhöhte D<sub>2</sub>-Rezeptor Konzentration im Striatum (Brunelin et al. 2013) festgestellt werden. Hinsichtlich der Serotonin-Rezeptoren sind sehr unterschiedliche Ergebnisse zu finden. Einige Post-mortem Untersuchungen und in vivo Bildgebungsstudien zeigen eine reduzierte Rezeptordichte des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors und einer erhöhte Rezeptordichte des 5-HT<sub>1A</sub> im PFC (Bennett et al. 1979, Burnet et al. 1996, Ngan et al. 2000, Hurlmann et al. 2005, Matsumoto et al. 2005). In vielen anderen Studien wurden hingegen keinerlei Unterschiede gefunden (Mackay et al. 1978, Whitaker et al. 1983, Reynolds et al. 1983, Trichard et al. 1998, Lewis et al. 1999). Bei der Interpretation der Ergebnisse muss beachtet werden, dass die Anzahl der 5-HT-Rezeptoren mit zunehmendem Alter sinkt (Marcusson et al. 1984). Durch Versuche an Ratten konnte gezeigt werden, dass eine längere Behandlung mit Antipsychotika ebenfalls die Rezeptordichte beeinflussen kann (Reynolds et al. 1983, Dean 2003). Eine geringere Konzentration der mRNA des 5-HT-Rezeptors wurde ebenfalls festgestellt (Burnet et al. 1996, Lopez-Figueroa et al. 2004). Bezüglich des Glutamats sind die verschiedenen

Rezeptoren getrennt voneinander zu betrachten. Bei den  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA)-Rezeptoren wurden eine verminderte Rezeptordichte im Hippocampus und in anderen Strukturen des medialen Temporallappens festgestellt (Collinge et al. 1991, Eastwood et al. 1995, Eastwood et al. 1997a, Eastwood et al. 1997b). Im Kortex und Striatum sind die Ergebnisse durchwachsen (Freed et al. 1993, Noga et al. 1997, Healy et al. 1998, Sokolov 1998). Die Expression der Kainatrezeptoren ist bei Schizophrenie im Kortex erhöht (Nishikawa et al. 1983, Deakin et al. 1989, Torum et al. 1992), im Hippocampus und Parahippocampus erniedrigt (Kerwin et al. 1990) und im Striatum unverändert (Nishikawa et al. 1983). Die Studien zur NMDA-Rezeptor Expression sind aufgrund der vielen verschiedenen Untereinheiten des Rezeptors sehr unterschiedlich aufgebaut und damit auch ihre Ergebnisse. Es wurde eine reduzierte Expression der R1 Untereinheit im Kortex festgestellt (Humphries et al. 1996, Sokolov 1998). Postsynaptische Proteine, welche an den NMDA-Rezeptor binden, werden vermindert exprimiert (Funk et al. 2009). Schon früh wurden in Post-mortem-Studien eine verringerte GABA Konzentration gefunden (Perry et al. 1979). Glutamat wurde über Magnetresonanzspektroskopie-Studien in betroffenen Patienten im Frühstadium in einer erhöhten Konzentration gefunden, GABA in einer erniedrigten (Goto et al. 2009, Marsmann et al. 2014, Chiu et al. 2018). Bei chronischer Schizophrenie hingegen, sind meist Glutamat sowie GABA reduziert (Thakkar et al. 2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Schizophrenie bestimmte einheitliche Abweichungen, wie z.B. die vergrößerten Ventrikel und das reduzierte Gehirnvolumen, zu finden sind, es aber gerade auf molekularer Ebene regionale, zeitliche und individuelle Unterschiede gibt.

### 1.1.6. Aktivitätsmarker

Um die Aktivität der neuronalen Strukturen und die synaptische Plastizität von Gehirnen zu beurteilen, werden bestimmte Aktivitätsmarker betrachtet. Die im Folgenden aufgeführten Markerproteine werden in dieser Arbeit als Primärantikörper für die Immunhistochemie verwendet.

Das Kernprotein NeuN ist nur im Nervensystem zu finden und in den meisten Nervenzellen vorhanden. Es tritt seit der frühen Entwicklung des Nervensystems auf und bleibt auch im Erwachsenenalter erhalten (Mullen et al. 1992). Die Anzahl der NeuN-exprimierenden Zellen dient als Referenzwert um den prozentualen Anteil der Zellen, welche Parvalbumin (PV), Calbindin (CB), Glutamat-Decarboxylase (GAD) 67, cFos oder Brain derived neurotrophic factor (BDNF) exprimieren, zu bestimmen.

PV und CB gehören zu den Calcium-bindenden Proteinen und werden in Nervenzellen, Muskulatur und endokrinen Zellen exprimiert. Sie kontrollieren über die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und beeinflussen somit den Zellstoffwechsel (Schäfer et al. 1996). In Nervenzellen wird über die intrazelluläre Calciumkonzentration die Transmitterfreisetzung und damit auch die synaptische Plastizität reguliert.

Ein Großteil der GABAergen Interneurone exprimiert PV (Celio 1986), wobei es ausschließlich in den schnell-feuernden Interneuronen vorkommt (Kawaguchi et al. 1987). PV positive Interneurone besitzen lange multiple Dendriten, die über verschiedene Schichten verlaufen und von vielen Neuronen Input erhalten. Die Dendriten und Somata sind mit einer Vielzahl an Synapsen überzogen. Ihre Axone sind stark verzweigt, wodurch ein großes divergentes inhibitorisches Output entsteht. Der Verlust oder eine verminderte Aktivität von inhibitorischen Zellen, kann zu einer übermäßigen Erregung führen. Hashimoto et al. konnten eine verminderte PV mRNA Expression im PFC bei Schizophrenie nachweisen (Hashimoto et al. 2003). Auch eine verringerte Anzahl an PV-exprimierenden Zellen im PFC

wurde gefunden (Beasley und Reynolds 1997, Reynolds und Beasley 2001, Reynolds et al. 2002, 2004).

Ein weiteres wichtiges Calcium-bindendes Protein ist das CB. Es kommt ebenfalls in GABAergen Interneuronen vor. Die Studien zur CB Expression bei Schizophrenie liefern sehr unterschiedliche Ergebnisse. Daviss und Lewis fanden 1995 eine erhöhte Dichte an CB+ Zellen bei Schizophrenie im PFC und Fung et al. stellten 2010 eine erhöhte CB mRNA Konzentration im PFC fest. Andere Untersuchungen hingegen zeigten keine Veränderung (Tooney und Chahl 2004) oder eine verringerte Expression von CB positiven Zellen im PFC (Reynolds et al. 2004, Sakai et al. 2008).

Die GAD 67, welche für die Synthese der GABA aus Glutamat zuständig ist, befindet sich im Neuron. Sie ist für die Synthese von GABA für metabolische Prozesse der Zelle, wie Neuroprotektion und Synaptogenese, zuständig. Die zweite Isoform GAD 65 hingegen ist an Nervenenden und Zellmembranen lokalisiert und für die Synthese von GABA für die synaptische Übertragung verantwortlich. Die Konzentration der GAD 67 (Impagnatiello et al. 1998, Guidotti et al. 2000, Fatemi et al. 2005) sowie der GAD 67 mRNA (Akbarian et al. 1995, Hashimoto et al. 2003, Guidotti et al. 2000, Veldic et al. 2004) ist bei Schizophrenie im PFC und im Kleinhirn verringert.

Der Transkriptionsfaktor cFos spielt über die Beeinflussung von Zelldifferenzierung, -proliferation und Bildung neuronaler Verknüpfungen eine wichtige Rolle beim Lernen und der Gedächtnisbildung und hat damit einen Einfluss auf die synaptische Plastizität. Es wirkt auch als Protoonkogen. Seine Synthese wird durch extrazelluläre Signale wie Wachstumsfaktoren oder Neurotransmitter, z.B. Dopamin, ausgelöst. Boyajyan et al. stellten bei an Schizophrenie Erkrankten einen verringerten cFos Spiegel im Blut sowie eine Mutation an einem Allel des cFos Gens fest (Boyajyan et al. 2015). Klassische und atypische Antipsychotika induzieren die cFos Expression in verschiedenen Gehirnregionen (Robertson et al. 1994).

BDNF gehört zu den sogenannten Neurotrophinen, welche als Neuromodulator dienen. Sie sind für Zellproliferation, -differenzierung und -tod sowie für den Auf- und Abbau synaptischer Verknüpfungen in der Neuronalentwicklung als auch im adulten Gehirn verantwortlich und damit Bestandteil der synaptischen Plastizität (Vicario-Abejón et al. 2002). BDNF spielt ebenfalls eine Rolle beim Lernen und der Gedächtnisbildung. Die Ausschüttung von BDNF kann die Langzeitpotentierung und -depression beeinflussen (Aicardi et al. 2004, Poo 2001). In Untersuchungen an genetisch veränderten Mäusen mit BDNF-Defizit, konnte ein Lerndefizit gezeigt werden (Korte et al. 1996, Gorski et al. 2003). In Post-mortem-Studien wurden erhöhte Konzentrationen von BDNF im anterioren Gyrus cinguli (Takahashi et al. 2000), im Hippocampus (Takahashi et al. 2000) und in kortikalen Arealen (Durany et al. 2001), verringerte Konzentrationen im dorsolateralen PFC (Weickert et al. 2003) und im Hippocampus (Durany et al. 2001) und ein verringerter mRNA Spiegel im dorsolateralen PFC (Weickert et al. 2003) bei an Schizophrenie erkrankten Patienten gefunden. Toyooka et al. stellten bei Patienten einen reduzierten BDNF Serumspiegel fest (Toyooka et al. 2002).

## 1.2. Poly(I:C)-Tiermodell für die Schizophrenie des Menschen

### 1.2.1. Wirkungsweise der Poly(I:C)

Voraussetzung für eine gesunde Entwicklung des Fetus sind optimale Bedingungen im Mutterleib. Diese können zum Beispiel durch eine verminderte Sauerstoffversorgung oder virale und bakterielle Infektionen während bestimmter sensibler Phasen der Schwangerschaft negativ beeinflusst werden, woraus fehlerhafte Entwicklungen der neuronalen Strukturen resultieren. Viele Studien konnten mittlerweile nachweisen, dass pränatale Infektionen im zweiten Trimester, neben genetischer Prädisposition und Stress, einen weiteren Risikofaktor zur Entstehung von Schizophrenie darstellen (Mednick et al. 1988, Brown et al. 2000, Brown et al. 2001, Brown und Susser 2002). Um eine solche maternale virale Infektion zu imitieren, wird beim Poly(I:C)-Modell das synthetische Ribonukleinsäure (RNA)-Analog Polyriboinosinic-Polyribocytidilic Säure (Poly(I:C)) verwendet. Dieses bindet an Toll-like Rezeptoren der Klasse 3 (TLR3), welche von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen exprimiert werden. Dadurch werden Interferon- $\gamma$  (IF- $\gamma$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interferon- $\alpha$  (IF- $\alpha$ ), Interferon- $\beta$  (IF- $\beta$ ), Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und andere Chemokine ausgeschüttet, welche eine Entzündungsreaktion hervorrufen (Cella et al. 1999, Alexopoulou et al. 2001, Gilmore et al. 2005, Takeuchi et al. 2007, Mitchell et al. 2010, Forrest et al. 2012). Im Fetus wird vor allem im Gehirn eine Entzündungsreaktion ausgelöst, das auslösende Agens, hier das Poly(I:C), geht jedoch nicht in den Fetus über (Shi et al. 2003). Cytokine spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Nervengewebe. Sie sind mit verantwortlich für Differenzierung, Proliferation und Überleben der Neuronen, können aber, je nach Zeitpunkt, Zelltyp, Synapsentyp und Konzentration, ebenso neurotoxisch und degenerativ wirken. Ein zu hoher Spiegel von IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  führt zu einer verringerten Länge der Dendriten und einer geringeren Anzahl an Ranvier'schen Schnürringen und Primärdendriten, was eine gestörte neuronale Verschaltung im Gehirn verursacht (Gilmore et al. 2004). Cytokine sind ebenfalls in der Lage die Apoptose von Zellen einzuleiten (Hu et al. 1997) und beeinflussen das Überleben von dopaminergen und serotonergen Neuronen (Jarskog et al. 1997). Im fetalen Gehirn ist, im Gegensatz zum maternalen Kreislauf, ein verringerter TNF- $\alpha$  Spiegel messbar. Eine mögliche Ursache ist der Verlust von neuronalen Zellen, die TNF- $\alpha$  ausschütten (Gilmore et al. 2004). Eine Studie konnte nach einer pränatalen Influenzainfektion bei Mäusen eine vermehrte Expression des sauren Gliafaserproteins (GFAP), welches auf eine vermehrte Anzahl von Astrozyten und damit dem Vorliegen einer sogenannten Gliose hinweist, feststellen (Fatemi et al. 2002). Eine Gliose spricht für eine Beschädigung des Gewebes durch Erkrankung oder Trauma. Bei an Schizophrenie erkrankten Menschen konnte ebenfalls eine Gliose festgestellt werden (Arnold et al. 1996).

Eine Schlüsselrolle in der Wirkung des Poly(I:C)-Modells spielt IL-6. Smith et al. zeigten, dass bei einer Immunstimulation ohne IL-6 keine strukturellen und funktionellen Veränderungen bei den Nachkommen ausgelöst werden können (Smith et al. 2007).

Um durch die Poly(I:C)-Injektion den gewünschten neuronalen Effekt zu erreichen, ist es nötig die Injektion zu einem bestimmten Zeitpunkt der Trächtigkeit durchzuführen, zu dem sich das Gehirn in der Entwicklung befindet und somit anfällig für äußere Reize ist. Dies ist je nach Tierart unterschiedlich. Bei der Ratte trifft dies auf das frühe dritte Trimester zu. Auch die Dosis des Poly(I:C)s muss korrekt gewählt werden, um einen Abort, zu kleine Würfe oder eine unzureichende Wirkung zu vermeiden. Einige Studien haben sich mit den Dosis-abhängigen Effekten bei Mäusen beschäftigt (Shi et al. 2003, Meyer et al. 2005). Bei einer Dosis von 2.5 mg/kg Poly(I:C) intravenös (i.v.) konnte kein Unterschied im Pre-Pulse Inhibition Test (PPI) im Vergleich mit den Kontrolltieren festgestellt werden, bei der nächsthöheren Dosis von 5 mg/kg zeigte sich hingegen ein signifikantes Defizit. Ab einer Dosis von 10 mg/kg war die Wurfgröße deutlich reduziert, weshalb die Dosis auch nicht zu hoch gewählt werden darf. Andere Versuche, wie zum Beispiel der Latent Inhibition Test (LI), wurden nicht von der Dosis beeinflusst. Beim LI wird das Tier mehrmals einem Reiz ohne

Konsequenz ausgesetzt und dieser anschließend in der Lernphase mit einem zweiten unbekanntem Reiz kombiniert. Üblicherweise kommt es bei gesunden Tieren zur sogenannten latenten Inhibition, eine Abschwächung des Lernerfolgs in der Lernphase, da der erste Reiz vom Gehirn als unwichtig erlernt wurde. Als Richtwert um ausreichende Effekte des Poly(I:C)s zu erzielen wird eine Dosis von ungefähr 5 mg/kg angegeben (Meyer et al. 2005).

### 1.2.2. Makro- und Mikroskopische Auffälligkeiten im Gehirn

Bei adulten Poly(I:C)-Ratten wurde ein vergrößertes Volumen des lateralen und vierten Ventrikels und ein verringertes Volumen des Hippocampus gegenüber Natrium-Chlorid (NaCl)-Kontrolltieren gefunden. Bei Tieren im Wachstum konnte hingegen kein Unterschied festgestellt werden (Li et al. 2012, Piontkewitz et al. 2012). Weitere Untersuchungen zeigten eine verringerte Anzahl an Pyramidenzellen im Cornu ammonis (CA) 1 des Hippocampus (Zuckermann und Weiner 2003, Zuckermann et al. 2003). Bei jüngeren Tieren konnte kein Zellverlust, jedoch Veränderungen der synaptischen Funktionen und der Proteinexpression festgestellt werden (Oh-Nishi et al. 2010). Bei Jungtieren von Mäusen konnte eine abnormale Myelinisierung und Entwicklung der Axone festgestellt werden, was sich mit Erreichen des Erwachsenenalters normalisierte (Makinodan et al. 2010).

Betrachtet man das dopaminerge System, wurde eine dopaminerge Überaktivität und eine verringerte D<sub>2</sub>-Rezeptorbindung bei Poly(I:C)-Mäusen gefunden (Ozawa et al. 2006). Im PFC und im lateralen Globus pallidus konnte von Winter et al. eine erhöhte Konzentration von Dopamin und dessen Metaboliten gefunden werden, wobei gleichzeitig die Konzentration von Serotonin und dessen Metaboliten im Hippocampus, Nucleus accumbens und dem lateralem Globus pallidus erniedrig war (Winter et al. 2009). Eine erhöhte Konzentration der Tyrosinhydroxylase (TH), welche in der Synthese von Dopamin eine Rolle spielt, wurde im Striatum gefunden (Meyer et al. 2008a). Ebenso eine vermehrte Anzahl an TH-exprimierenden Zellen in der Substantia nigra und dem ventralen tegmental Areal (VTA) bei adulten Tieren (Vuillermot et al. 2010).

Auch Hinweise auf eine GABAerge Fehlfunktion, wie sie bei Schizophrenie beschrieben wird, sind bei Poly(I:C)-Tieren zu finden. PV-exprimierende GABAerge Interneurone waren im ventralen Hippocampus, sowie im PFC in geringerer Anzahl zu finden (Meyer et al. 2008c). Die Anzahl der Interneurone, welche Reelin exprimieren, war in CA1 des dorsalen Hippocampus (Meyer et al. 2006a) und dem PFC verringert (Meyer et al. 2008c). Reelin ist ein Glykoprotein, welches eine Rolle in der Migration und Differenzierung von Neuronen spielt. Es ist an der frühen pränatalen Gehirnentwicklung beteiligt, aber auch an synaptischer Plastizität, Langzeitpotenzierung und Neurogenese im adulten Gehirn. Bei Schizophrenie, bipolaren Erkrankungen und Depressionen wurde eine verringerte Zahl Reelin-exprimierender Zellen festgestellt (Fatemi et al. 2000). Im PFC (Roemaker et al. 2011) und im Hippocampus (Ibi et al. 2009) wurde eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration festgestellt.

### 1.2.3. Auffälligkeiten im Verhalten

Veränderungen im Verhalten der Tiere wurden über Verhaltensversuche sowohl bei Ratten als auch bei Mäusen festgestellt. Adulte Poly(I:C)-Tiere zeigen in vielen Studien im Pre-Pulse Inhibition Test (Ozawa et al. 2006, Smith et al. 2007, Meyer et al. 2008c, Li et al. 2012) und LI (Zuckermann und Weiner 2003, Zuckermann et al. 2003, Meyer et al. 2006b, Smith et al. 2007) ein sensorisches Gating-Defizit. Das bedeutet, dass Reize, welche für eine bestimmte Aufgabe irrelevant sind, nicht wie beim gesunden Menschen automatisch

herausgefiltert werden um die Verarbeitungen des relevanten Reizes optimal zu ermöglichen. In der Untersuchung auf neuropsychologischer Erkrankungen, wie Schizophrenie oder Alzheimer, wird das sensorische Gating als Diagnosekriterium genutzt. Im Open-Field-Test zeigten Poly(I:C)-Tiere eine verringerte Ängstlichkeit, indem sie sich länger in den offenen Teilen aufhielten (Smith et al. 2007, Ibi et al. 2009). Ein Defizit beim Lernen zeigten die Poly(I:C)-Tiere gegenüber den Kontrolltieren beim Novel Object Recognition Test (NOB). Im Wiederholungsdurchgang beschäftigten sich die Poly(I:C)-Tiere weniger mit dem neuen Objekt (Ibi et al. 2009, Ozawa et al. 2006, Wolff et al. 2011). Auch im Morris Water Maze (WM) konnte ein schlechteres Lernen beobachtet werden (Meyer et al. 2008c). Im WM fiel außerdem auf, dass die Poly(I:C)-Tiere bei kurzen Intervallen zwischen den Durchgängen schlechter lernten als die Kontrolltiere, bei langen Abständen von über 3 Tagen jedoch bessere Ergebnisse erzielten (Savanthrapadian et al. 2013).

#### **1.2.4. Beurteilung des Schizophreniemodells**

Wie die bisherigen Ausführungen zeigen sind viele Parallelen zwischen den makroskopischen und mikroskopischen Auffälligkeiten und den Auffälligkeiten im Verhalten zwischen schizophrenen Patienten und Tieren aus dem Poly(I:C)-Modell vorhanden: vergrößerte Ventrikel, verringertes Volumen des Hippocampus, Veränderungen der Pyramidenzellen des Hippocampus, Überaktivität des dopaminergen Systems, Fehlfunktion des GABAergen Systems, Defizit im sensorischen Gating, Anhedonie, Antriebslosigkeit und Lerndefizite. Das Poly(I:C)-Modell ist in der Lage ein breites Spektrum der typischen Auffälligkeiten bei Schizophrenie am Tier nachzuahmen. Wie beim Menschen manifestieren sich die charakteristischen Anomalien der Erkrankung bei Tieren des Poly(I:C)-Modells erst im Erwachsenenalter, wodurch nicht nur die Behandlung, sondern auch die Prävention der Ausprägung des Krankheitsbildes erforscht werden kann. Im Gegensatz zu Modellen, bei denen akut durch NMDA-Rezeptorantagonisten, wie Ketamin oder Phencyclidin schizophrenieähnliche Symptome ausgelöst werden, handelt es sich beim Poly(I:C)-Modell um ein Entwicklungsstörungsmodell, durch das bereits pränatal Einfluss auf die Gehirnentwicklung genommen wird. Wie bereits erwähnt spielen pränatale Einflüsse bei der Entwicklung des Krankheitsbildes Schizophrenie beim Menschen eine große Rolle. Des Weiteren gibt es Schizophreniemodelle, bei denen die Tiere genetisch verändert werden oder gezielt an bestimmten Strukturen des Gehirns Läsionen gesetzt werden um die Symptome auszulösen. Jedes Modell hat Vor- und Nachteile und die Auswahl erfolgt abgestimmt auf das jeweilige Ziel der Untersuchungen. Durch Modelle, bei denen eine einmalige Injektion von NMDA-Rezeptorantagonisten zum Auslösen von Schizophrenie verwendet wird, kann beispielsweise nicht der Zustand einer dauerhaften Fehlfunktion des dopaminergen Systems imitiert werden und eignet sich daher nur bedingt als Vergleichsmodell. Ergebnisse von Studien mit mehrmaligen Injektionen weichen von denen mit einmaliger Applikation stark ab (Jentsch und Roth 1999). Problematisch an Modellen, bei denen Läsionen im Gehirn gesetzt werden ist, dass die Zerstörung oft viel größer ist als sie bei an Schizophrenie Erkrankten im Gehirn zu finden ist.

Bis heute ist keines der Modelle in der Lage alle für Schizophrenie typischen Symptome gleichzeitig auszulösen. Schizophrenie ist ein sehr komplexes Krankheitsbild, welches von genetischen Faktoren als auch vielen verschiedenen Umweltfaktoren beeinflusst wird. Fast alle Modelle lösen die Positivsymptomatik aus, aber nur wenige, wie die Entwicklungsstörungsmodelle oder das Setzen von Läsionen im ventralen Hippocampus, führen ebenso zu kognitiven Fehlfunktionen und der Negativsymptomatik. Gerade für Verhaltensversuche und elektrophysiologische Untersuchungen eignen sich besonders die Entwicklungsstörungsmodelle, da die Ergebnisse nicht durch die Wirkung von Medikamenten oder chirurgische Eingriffe beeinflusst werden.

Limitiert sind die Modelle auch hinsichtlich der genaueren Untersuchungen von bestimmten Symptomen wie z.B. Halluzinationen, welche bei Menschen durch Patientengespräche analysiert werden. Auch die Negativsymptomatik lässt sich am Tier schwer untersuchen. Es muss ebenso bedacht werden, dass sich manche Testergebnisse nicht eindeutig nur auf das Krankheitsbild Schizophrenie übertragen lassen. Defizite im PPI und LI werden beispielsweise auch bei bipolaren Störungen (Perry et al. 2001) und Zwangsstörungen (Hoenig et al. 2005) festgestellt.

Problematisch am Poly(I:C)-Modell ist, dass es keine Möglichkeit gibt die Jungtiere darauf zu untersuchen, ob die Poly(I:C)-Injektion die gewünschten Effekte erzielt hat. Im Gegensatz zu anderen Modellen, die für die pränatale Immunstimulation zum Beispiel Influenzaviren nutzen, geht das auslösende Agens nicht in den Fetus über (Shi et al. 2003). Auch Stress während der Trächtigkeit kann zur Ausbildung bestimmter Verhaltensauffälligkeiten beim Jungtier führen. Ein Vorteil des Poly(I:C)-Modells ist, dass es mit den anderen Schizophrenie auslösenden Faktoren, wie genetischen Veränderungen oder bestimmten Umwelteinflüssen kombiniert werden kann und dadurch eine Verstärkung des Phänotyps erreicht werden kann. Entwicklungsstörungsmodelle sind momentan die führenden Modelle zur Erforschung von Schizophrenie.

### **1.3. Transkranielle Magnetstimulation (TMS)**

#### **1.3.1. Geschichte**

Die ersten Untersuchungen bezüglich der elektrischen Erregbarkeit des Gehirns begannen bereits im 19. Jahrhundert. Gustaf Fritsch und Eduard Hitzig führten in den 1870er Jahren Untersuchungen an der freigelegten Hirnrinde von Hunden durch. Sie stellten fest, dass der nichtmotorische Teil des Gehirns im caudalen Bereich und der motorische Teil eher rostral liegen. Über fokale galvanische Einzelreize konnten Muskelkontraktionen der kontralateralen Seite ausgelöst werden. Eine weitere wichtige Beobachtung war, dass der Anodenschließstrom die niedrigste Reizschwelle aufweist (Fritsch und Hitzig 1870).

Robert Baratholow führte 1874 die ersten Versuche am freigelegten menschlichen Gehirn durch. Ein elektrischer Strom, appliziert über Nadelelektroden in der Dura mater und anschließend im Kortex, löst Kontraktionen verschiedener Muskeln und bei steigender Stromstärke epileptische Anfälle und schließlich das Fallen der Patientin ins Koma aus (Bartholow 1874a und 1874b).

1896 konnte durch den französischen Physiker Jacques Arsenne d'Arsonval gezeigt werden, dass ein starkes niederfrequentes am Gehirn angelegtes elektrisches Feld Wirbelströme im Gewebe auslöst. Er platzierte den Kopf seiner Probanden in einer Induktionsspule. Die Probanden nahmen dabei Phosphene wahr, klagten über Schwindel oder wurden sogar bewusstlos (d'Arsonval 1896).

In den darauffolgenden Jahren wurde allerdings das Augenmerk erst einmal auf die direkte Stimulation gesetzt. Es wurden viele intraoperative Kortexreizungen durchgeführt, vor allem geprägt durch einen der bedeutendsten Neurochirurgen des 20. Jahrhunderts, Harvey Cushing. Er reizte den postzentralen Gyrus und konnte damit auch erstmals sensible Effekte nachweisen (Cushing 1909). Die Reizuntersuchungen von Penfield und Boldrey 1937 legten den Grundstein für die Entwicklung des heute bekannten motorischen und sensiblen Homunculus (Penfield und Boldrey 1937).

Eine Stimulation ohne Eröffnung des Schädels gelang erstmals Gualtierotti und Paterson 1954, zunächst an Affen, dann am Menschen. Mittels einer bipolaren Elektrode an der Kopfhaut wurde der motorische Kortex gereizt, was Muskelkontraktionen auslöste. Aufgrund der hohen Schmerzhaftigkeit war diese Methode jedoch nicht praktikabel (Gualtierotti und Paterson 1954).

Im Jahr 1980 führten Merton und Morton in einem Selbstversuch erstmals eine nicht-invasive transkranielle elektrische Stimulation des Motorkortexes mit einem Hochvoltstimulator durch. Auch hier konnten Muskelzuckungen ausgelöst werden, deren Muskelsummenpotentiale denen von direkter Kortexreizung entsprachen. Auch diese Methode war schmerzhaft und führte zu einer starken Kontraktion der Muskulatur unter den Elektroden, wodurch sie nicht für den Routineeinsatz in Frage kam (Merton und Morton 1980).

Der erste Magnetstimulator für Einzelreize wurde 1965 von Bickford und Fremming entwickelt. Problematisch bei diesem Gerät waren jedoch die langen magnetischen Nachschwingungen (Bickford und Fremming 1965). Im Frühjahr 1985 wurde schließlich durch die Zusammenarbeit von Barker, Jalinous und Freeston an der Universität von Sheffield ein Gerät entwickelt, welches allen Anforderungen entsprach und damit die Grundlage für die Anwendung der transkraniellen Magnetstimulation (TMS) in Forschung und Diagnostik geschaffen (Barker et al. 1985).

Neben dem Stimulationsgerät an sich, war auch die Weiterentwicklung der Spulen von entscheidender Bedeutung. Im Jahr 1989 wurde die achterförmige Doppelspule von der Schweizer Arbeitsgruppe um Rösler entwickelt, um möglichst fokal zu stimulieren. Sie zeigten in Ihren Untersuchungen, dass die Stimulation mit einer Achterspule wesentlich



effektiver und fokaler durchgeführt werden kann, als mit einer Rundspule (Rösler et al. 1989.)

Des Weiteren wurden auch verschiedene Stimulationsprotokolle entwickelt. Zu den Wichtigsten zählt die repetitive TMS (rTMS). Um mehrere aufeinanderfolgende Reize hintereinander applizieren zu können, war es nötig die Reize von zwei Magnetstimulatoren über die gleiche Spule zu entladen. Solch einen Stimulator, der Salven von bis zu 60 Hz abgeben konnte, entwickelte die Firma Cadwell Anfang der 90er Jahre. Durch dieses Protokoll konnten für minutenlang anhaltende Effekte erreicht werden. Die nächste Verbesserung war die Entwicklung des repetitiven Theta-Burst Protokoll (TBS) von J. C. Rothwell. Dessen Vorteil ist, dass nur relativ schwache Reize nötig sind, um einen Effekt zu erzielen und dieser noch langanhaltender ist (Huang et al. 2005).

### 1.3.2. Physikalische Grundlagen

Das Grundprinzip der TMS beruht auf der elektromagnetischen Induktion. Wird ein Wechselstrom an einer Spule angelegt, entsteht ein sich zeitlich veränderndes magnetisches Feld im rechten Winkel zur Spulenoberfläche. Dieses lässt sich durch die Flussdichte  $B$ , angegeben in Tesla (T) und die Feldstärke  $H$ , angegeben in Ampere pro Meter (A/m), charakterisieren. Bildlich dargestellt wird ein magnetisches Feld durch Feldlinien. Die Anzahl der Feldlinien entspricht dem magnetischen Fluss  $\Phi$  (Wb).

Das Magnetfeld kann die Kopfhaut, die Schädeldecke und die Hirnrinde nahezu ungehindert durchdringen, weshalb keine Schmerzrezeptoren aktiviert werden und somit eine schmerzfreie Applikation der Magnetstimulation möglich ist. Durch den geringeren Gewebswiderstand der grauen Substanz gegenüber der Weißen, kommt der Effekt der TMS vor allem in den äußeren kortikalen Arealen zum Tragen. Dies zeigten Edgley et al. 1990 in Untersuchungen an Affen (Edgley et al. 1990). Die Eindringtiefe ist aufgrund der Abnahme der magnetischen Feldstärke mit zunehmendem Abstand von der Spule, begrenzt. Bei kommerziellen Spulen liegt sie bei maximaler Reizintensität bei bis zu 6 cm.

Durch das Magnetfeld entsteht im Gewebe, parallel zur Spulenoberfläche, ein elektrisches Feld. Dieses führt an den Nervenzellen zur De- oder Hyperpolarisation. Wie stark diese ausfällt, hängt vor allem vom räumlichen Gradienten und eher weniger von der Stärke des Feldes ab. Der Gradient sollte in der Richtung des Axons verlaufen. Im Gehirn verlaufen die Axone allerdings nicht gerade, sondern sind gekrümmt wodurch immer ein bestimmter Gradient vorhanden ist. Die maximale Reizung des Gewebes liegt demnach dort, wo das elektrische Feld am stärksten ist. Wird nun die Reizschwelle des Axons überschritten, kommt es zum Auslösen eines Aktionspotentials. Im Gegensatz zur Stimulation eines peripheren Nervs, werden durch die Hirnstimulation eine Vielzahl von verschiedenen Neuronen gleichzeitig gereizt. Innerhalb eines Kortexareals sind die Neurone durch Synapsen miteinander verknüpft. Die Kortexareale untereinander wiederum durch Interneurone und auch zu den subkortikalen Regionen bestehen Verbindungen. Dadurch kann das Auslösen eines Aktionspotentials an einem Neuron einen weitreichenden Effekt haben.

### 1.3.3. Aufbau des Stimulators

Der Magnetstimulator besteht aus 3 Teilen: dem Pulskondensator, einem Hochleistungsthyristor und einer Stimulationsspule. Der Pulskondensator wird mit der gewünschten Spannung (bis 3000 V) aufgeladen, welche sich dann langsam abbaut und dabei als Strom (bis 5000 A) über den Thyristor zur Spule fließt und dort das Magnetfeld aufbaut. Anschließend nimmt die Spannung in der Spule wieder ab und im Kondensator baut sich eine Gegenspannung auf. Die Pulsenergie schwingt zwischen Kondensator und Spule

hin und her, was als elektrischer Schwingkreis bezeichnet wird. Die Spannung folgt der Form einer Kosinusfunktion, die Stromstärke der einer Sinusfunktion. Die Dauer des Auf- und Abbaus der Feldenergie liegt bei 50–100  $\mu\text{s}$ .

Bei monophasischen Stimulatoren ändert sich die Polarität nicht, die Spannung fließt nicht zurück in den Kondensator, sondern wird über einen Widerstand und eine Diode abgebaut, was jedoch eine starke Wärmebildung und einen hohen Energieverbrauch zur Folge hat.

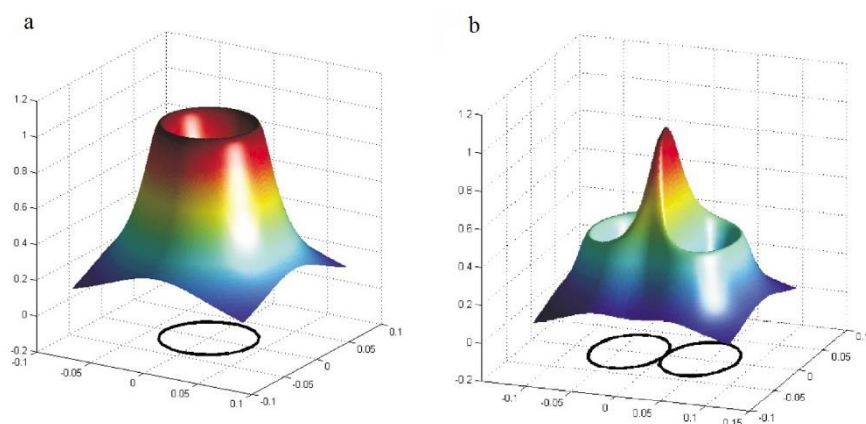
Bei biphasischen Stimulatoren wird ein zweiter Thyristor eingebaut, der bereits nach einer Halbwelle den Stromfluss unterbricht. Die Energie wird zurück in Kondensator gespeist, woraus eine geringere Wärmebildung und niedrigerer Energieverbrauch resultieren. Bei repetitiven Stimulatoren werden biphasische Stimulatoren verwendet, um eine Frequenz von bis zu 100 Hz zu erreichen.

#### 1.3.4. Stimulationsspulen

Benutzt werden zwei verschiedene Spulentypen: die Rundspule und die Achterspule, auch achtförmige oder Doppelspule genannt. Oft besitzen diese einen ferromagnetischen Kern.

Die Rundspule war die als erstes entwickelte Spule. Das Maximum des Magnetfelds befindet sich im Zentrum der Spule, das des induzierten elektrischen Feldes hingegen folgt ringförmig dem Spulenaufbau. Hieraus resultiert, dass genau unter dem Zentrum der Spule keine Reizung des Gewebes erfolgt. Mit ihr ist eine genaue fokale Stimulation nicht möglich. Der induzierte Strom verläuft in entgegengesetzter Richtung zum Strom in der Spule.

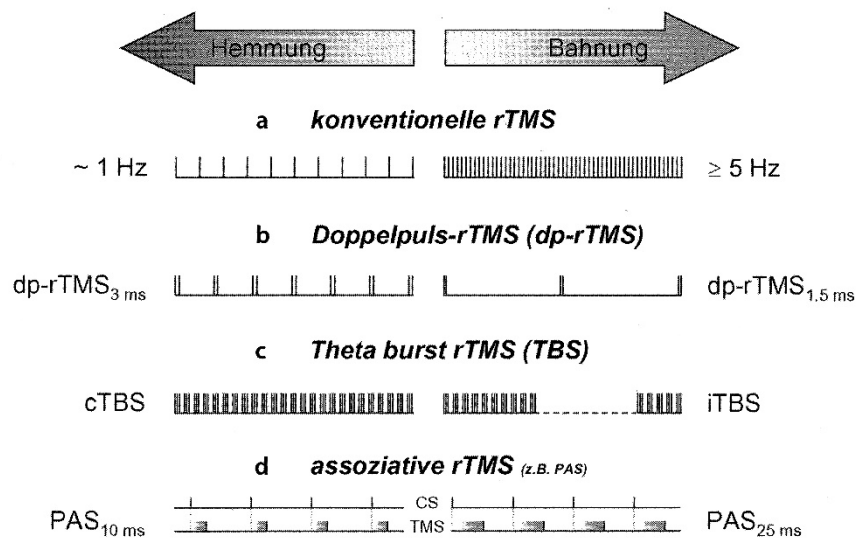
Die Achterspule besteht aus zwei nebeneinander angeordneten Rundspulen. Der Stromfluss läuft in beiden Teilen entgegengesetzt, wodurch sich die induzierten elektrischen Felder am Berührungspunkt summieren. Dadurch befindet sich das Maximum des elektrischen Feldes in der Mitte der Spule. Mit dieser Spule ist die Stimulation eines sehr kleinen Areals möglich, wodurch sie in Forschung und Diagnostik vielseitig einsetzbar ist.



**Abb. 1.1.** Verteilung der elektrischen Feldstärke a) einer Rundspule b) einer Doppelspule (verändert nach Kammer und Thielscher 2003)

### 1.3.5. Repetitive transkranielle Magnetstimulation

Bei der rTMS werden die Pulse in einer bestimmten zeitlichen Abfolge wiederholt verabreicht. Hierbei unterscheidet man zwischen verschiedenen Protokollen. Bei der konventionellen rTMS wird eine Reizserie von mehr als zwei Einzelreizen appliziert. Dabei wird zwischen „hochfrequenter“ rTMS mit einer Wiederholungsrate von mehr als 5 Hz und „niederfrequenter“ mit einer Wiederholungsrate von ungefähr 1 Hz, differenziert (Wassermann 1998). Je nach Frequenz ist die Auswirkung auf die neuronalen Strukturen verschieden. Stimuliert man hochfrequent wird die kortikale Erregbarkeit erhöht, stimuliert man niederfrequent, sinkt diese (Chen et al. 1997). Bei der Doppelpuls-rTMS werden repetitiv Paare von Stimuli verabreicht. Werden zwei neuronale Strukturen in einem zeitlich gleichbleibenden Abstand nacheinander stimuliert, spricht man von der paarig-assoziativen Stimulation (PAS). Das wichtigste Protokoll der rTMS ist die TBS. Dabei werden alle 200 ms drei Pulse im Abstand von 20 ms, sogenannte Bursts, appliziert. Je nachdem, ob die Stimulation intermittierend oder kontinuierlich erfolgt, entsteht eine erregende oder hemmende Wirkung der Stimulation (Huang et al. 2005).



**Abb. 1.2.** Verschiedene Stimmulationsprotokolle der rTMS a) konventionelle rTMS niederfrequent (1 Hz) und hochfrequent ( $\geq 5 \text{ Hz}$ ) b) Doppelpuls-rTMS mit Interstimulusintervallen von 1,5 ms und 3 ms c) kontinuierliche und intermittierende TBS d) assoziative rTMS mit Interstimulusintervallen von 10 ms und 25 ms (nach Siebner und Ziemann 2007)

### 1.3.6. Anwendung der TMS

Eine der ersten praktischen Anwendungen der TMS bestanden darin, motorisch evozierte Potentiale (MEP) auszulösen und darüber die kortikospinalen motorischen Bahnen zu untersuchen. MEPs sind Spannungsänderungen in der Muskulatur, welche durch eine Reizung des primären motorischen Kortexes entstehen. Da, im Gegensatz zur Stimulation eines einzelnen peripheren Nervs, bei dem das Aktionspotential eine synchrone Aktivierung der motorischen Einheiten auslöst, durch die TMS eine Vielzahl von kortikalen, spinalen und neuromuskulären Neuronen, Interneuronen und Synapsen beeinflusst werden, entsteht eine

zeitversetzte Antwort an den einzelnen motorischen Einheiten. Die Potentiale addieren sich und heben sich gegenseitig auf, wodurch eine geringere Amplitude, eine längere Dauer und eine andere Form der Kurven als bei Muskelsummenpotentialen entstehen. Die Aufzeichnung der Reaktion auf die Stimulation erfolgt als Muskelaktionspotential. Beurteilt wird das MEP klinisch dann vor allem hinsichtlich Amplitude und Latenz. Bei Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Amyotrophe Lateralsklerose, Parkinson, Myelopathien und Epilepsie sind Veränderungen im MEP sichtbar (Barker et al. 1986). Nach einem Schlaganfall ist es möglich durch ein MEP eine Aussage über die Prognose zu treffen. Bei Patienten mit psychischen Erkrankungen, wie Schizophrenie und Depressionen, wurden ebenfalls Veränderungen im MEP festgestellt (Samii et al. 1996, Shajahan et al. 1999, Reid et al. 2002).

Relativ früh wurde der rTMS eine antidepressive Wirkung zugesprochen. R. G. Bickford beschrieb nach Eigenversuchen 1986 eine stimmungsaufhellende Wirkung. Daraufhin wurden viele Studien durchgeführt, die die antidepressive Wirkung nachwiesen (Höflich et al. 1993, George et al. 1995). Eine Analyse von Einzelstudien zeigt jedoch, dass die Ergebnisse sehr variabel ausfallen, aber zumindest eine Symptomreduzierung nach rTMS festzustellen ist (Herrmann et al. 2006). Heute wird rTMS entweder in der Primärtherapie in Kombination mit antidepressiver Medikation angewendet, um das Ansprechen auf die Antidepressiva zu erhöhen oder bei therapieresistenten Depressionen. Die Resultate sind weiterhin sehr unterschiedlich.

Bei Schizophrenie werden mit niederfrequenter rTMS die therapieresistenten akustischen Halluzinationen behandelt. Positive Ergebnisse gab es hauptsächlich bei Studien mit einer hohen Pulszahl von mehr als 10.000 Pulsen (d'Alfonso et al. 2002, McIntosh et al. 2004, Fitzgerald et al. 2005, Poulet et al. 2005).

Da durch die Studien an Menschen die Effekte der TMS auf zellulärer Ebene nicht ausreichend zu untersuchen sind, wurden auch vermehrt tierexperimentelle Untersuchungen durchgeführt. Ein Problem hierbei stellt der Größenunterschied zwischen den Gehirnen dar. Es ist selbst mit kleinen Spulen nicht möglich, ein bestimmtes Kortexareal genau zu stimulieren und auch die Effizienz der Stimulation nimmt mit Abnahme des Radius des Gehirns ab (Weissmann et al. 1992). Keck et al. zeigten über Verhaltenstests, dass die Anwendung von rTMS einen antidepressiven Effekt haben kann, wobei eine hochfrequente rTMS einen stärkeren Effekt als die niederfrequente verursacht (Keck et al. 2001). Eine Untersuchung an Rennmäusen zur Gedächtnisbildung zeigte, dass die rTMS Applikation nach einem Training die Ausbildung des Kurzzeitgedächtnisses stört, die Wirkung aber nur etwa 30 min anhält (Wang et al. 2006).

### **1.3.7. Nebenwirkungen**

Vor allem in den ersten Jahren nach der Entwicklung der TMS gab es noch große Bedenken bezüglich möglicher Nebenwirkungen der Stimulation. Die am häufigsten berichtete Nebenwirkung sind Spannungskopfschmerzen. Bei der Anwendung von rTMS mit hoher Intensität und Frequenz wurden in einigen Studien, vor allem bei vorbelasteten Patienten, epileptische Anfälle ausgelöst (Höfberg et al. 1989, Classen et al. 1995). Aber auch bei Menschen, welche im Vorfeld keine neurologischen Auffälligkeiten zeigten, konnten Anfälle ausgelöst werden (Pascual-Leone et al. 1992). Die Einnahme von Medikamenten kann die Wirkung der TMS ebenfalls beeinflussen (Conca et al. 2000). Auf Grund dieser Ergebnisse wurden bestimmte Sicherheitsrichtlinien für Intensität, Frequenz und Dauer festgelegt (Wassermann et al. 1998). Des Weiteren empfinden manche Patienten das bei der Applikation der TMS auftretende, laute Knackgeräusch als unangenehm. Eine schädliche Langzeitwirkung kann bisher nicht beobachtet werden (George et al. 1999).

### 1.3.8. Zelluläre Wirkung

Die genauen zellulären Wirkmechanismen der TMS sind bis heute größtenteils ungeklärt. Der Zweitbetreuer dieser Arbeit, Prof. Dr. Klaus Funke der Ruhr-Universität Bochum, ist führend auf diesem Forschungsgebiet. Er konnte mit Hilfe von Rattenmodellen zeigen, dass die Expression von Calcium-bindenden Proteinen je nach TMS Protokoll unterschiedlich beeinflusst wird. Nach einer intermittierenden Theta-Burst Stimulation (iTBS) ist die Expression von PV verringert, CB und Calretinin (CR) hingegen sind unverändert. Ein Tag nach iTBS Applikation gleicht sich die PV Konzentration wieder etwas dem Ausgangswert an, allerdings ist bis 7 Tage nach der Stimulation eine Abweichung zu erkennen. Nach einer kontinuierlichen TBS (cTBS) kommt es zu einer Erniedrigung der CB Expression, dieser Effekt ist allerdings nur 24 h zu erkennen. PV wird hier kaum beeinflusst (Benali et al. 2011). Eine Studie zum Zeitverlauf der Expression verschiedener Aktivitätsmarker nach iTBS von Hoppenrath et al. zeigten einen Anstieg der Expression von cFos, zif268 und GAD 65 nach 10–20 min, eine Reduktion von GAD 67, PV und CB nach 40–80 min und nach 160 min schließlich einen Abfall von GAD 65 und cFos (Hoppenrath und Funke 2013). Jazmati et al. zeigten neben einer Reduktion der PV Expression nach iTBS einen gleichzeitigen Anstieg der Neuropeptid Y Expression (Jazmati et al. 2018). Neuropeptid Y kommt im Nervengewebe vor und beeinflusst die synaptische Signalübertragung.

Das Alter der Tiere kann einen Einfluss auf den TMS Effekt haben. Die Reduktion der PV Expression nach iTBS konnte bei Ratten erst nach dem 32. Lebensstag, mit einem Höhepunkt am 40. Lebensstag, festgestellt werden, wenn sich das perineurale Netzwerk entwickelt (Mix et al. 2015). In elektrophysiologischen Untersuchungen konnte dies bestätigt werden. Mit zunehmendem Alter der Ratten wurde wieder eine verringerte Erregbarkeit festgestellt (Hoppenrath et al. 2016). Auch Unterschiede in der Wirkung der rTMS zwischen verschiedenen Rattenzuchtlinien sind sichtbar (Mix et al. 2014). Eine weitere Studie von Mix et al. beschäftigte sich mit dem Einfluss der TBS auf das Lernverhalten der Tiere. Hier konnte gezeigt werden, dass iTBS die Lernleistung verbessert, cTBS hingegen keinen Einfluss hat (Mix et al. 2010).

#### **1.4. Ziel der Arbeit**

Aufgrund der großen Lebenszeitprävalenz und hohen Rückfallrate bei Schizophrenie ist die Forschung weiterhin bestrebt, eine alternative Behandlungsmöglichkeit zu Pharmakotherapie und Psychotherapie zu finden. Die TMS gilt hierbei als sehr vielversprechend. Wie einige Studien zeigten, ist die Wirkung der TMS mit hoher Wahrscheinlichkeit während der Entwicklung der neuronalen Strukturen am effektivsten (Mix et al. 2015, Hoppenrath et al. 2016), weshalb in diesem Projekt die Stimulation der Ratten noch vor der Pubertät erfolgt. Ziel der Arbeit ist es zu untersuchen, ob die frühe iTBS bei durch die Poly(I:C)-Behandlung vorbelasteten Tieren Einfluss auf den Verhaltensphänotyp im Erwachsenenalter nehmen kann. Durch diese Vorgehensweise kann des Weiteren die Langzeitwirkung der iTBS, sowohl bei Poly(I:C)-Tieren als auch bei NaCl-Kontrolltieren, genauer untersucht werden. Der Verhaltensphänotyp der Tiere wird durch eine Reihe an Verhaltensversuchen bestimmt. Um die Langzeitwirkung auf zellulärer Ebene zu analysieren, wird eine Immunhistochemie (IHC) von bestimmten Regionen des Gehirns, welche eine bedeutende Rolle in Lernverhalten, Gedächtnisbildung, Ängstlichkeit, Emotionen und Motivation spielen, angefertigt. Immunhistochemisch dargestellt werden die Markerproteine NeuN, PV, CB, cFos, GAD 67 und BDNF. Sie geben Hinweise auf Veränderungen in der neuronalen Aktivität und Plastizität und ermöglichen damit einen Vergleich zwischen Poly(I:C)-Tieren und Kontrolltieren. Dieser Teil der Arbeit trägt wesentlich zur Entschlüsselung der noch weitestgehend unbekanntem zellulären Wirkmechanismen der TMS bei.

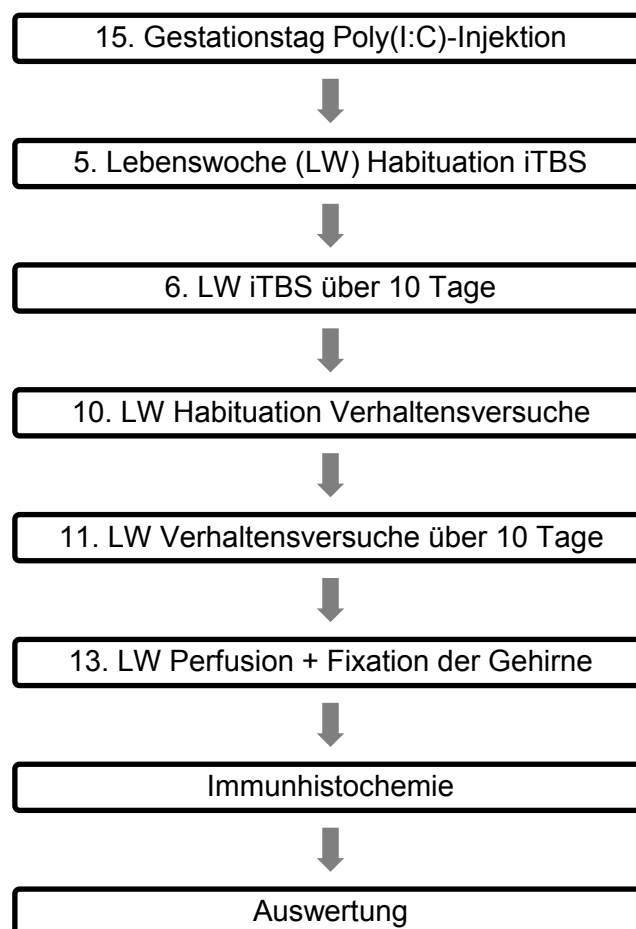
Das weitergehende Ziel dieser Arbeit ist im Rattenmodell herauszufinden, ob die TMS translational möglicherweise eine Behandlungsoption für Kinder darstellt, welche aus prädisponierten Familien stammen. Durch eine TMS Applikation vor der Pubertät könnte die Ausprägung des Krankheitsbildes Schizophrenie abgeschwächt oder im besten Fall verhindert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Ethikstatement

Alle Tierversuche sind von der zuständigen Behörde, dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Recklinghausen unter dem Aktenzeichen 84-02.04.2014.A294 zum 17.11.2014 genehmigt. Es wurde sich jederzeit streng an die Vorgaben der Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere sowie an das Tierschutzgesetz, die Tierschutz-Versuchstierverordnung und die Richtlinien der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) gehalten.

### 2.2. Studiendesign



**Abb. 2.1.** Zeitlicher Ablauf der Versuche

Die Versuche beginnen am 15. Gestationstag mit der Injektion von Poly(I:C) oder NaCl in die Schwanzvene des trächtigen Muttertiers. Sind die Jungtiere 5 Wochen alt, werden sie an den Menschen, die Versuchsräume und die iTBS gewöhnt. Ab der 6. LW erfolgt über 10 Tage die iTBS Behandlung. In der 10. LW werden die Tiere an die Verhaltensversuche gewöhnt, welche anschließend ab der 11. LW über 10 Tage durchgeführt werden. Im Alter von 13 Wochen werden die Tiere perfundiert, die Gehirne entnommen und für die folgende

Immunhistochemie fixiert. Nach dem Abschluss der Tierversuche wird die Immunhistochemie angefertigt und diese und die Verhaltensversuche ausgewertet.

### **2.3. Versuchstiere und Gruppen**

Für die Versuche werden ausschließlich männliche Wistar Ratten verwendet, welche in der zentralen Versuchstierhaltung der medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum geboren werden. Die tragenden Muttertiere stammen von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) und werden am 13. Gestationstag eingestallt. Die Jungtiere werden einzeln bis in 4er Gruppen in Makrolonkäfigen Typ IV mit den Maßen 59 cm x 38 cm x 21 cm in Tierhaltungsschränken mit Filtersystem gehalten. Die Temperatur beträgt zwischen 21 und 23 °C. Für bestimmte Versuche werden sie vorübergehend in Einzelkäfige Typ III mit den Maßen 43 cm x 26 cm x 19 cm gesetzt. Der Tag-Nacht-Rhythmus beträgt 12 h, wobei das Licht von 6 bis 18 Uhr eingeschaltet ist. Innerhalb dieses Zeitraums werden alle Experimente durchgeführt, um die Tiere nicht in ihren Ruhephasen zu stören. Futter- sowie Wasseraufnahme ist den Ratten ad libitum möglich. Gefüttert wird das pelletierte Versuchstierfutter Ratte/Maus-Haltung (V1534-000) der Firma Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest. Die Tiere sind zwischen 5 und 13 Wochen alt und haben ein Anfangsgewicht zwischen 105 g und 159 g. Die iTBS Behandlung beginnt im Alter von 6 Wochen, die Verhaltensversuche im Alter von 11 Wochen.

Die Einteilung der Tiere erfolgt randomisiert in 4 Vergleichsgruppen: Poly(I:C) mit iTBS Behandlung (Verum; n=14), Poly (I:C) ohne iTBS (Sham; n=13) sowie NaCl mit iTBS Behandlung (NaCl Verum; n=12) und NaCl ohne iTBS (NaCl Sham; n=12). Die Gesamtanzahl beträgt 51 Ratten.

### **2.4. Poly(I:C)-Injektion**

Dem trächtigen Muttertier wird am 15. Gestationstag Poly(I:C) injiziert. Benutzt wird das Poly(I:C) P1530 von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) in einer 0.4 %igen Lösung verdünnt mit NaCl. Für die Injektion werden die Tiere mit Isofluran in einem Exsikkator in Narkose gelegt und anschließend in einem Restraîner fixiert. Die Injektion von 1 ml/kg der 0.4 %igen Poly(I:C)-Lösung erfolgt in eine der Schwanzvenen. Die Kontrolltiere erhalten eine Injektion von 1 ml/kg steriler NaCl-Lösung.

### **2.5. Intermittierende Theta-Burst-Stimulation**

Um eine fehler- und stressfreie TMS Anwendung zu ermöglichen, werden die Tiere in der 5. Lebenswoche täglich an den Kontakt zum Menschen, die Versuchsräume und das TMS Gerät gewöhnt. Hierbei lernen sie für 5 min still unter der Magnetspule zu sitzen. Im Alter von 6 Wochen beginnt über 10 Tage die Behandlung mit TMS. Verwendet wird das Gerät Rapid 2 von Magstim (Whitland, US) mit einer Achterspule. Der Kopf der Ratte wird mittig unter dem Spulenzentrum platziert, wo sich das Maximum des elektrischen Feldes befindet und mit den Fingern in Position gehalten. Der Abstand zur Spule ist so gering zu halten, dass das Fell die Spule berührt, die Kopfhaut jedoch nicht. Die Stimulationsrichtung ist lateromedial. Ziel ist es, die Neurone des Corpus callosum zu stimulieren. Verwendet wird ein Protokoll repetitiver, intermittierender Stimulation, die iTBS, bei dem in 3 Blöcken à 600 Pulse alle 20 min (Pulsanzahl: 3, Burstanzahl: 10, Burstfrequenz: 4 Hz, Frequenz: 50 Hz) stimuliert wird. Zwischen den einzelnen Blöcken wird die Ratte wieder zurück in den Käfig gesetzt. Mit den Sham-Tieren wird ebenso verfahren, allerdings mit einem Abstand von ca. 15 cm zur Magnetspule.



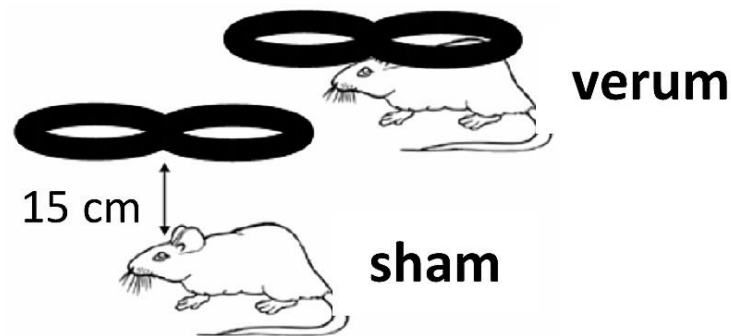


Abb. 2.2. Positionierung der Ratte unter der Magnetspule zur iTBS

## 2.6. Verhaltensversuche

### 2.6.1. Elevated Plus Maze (EPM)

Das plusförmig gebaute Labyrinth besteht aus 2 offenen und 2 geschlossenen sich gegenüberliegenden Armen aus grauen Plastikplatten. Die geschlossenen Arme sind 90 cm lang, 8 cm breit und haben eine seitliche Begrenzung von 19 cm Höhe. Die Offenen sind 90 cm lang und 20 cm breit. In der Mitte befindet sich eine Plattform von 20 cm x 20 cm. Das Labyrinth ist in einer Höhe von 62 cm angebracht.

Die Ratte wird in die Mitte des Kreuzes mit dem Kopf zu einem der offenen Arme zeigend gesetzt. Nun wird über einen Zeitraum von 5 min ihr Verhalten im Labyrinth mit einer Kamera auf Video aufgenommen. Ausgewertet wird anschließend das Verhältnis der verbrachten Zeit in den offenen zu der in den geschlossenen Abschnitten.

### 2.6.2. Novel Object Recognition (NOB)

Benutzt wird eine oben offene graue Plastikbox mit den Maßen B 85 cm x T 85 cm x H 45 cm und einer Wandstärke von 1 cm. Als Objekte dienen ein grüner Zylinder mit einem Durchmesser von 10 cm, ein gelber Quader mit einer Kantenlänge von 8 cm, ein blaues dreiseitiges Prisma mit einer Kantenlänge von 9 cm und ein rotes sechseckiges Prisma mit einer Kantenlänge von 5.5 cm. Alle Objekte sind 20 cm hoch. Die äußere Ummantelung besteht aus Plastik. Die Aufzeichnung des Versuches erfolgt mit einer Videokamera und dem Programm Pinnacle Studio 10.6.

Um die Tiere an die Umgebung zu gewöhnen, werden sie in der Woche vor dem eigentlichen Test für 45 min in die leere Kiste gesetzt. Zum Versuch werden 2 verschiedene Objekte in die Kiste gestellt, zwischen welche die Ratte mittig gesetzt wird. Für 10 min wird das Verhalten der Ratte mit der Kamera aufgezeichnet. 1 h nach dem ersten Durchgang erfolgt der Zweite, bei dem ein Objekt ausgetauscht wird. Wiederum 24 h später erfolgt der dritte Durchgang, bei dem das zuvor neue Objekt wiederum durch ein anderes ausgetauscht wird. Um eine Präferenz für ein bestimmtes Objekt auszuschließen, wird für jede Ratte eine andere Abfolge der Objekte gewählt (siehe Anhang, Tab. 1).

Gemessen wird, wie lange sich die Ratte mit den jeweiligen Objekten beschäftigt und anschließend der Diskriminations-Index (DI) mit folgender Formel berechnet:

$$DI = \frac{t_{\text{neu}} - t_{\text{alt}}}{t_{\text{neu}} + t_{\text{alt}}}$$

Hierbei entspricht  $t_{\text{neu}}$  der Beschäftigungsdauer mit dem neuen Objekt und  $t_{\text{alt}}$  der Beschäftigungsdauer mit dem alten Objekt.

### **2.6.3. Porsolt Forced Swim Test (PF)**

Für den Porsolt Forced Swim Test (PF) werden 2 Acrylglaszylinder mit einer Höhe von 50 cm und einem Durchmesser von 20 cm benutzt. In diese wird 30 cm hoch Wasser mit einer Temperatur von  $25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  gefüllt. Im ersten Durchgang werden die Ratten für 15 min in das Wasser gesetzt. 24 h später folgt der zweite Durchgang, mit einer Dauer von 5 min. Um Zeit zu sparen, werden immer 2 Ratten gleichzeitig getestet. Dazu werden die beiden Acrylglaszylinder nebeneinander platziert, jedoch durch eine Sichtschutzwand aus Pappe voneinander abgetrennt, um eine gegenseitige Beeinflussung zu vermeiden. Der Versuch wird auf Video aufgezeichnet und anschließend die Zeiten gemessen, wie lange die Ratten aktiv schwimmen und tauchen oder sich treiben lassen und daraus der Anteil der Immobilität berechnet.

### **2.6.4. Morris Water Maze (WM)**

Benutzt werden ein rundes, schwarzes Wasserbassin mit einem Durchmesser von 180 cm und einer Höhe von 61 cm und eine durchsichtige 30.5 cm hohe Plattform aus Acrylglas mit einem Durchmesser von 12 cm. Das Bassin wird in 4 Viertelkreise als Sektoren eingeteilt. Zentral an der Innenwand angebrachte rechteckige Markierungen mit gelb-schwarzen Symbolen sollen den Ratten zur Orientierung dienen. Hierbei befinden sich im Norden senkrecht angebrachte schwarze Streifen auf gelbem Grund, im Osten ein gelber Kreis auf schwarzem Grund, im Süden waagrecht angebrachte schwarze Streifen auf gelbem Grund und im Westen ein gelbes Kreuz auf schwarzem Grund.

Der Versuch wird mit einer Kamera und dem daran gekoppelten Water Maze Tracking Programm aufgezeichnet. Hierfür werden die Sektoren in 4 Farben (Nord = gelb, Ost = grün, Süd = blau, West = rot) und die Plattform als schwarzes Quadrat dargestellt. Für die Ratten wird ein passendes Farbspektrum aus verschiedenen Grautönen angelegt. Das Programm verfolgt automatisch die Bewegung der Ratte und zeichnet diese über den Zeitverlauf auf. Ein selbst geschriebenes Programm errechnet daraus die Dauer des Aufenthalts in den verschiedenen Sektoren, die zurückgelegte Gesamtstrecke, den mittleren Abstand zum Zentrum und zum Ziel und den Verhaltenstyp.

Die Versuchsdauer beträgt 5 Tage. Die Plattform befindet sich immer am gleichen Standort im Bassin (mittig im nördlichen Sektor). Am ersten Tag hat das Wasser eine Füllhöhe von ca. 29.5 cm, sodass sich die Plattform knapp oberhalb des Wassers befindet und von der Ratte gesehen werden kann. Es gibt 4 Durchgänge pro Ratte mit einer Pausenzeit von 1 h. In jedem Durchgang wird die Ratte in einen anderen Sektor in das Wasser gesetzt. Wird die Plattform gefunden, wird die Zeit gestoppt. Hat die Ratte nach dem Ablauf von 90 s die Plattform nicht gefunden, wird sie durch plätschern auf der Wasseroberfläche zu ihr geführt. Anschließend werden ihr 20 s bis 30 s Zeit gegeben um sich umzuschauen und die Umgebung einzuprägen.

An den Tagen 2 bis 4 wird die Wasserfüllhöhe auf ca. 31.5 cm erhöht, sodass die Plattform nun knapp unterhalb des Wassers liegt. Es werden wieder 4 Durchläufe pro Ratte durchgeführt, bei denen die Reihenfolge der Startpositionen variiert. Am letzten Tag wird die Plattform entfernt. In einem einzigen Durchgang wird nun über 90 s aufgezeichnet, wie oft die Ratten die Plattform gefunden hätte.

Immer wenn die Ratten aus dem Wasser geholt werden, werden sie anschließend abgetrocknet und 1 h auf Heizmatten und unter Rotlicht zum Trocknen gesetzt.

### **2.6.5. Sucrose Consumption Test (SC)**

Für den SC wird gezuckerte Kondensmilch der Marke Milchmädchen mit Leitungswasser in einem Verhältnis von 1:3 gemischt und in die den Tieren bekannten Trinkflaschen gefüllt. Eine Woche vor dem eigentlichen Test werden die Ratten an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Dazu werden sie für 1 h in einen Einzelkäfig, in dem eine Flasche mit dem gezuckerten Wasser vorhanden ist, gesetzt. 24 h vor Testbeginn wird das Futter bis auf 15 g pro Tier entfernt, die Wasseraufnahme ist weiterhin ad libitum erlaubt.

Bevor der Test startet werden das Gewicht der Milchflaschen und das der Ratten aufgenommen. Anschließend werden die Ratten in die Einzelkäfige gesetzt und haben 5 min Zeit zur Habituation. Dann wird ihnen das gezuckerte Wasser für 15 min angeboten. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Ratten und die Flaschen erneut gewogen und die prozentuale Gewichtszunahme berechnet.

### **2.6.6. Pre-Pulse Inhibition Test (PPI)**

Die Ratte wird in einen 22.5 cm x 9 cm x 9 cm großen Metallkäfig gesetzt und mit diesem mittig zwischen zwei Lautsprecher in eine schalldichte Kiste mit den Maßen von 50 cm x 50 cm x 50 cm gestellt. In der Kiste herrscht ein permanentes Grundrauschen von 65 dB, welches durch Töne unterschiedlicher Lautstärke unterbrochen wird. Bevor die eigentliche Testphase beginnt, haben die Tiere 5 min Zeit sich an die Versuchsbedingungen zu gewöhnen. Die Versuchsdauer beträgt 40 min und beinhaltet 10 Trials, wobei jeder aus 8 verschiedenen Pre-Pulse – Startle Kombinationen besteht, welche im Abstand von 25 s  $\pm$  5 s aufeinander folgen (siehe Tab. 2.1.). Im Vorfeld werden 10 Teststartlepulse gegeben. Der Abstand zwischen Pre-Pulse und Startle beträgt 100 ms, die Dauer der Pulse 20 ms.

Die Korrektheit der eingestellten Lautstärken wird mittels Schallpegelmessgerät von Voltcraft im Voraus überprüft. Über eine Detektorplatte unter dem Metallkäfig werden die Bewegungen der Ratte als Reaktion auf die Töne mit der Software Spike2 Version 3.21 aufgezeichnet. Ausgewertet wird mittels eines selbst geschriebenen Programms die Stärke der Reaktion der Ratte und daraus die Inhibition berechnet.

Nr.	Kombination	Lautstärke
0	pure Startle Pulse	100 dB
1	Pre-Pulse low + Startle	69 dB + 100 dB
2	Pre-Pulse medium + Startle	73 dB + 100 dB
3	Pre-Pulse strong + Startle	83 dB + 100 dB
4	no Pulse at all	
5	pure Pre-Pulse low	69 dB
6	pure Pre-Pulse medium	73 dB
7	pure Pre-Pulse strong	83 dB

**Tab. 2.1.** Pre-Pulse – Startle Kombinationen mit dazugehöriger Lautstärke

## 2.7. Perfusion

Eine Woche nach den Verhaltensversuchen werden die Ratten perfundiert. Dafür werden sie erst über die Inhalation von Isofluran im Exsikkator und dann über eine Pentobarbitalinjektion (Narcoren© 300 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal (i.p.)) anästhesiert. Sobald die Tiere keinen Lidschlussreflex und keinen Tiefenschmerz mehr zeigen, wird der Thorax eröffnet. Nach der Freilegung des Herzes durch die Eröffnung des Perikards wird der linke Ventrikel mit einem kleinen Schnitt eröffnet und eine Spinalkanüle eingeführt. Über 5 min erfolgt nun eine intrakardiale Perfusion mit Ringer-Lösung, die zusätzlich mit 5.000 I.E. Heparin versetzt ist. Anschließend wird das Gewebe über eine 25-minütige Perfusion mit 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) in Phosphatpuffer (PBS, pH 7.4) fixiert. Zum Druckausgleich wird der rechte Ventrikel mit einem kleinen Schnitt eröffnet. Nach einer Ruhezeit von 1 h wird das Gehirn vorsichtig aus dem Schädel heraus präpariert und in einem mit PFA gefüllten Röhrchen für 24 h bei 4 °C nachfixiert und anschließend in 30 %ige Saccharose-PBS Lösung kryoprotectiert. Eine Woche später werden die Gehirne mit einem Mikrotom (Kryomat 1703, Leica, Solms, Deutschland) in 30 µm dicke Frontalschnitte geschnitten.

## 2.8. Histologie

### 2.8.1. Nissl Färbung

Die Nissl-Färbung ist eine Übersichtsfärbung, bei der basische Farbstoffe wie Kresylviolett, Toluidinblau oder Thionin an saure Bestandteile der Zellen, wie RNA und DNA, binden. Dadurch kommt es zur Violett- oder Blaufärbung von Zellkernen und Ribosomen. Angewendet wird die Färbung vor allem bei Nervengewebe, da Nervenzellen viel raues endoplasmatisches Retikulum enthalten, welches als sogenannte Nissl-Schollen angefärbt wird.

Für diese Färbung wird jeder 12. Schnitt eines Gehirns auf einen mit Chromalaungelatine beschichteten Objektträger aufgezogen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgt das Entfetten über eine absteigende Alkoholreihe. Dazu werden die Objektträger für jeweils 3 min zweimal in Xylol, in Isopropanol, zweimal in 100 %igen Ethanol

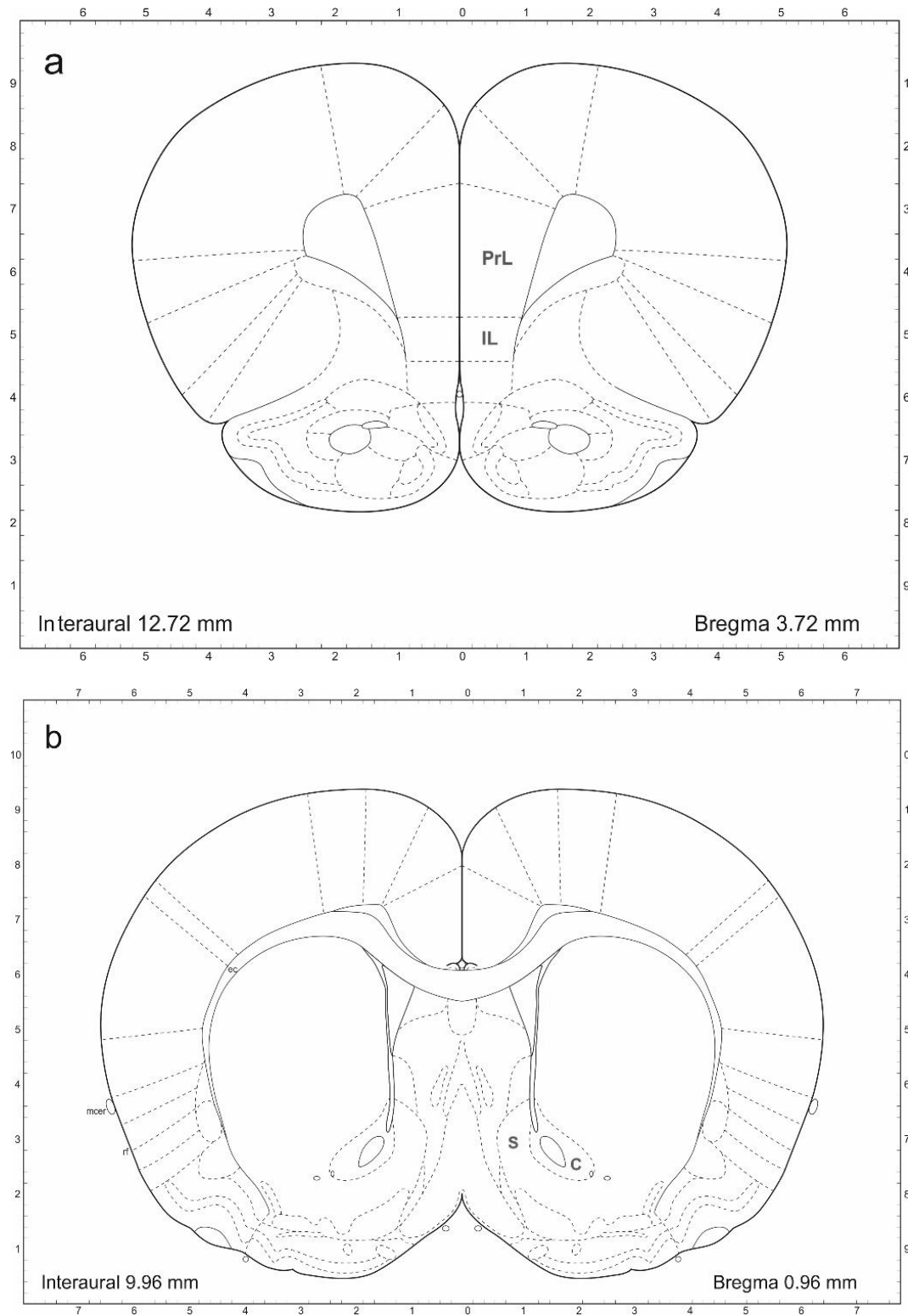
und abschließend in 70 %igen Ethanol gestellt. Die Objektträger werden danach in Aqua destillata (Aqua dest.) ab gespült und für 3 min in einer 0.1 %igen Kresylviolett-Lösung gefärbt. Es folgt ein weiterer Spülgang in Aqua dest. zur Auswaschung der überschüssigen Farbe. Anschließend werden die Schnitte in eine aufsteigende Ethylalkoholreihe, bestehend aus 70 %igem Ethanol, zweimal 100 %igem Ethanol und Isopropanol differenziert und gleichzeitig dehydriert. Zuletzt werden die Objektträger zweimal 3 min in Xylol geklärt und mit dem Eindeckmittel Depex eingedeckt.

Die Nissl-Färbung dient der Beurteilung der Qualität der Schnitte und der Auswahl der richtigen Schnittebenen, welche die für die IHC relevanten Regionen abbilden.

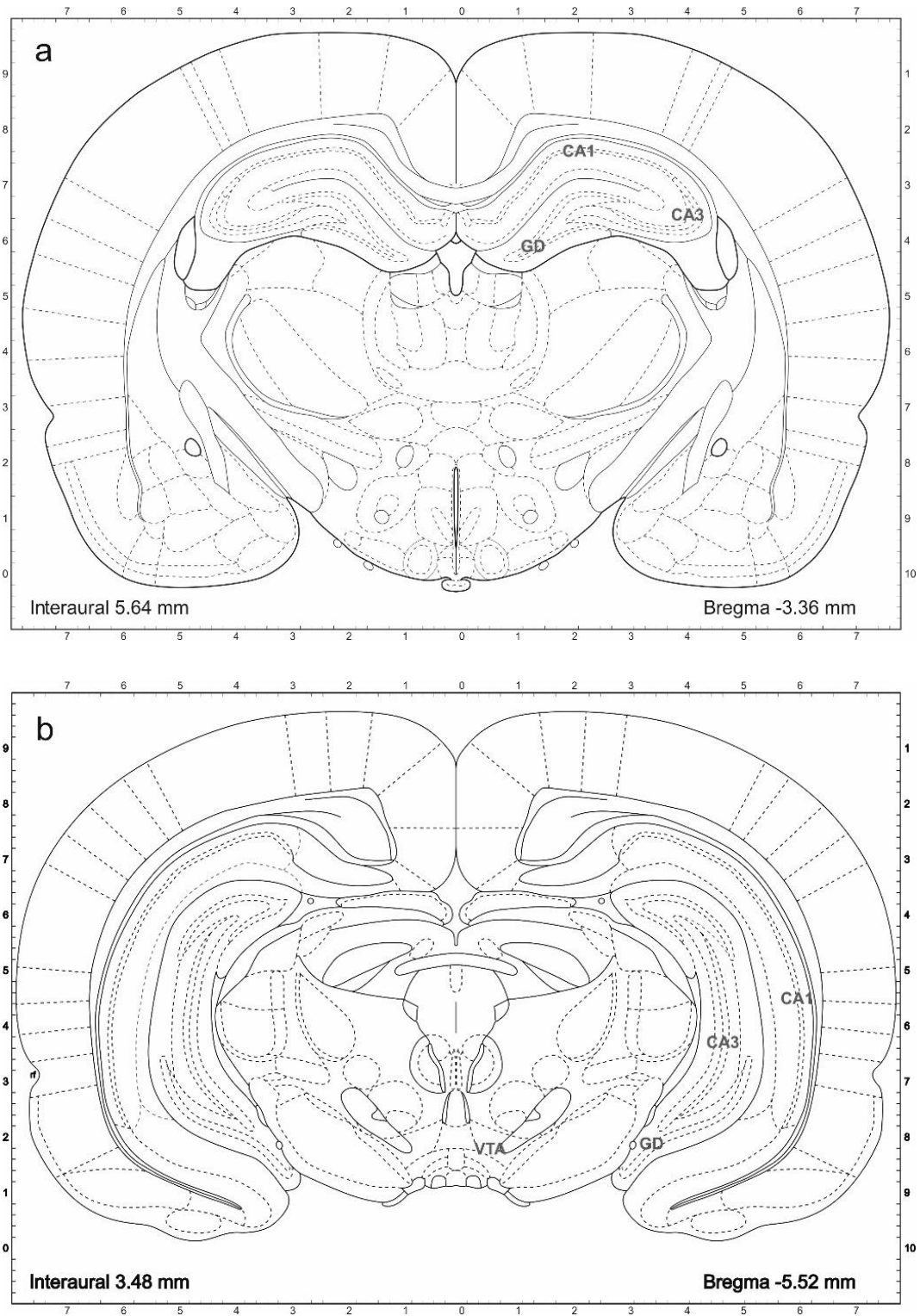
### **2.8.2. Untersuchte Gehirnregionen**

In der IHC wird das Gehirn auf 4 Ebenen untersucht. Der erste zu betrachtende Frontalschnitt liegt 3.72 mm anterior des Bregma. Hier werden der prälimbische (PrL) und der infralimbische Kortex (IL) betrachtet. Bei 0.96 mm anterior des Bregma ist der Nucleus accumbens (NAcc) mit den Anteilen Core und Shell, zu finden. Außerdem wird 3.36 mm posterior des Bregma der dorsale (dHipp) und 5.52 mm posterior des Bregma der ventrale Hippocampus (vHipp) sowie das VTA betrachtet. Im Hippocampus werden die Schichten Stratum (Str) radiale, pyramidale und oriens von CA 1 und 3, sowie Hilus, Str. granulosum und moleculare des Gyrus dentatus (GD) untersucht. Diese Regionen wurden ausgewählt, da in diesen pathologische Veränderungen bei an Schizophrenie erkrankten Menschen als auch bei Tieren des Poly(I:C)-Modells zu finden sind (siehe Abschnitt 1.1.5. und 1.2.2.). Schizophrene zeigen Auffälligkeiten hinsichtlich Lernverhalten, Gedächtnisbildung, Ängstlichkeit, Emotionen und Motivation. Diese Verhaltenszüge werden in den betrachteten Gehirnregionen gesteuert. Um eine Aussage über die neuronale Aktivität dieser Regionen treffen zu können, wird die Expression der im Abschnitt 1.1.6. genannten Aktivitätsmarker durch eine IHC untersucht. Es wurden Marker gewählt, die in bereits vorhanden Studien eine veränderte Expression bei Poly(I:C)-Tieren (z.B. Meyer et al. 2006a, Meyer et al. 2008c, Ito et al. 2010, Harvey und Boksa 2012, Labouesse et al. 2015, Casella et al. 2016) , schizophrenen Menschen (z.B. Beasley und Reynolds 1997, Takahashi et al. 2000, Durany et al. 2001, Tooney und Chahl 2004, Fatemi et al. 2005 , Gibney et al. 2013, Boyajyan et al. 2015, Han et al. 2017) oder nach iTBS Applikation (z.B. Müller et al. 2000, Yukimasa et al. 2006, Zhang et al. 2007, Benali et al. 2011, Hoppenrath und Funke 2013, Mix et al. 2015, Thimm und Funke 2015) aufwiesen.

Im folgenden Abschnitt werden die Aufgaben der einzelnen Gehirnstrukturen genauer erläutert.



**Abb. 2.3.** Untersuchte Gehirnregionen a) prälimbischer Kortex (PrL) und infralimbischer Kortex (IL) des präfrontalen Kortex b) Core (C) und Shell (S) des Nucleus accumbens (verändert nach Paxinos und Watson 2006)



**Abb. 2.3.** Untersuchte Gehirnregionen a) Cornu ammonis 1 (CA1), Cornu ammonis 3 (CA3) und Gyrus dentatus (GD) des dorsalen Hippocampus b) Cornu ammonis 1 (CA1), Cornu ammonis 3 (CA3) und Gyrus dentatus (GD) des ventralen Hippocampus und das ventrale tegmentale Areal (VTA) (verändert nach Paxinos und Watson 2006)

Der PFC der Ratte unterscheidet sich durch das Fehlen der inneren Körnerzellschicht IV in seinem Aufbau gegenüber dem des Menschen. Dadurch kommt es zu einer anderen Einteilung des medialen (mPFC), lateralen (lPFC) und orbitofrontalen Anteils (oPFC) des PFC. Der mediale Anteil wird unterteilt in einen dorsalen, welcher aus dem frontalen Areal 2 und dem anterioren cingulären Kortex besteht und einen ventralen Teil, bestehend aus einem infralimbischen und einem prälimbischen Areal. Der laterale Anteil wird in den dorsalen und ventralen agranulären insulären Kortex unterteilt. Trotz der Unterschiede, kann man den mPFC der Ratte mit dem dorsolateralen PFC des Menschen gleichsetzen (Uylings und van Eden 1990, Uylings et al. 2003). Die Aufgaben des PFC sind sehr vielfältig. Unter anderem ist er beteiligt an Aufmerksamkeit, Entscheidungsfindung, zielorientiertem Handeln, Steuerung autonomer Funktionen, Gedächtnisbildung und Emotionen. Er ist mit vielen anderen Teilen des Neokortex, dem Thalamus, dem limbischen System, den Basalganglien und dem VTA verbunden. Bei den Basalganglien ist der NAcc des Striatum ein wichtiges Projektionsgebiet (Heidbreder und Groenewegen 2003).

Der NAcc liegt im ventralen Teil der Basalganglien und verbindet das Putamen mit dem Nucleus caudatus. Er besteht aus einem inneren Anteil, dem sogenannten Core und einem äußeren Anteil, der Shell. Der NAcc gehört zum mesolimbischen System, dem Belohnungssystem des Gehirns. Er enthält eine Vielzahl von Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptoren, welche durch einen Input aus dem VTA stimuliert werden und Glücksgefühle auslösen. Des Weiteren spielt er eine Rolle bei der Entstehung von Sucht, emotionalem Lernen, Motivation und der Gedächtnisbildung. Der NAcc ist stark mit anderen Gehirnregionen verschaltet. Efferente Nervenfasern, welche im Shell entspringen, ziehen zum limbischen System, die aus dem Core vor allem zu motorischen Regionen.

Der Hippocampus bildet die zentrale Schaltstation des limbischen Systems und besteht aus dem GD, dem Ammonshorn und dem Subiculum. Der GD besteht aus 3 Schichten und bildet den Eingang der Hippocampusformation. Die mittlere Schicht, das Str. granulare des GD bilden die Körnerzellen, deren Dendriten nach außen in das Str. moleculare und deren Axone nach innen in den Hilus ziehen. Das Ammonshorn ist ebenfalls dreischichtig. Die Hauptzellen im mittleren Str. pyramidale bilden die Pyramidenzellen, deren Dendriten außen das Str. radiatum und innen das Str. oriens bilden. Dem Verlauf folgend wird das Ammonshorn in CA1–4 eingeteilt. Das CA1 grenzt an das Subiculum, welches den Übergang zum Kortex bildet. Der Hippocampus erhält über die Area entorhinalis Informationen von sensorischen Systemen um diese zu verarbeiten und an den Kortex weiterzugeben. Damit spielt er eine Rolle in der Bildung von Kurz- und Langzeitgedächtnis. Des Weiteren ist er für die räumliche Orientierung und die Steuerung von Emotionen, wie Angst, Wut und Freude, verantwortlich. Es wird außerdem zwischen dem dorsalen, dem intermediären und dem ventralen Hippocampus unterschieden. Der dorsale Teil ist für die Gedächtnisbildung verantwortlich, der Ventrale eher für die Beeinflussung von Emotionen und Verhalten (Fanselow und Dong 2010).

Das VTA ist an der Aktivierung des mesolimbischen Systems beteiligt und damit ein Teil des Belohnungssystems des Gehirns.

Bis die Schnitte für die IHC benötigt werden, werden sie in 30 %ige Saccharose in Glycerin (à/à) in Kryoröhrchen bei -20 °C eingefroren.



### 2.8.3. Immunhistochemie

Mit Hilfe der IHC kann man Proteine in Gewebsschnitten über eine Antigen-Antikörper-Reaktion sichtbar machen. In dieser Arbeit wird ein indirekter Nachweis über die Avidin-Biotin-Komplex-Methode angewendet. Die Grundlage der Reaktion ist die Bindung der Avidin-Biotin-Komplexe an die biotinylierten Sekundärantikörper. Avidin besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin Moleküle, woraus eine hohe Affinität zum Biotin resultiert und eine starke Reaktion ausgelöst wird.

Als Erstes werden die Gehirnschnitte zur Vorbereitung 3mal 10 min in PBS Puffer gespült und dann zur Blockierung der endogenen Peroxidasen des Gewebes für 20 min in 0.3 %igem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) inkubiert um eine ungewünschte Hintergrundfärbung zu verhindern. Es folgt ein weiterer Spülgang in PBS für 3mal 10 min. Anschließend werden die Schnitte für 9 min in eine Lösung, bestehend aus 10 % Normalserum, 20 % Avidin in 0.2 %igem TritonX100-PBS (PBS-TX), inkubiert. In diesem Arbeitsschritt werden unspezifische Bindungen, die durch Sekundärantikörper hervorgerufen werden können, sowie endogenes Biotin blockiert. Die Blockierung des endogenen Biotins und der unspezifischen Bindungen sollen ebenfalls eine ungewünschte Hintergrundfärbung verhindern. TritonX100 (TX) dient als Detergens und erhöhte die Membranpermeabilität für die Antikörper. Danach kommt es zur Inkubation mit dem Primärantikörper 1 % Normalserum, 20 % Biotin in 0.2 % PBS-TX über Nacht. Als Primärantikörper dienen NeuN, CB, PV, BDNF, cFos und GAD 67. Parallel wird ein Schnitt pro Durchgang in der gleichen Lösung ohne Primärantikörper als Negativkontrolle inkubiert. Die Konzentration, Zusammensetzung und Herkunft der verwendeten Chemikalien, Lösungen, Puffer, Primärantikörper und Seren sind im Anhang in den Tabellen 2.–6. zu finden.

Am nächsten Tag werden die Schnitte 3mal 10 min mit PBS gespült und über 90 min im biotinylierten Sekundärantikörper inkubiert. Dieser ist 1:500 in PBS mit 0.1 % TX und 1 % Normalserum verdünnt. Nach einem weiteren Spülgang folgt die 90-minütige Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC). Die beiden Bestandteile A und B sind 1:1000 in PBS mit 0.1 % TX und 1 % Normalserum verdünnt und müssen mindestens 30 min vor Benutzung zusammengeführt werden, um eine vollständige Komplexbildung zu gewährleisten.

Vor dem letzten Arbeitsschritt, der Diaminobenzidin (DAB)-Reaktion, wird wieder gespült. Bei dieser Reaktion wird die Oxidation von DAB durch die Peroxidase katalysiert, wodurch eine Braunfärbung der Schnitte entsteht. Dazu werden die Schnitte für 8–10 min, bis die gewünschte Farbintensität erreicht ist, in 0.05 % DAB-Lösung und 0.01 %  $H_2O_2$  gegeben. Anschließend erfolgt ein letzter Spülgang in PBS.

Bei der IHC von cFos wird die Reaktion durch die Zugabe von Nickelammoniumsulfat verstärkt. Hier kommt es erst zu einer 5-minütigen Vorinkubation der Schnitte in 0.02 % DAB-Lösung mit 0.4 % Nickelammoniumsulfat in 0.05 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid (Tris)-Puffer (pH 8) und anschließend werden sie mit 0.015 %  $H_2O_2$  für 10 min inkubiert. Gespült wird 3mal 5 min in Tris-Puffer.

Abschließend wurden die Schnitte auf mit Chromalaungelatine beschichtete Objektträger aufgezogen, luftgetrocknet, in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert, in Xylol geklärt und mit Depex eingedeckt.

## 2.9. Auswertung

### 2.9.1. Mikroskopie

Über ein Bildanalyse-System (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) bestehend aus dem Mikroskop DM LB 1001 (Typ 020-519.509, SN189660) von Leica (Solms, Deutschland), einer Kamera DFC300 FX, ebenfalls von Leica und dem Programm MetaMorph (Molecular Devices, San José, USA) werden in 10facher Vergrößerung Fotos von den zu betrachtenden Gehirnregionen angefertigt. Diese werden entweder automatisch über den Image Composite Editor 2.0.3.0 (Microsoft Research, Redmond, USA) oder, falls die Färbung zu hell ist, manuell über Gimp 2.8 (The GIMP Team) zusammengesetzt.

### 2.9.2. Zellzählung

Die Auszählung der Zellen erfolgt über Image J (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Dazu wird im Bild die zu untersuchende Region markiert. Das Programm berechnet die Größe des markierten Bereichs in  $\mu\text{m}^2$  und die absolute Zellzahl. Daraus wird die Zellzahl pro  $\text{mm}^2$  berechnet.

$$\text{Zellzahl in } \text{mm}^2 = \text{Zellzahl in } \mu\text{m}^2 \times 10^6$$

Die Zellzahl der durch NeuN angefärbten Neurone wird als Referenzwert gesehen. Es wird schließlich der prozentuale Anteil der Zellzahl der Markerproteine an der Zellzahl von NeuN errechnet.

$$\text{Zellzahl in } \% = \frac{\text{Zellzahl}_{\text{Markerprotein}}}{\text{Zellzahl}_{\text{NeuN}}} \times 100$$

### 2.9.3. Messung der optischen Dichte

Bei der Auswertung der IHC von BDNF ist eine Zellzählung nicht möglich, da eine sehr starke Hintergrundfärbung vorliegt. Deshalb wird mittels Image J die optische Dichte bestimmt. Dazu wird das Bild in ein Graustufenbild umgewandelt. Image J gibt dann die Dichte über Graustufenwerte zwischen 0 und 255 an. Je dichter der Bereich, umso kleiner die Zahl. Als Erstes wird ein Referenzwert als Weißabgleich bestimmt, dazu wird das Corpus callosum verwendet. Anschließend wird die optische Dichte der zu untersuchenden Region gemessen. Diese beiden Werte werden jeweils von 255 subtrahiert um die realen Dichtezahlen zu erhalten. Die optische Dichte der Region erhält man anschließend durch die Subtraktion der realen Zahl des Weißabgleiches von der realen Zahl der untersuchten Region.

### 2.9.4. Statistik

Die für die Statistik benötigte Mindestgruppengröße wurde auf  $n=12$  festgelegt. Diese Zahl resultiert aus Erfahrungswerten vorangegangener Studien dieser Arbeitsgruppe. In Untersuchungen mit iTBS Behandlung wurden bei einer Tierzahl von  $n=6$  signifikante Ergebnisse erzielt. Da in den Untersuchungen dieser Arbeit zusätzlich die Faktoren Poly(I:C) und Verhaltensversuche eine Rolle spielen, wurde die Tierzahl entsprechen, im Sinne des 3R-Prinzips (Replace, Reduce, Refine), angehoben.

Die statistische Auswertung erfolgt mit SPSS 25 (International Business Machines Corporation, Armonk, USA). Nach Test auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk wird

entschieden welcher Test durchgeführt wird. Bei Normalverteilung wird der t-Test, die einfaktorielle ANOVA (eANOVA) mit Post-hoc Fischer-LSD und eine zweifaktorielle ANOVA (zANOVA) mit den Faktoren Poly(I:C)/NaCl und iTBS/Sham durchgeführt. Sind die Ergebnisse nicht normalverteilt, wird der Mann-Whitney-U-Test (U-Test) verwendet. Ein Ergebnis gilt als signifikant, wenn  $p < 0.05$ . Extremwerte, die größer als die 2.5-fache Standardabweichung sind, werden als Ausreißer aussortiert und in der Statistik nicht einbezogen. Dies trifft nur für wenige Werte zu. Im PF wurden drei, im EPM fünf und im WM ein Wert aussortiert.

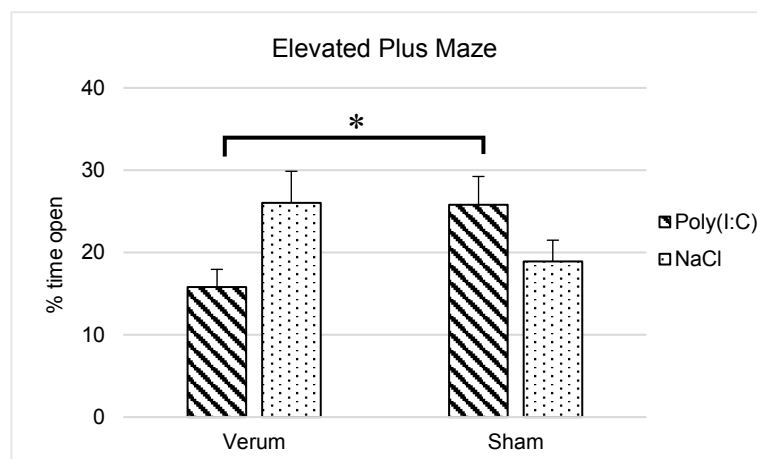
### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ergebnisse der Verhaltensversuche

##### 3.1.1. Ergebnisse Elevated Plus Maze

Die bei der Durchführung des Elevated Plus Maze (EPM) aufgenommenen Videos werden hinsichtlich der verbrachten Zeit in den offenen und geschlossenen Abschnitten ausgewertet. Dazu wird manuell mit einer Stoppuhr die Zeit gemessen. Anschließend wird der prozentuale Anteil der in den offenen Armen verbrachten Zeit an der Gesamtzeit von 300s berechnet (% time open).

Der t-Test zeigte, dass Tiere der Poly(I:C) Verum-Gruppe signifikant weniger Zeit im offenen Arm verbrachten, als Tiere der Poly(I:C) Sham-Gruppe ( $t(20)=-2.474$ ,  $p=0.022$ ). Die eANOVA zeigt diesen Trend ebenfalls, allerdings ohne Signifikanz ( $F(3, 41)=1.859$ ,  $p=0.054$ ). Auch zwischen der Verum und der Sham-Gruppe der NaCl-Tiere erkennt man im Diagramm einen Unterschied.



**Dia. 3.1.1.** Ergebnisse des Elevated Plus Maze. (Poly(I:C) Verum  $n=12$  Tiere, Poly(I:C) Sham  $n=10$  Tiere, NaCl Verum  $n=12$  Tiere, NaCl Sham  $n=11$  Tiere; t-Test  $*p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

##### 3.1.2. Ergebnisse Novel Object Recognition

Bei der Durchführung des NOB wurden ebenfalls Videos aufgezeichnet. Aus diesen wird die Zeit gestoppt, wie lange sich die Tiere jeweils mit neuem und altem Objekt beschäftigen. Daraus wird dann der DI berechnet:

$$DI = \frac{t_{\text{neu}} - t_{\text{alt}}}{t_{\text{neu}} + t_{\text{alt}}}$$

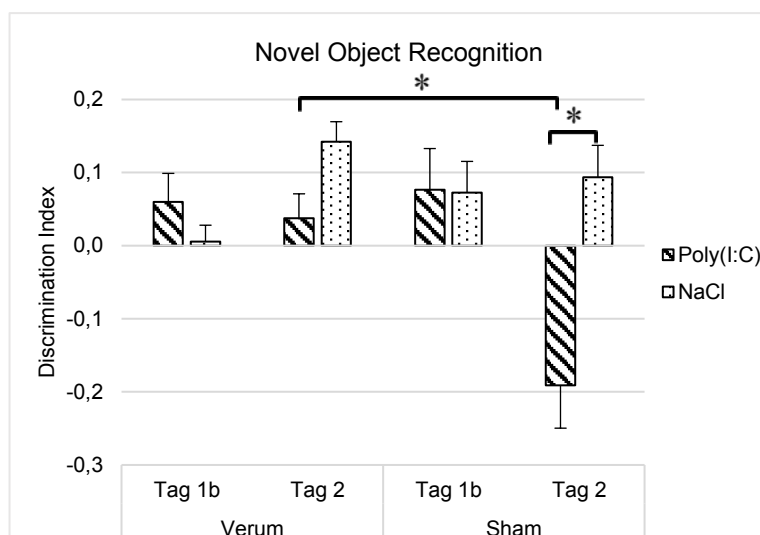
Der Wert des DI liegt zwischen -1 und 1. Ist die Zahl positiv, hat sich die Ratte mehr mit dem neuen Objekt beschäftigt, ist sie negativ mehr mit dem Alten. Die Versuchsdurchgänge werden unabhängig voneinander betrachtet.

Bei Durchgang 1b (Tag 1, zweiter Durchgang nach 1 h) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den 4 Gruppen, bei der Gruppe NaCl Verum ist jedoch der DI

niedriger als bei den anderen Gruppen. Die Dauer der Beschäftigung mit altem und neuem Objekt ist ungefähr ausgeglichen.

An Tag 2 hingegen (24 h nach Durchgang 1b) beschäftigte sich die Poly(I:C) Sham-Gruppe deutlich weniger mit dem neuen Objekt als die anderen Gruppen. Mit dem t-Test wurde zur Poly(I:C) Verum-Gruppe eine Signifikanz von  $p=0.016$  ( $t(25)=2.591$ ) und zur NaCl Sham-Gruppe eine Signifikanz von  $p=0.008$  ( $t(23)=-2.888$ ) bestimmt. Die eANOVA bestätigte diese Ergebnisse (Poly(I:C) Sham/Poly(I:C) Verum  $F(3, 47)=5.128$ ,  $p=0.005$ , Poly(I:C) Sham/NaCl Sham  $F(3, 47)=2.128$   $p=0.004$ ).

Die iTBS behandelten Tiere beschäftigten sich signifikant mehr mit dem neuen Objekt als die nicht behandelten Tiere (t-Test  $t(49)=2.254$ ,  $p=0.029$ ). Die Poly(I:C)-Tiere beschäftigten sich signifikant weniger mit dem neuen Objekt als die NaCl-Tiere (t-Test  $t(49)=-2.411$ ,  $p=0.02$ ). Auch in der zANOVA mit dem ersten Faktor Poly(I:C)/NaCl und dem zweiten Faktor Verum/Sham gab es einen signifikanten Unterschied bei dem ersten Faktor ( $F(1, 46)=6.837$ ,  $p=0.012$ ) sowie bei dem zweiten Faktor mit ( $F(1, 46)=4.453$ ,  $p=0.04$ ). Die Poly(I:C) Sham-Tiere haben ein schlechteres Kurzzeitgedächtnis.



**Dia. 3.1.2.** Ergebnisse des Novel Object Recognition. (Poly(I:C) Verum  $n=12$  Tiere, Poly(I:C) Sham  $n=10$  Tiere, NaCl Verum  $n=11$  Tiere, NaCl Sham  $n=12$  Tiere; t-Test  $*p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

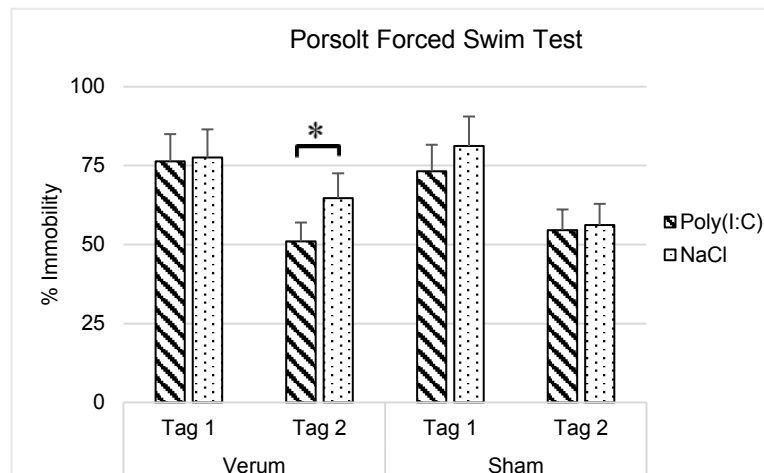
### 3.1.3. Ergebnisse Porsolt Forced Swim Test

Bei der Analyse der Videos des PF wird die Zeit gemessen in der die Tiere aktiv sind, z.B. schwimmen, tauchen oder versuchen, an der Glaswand hoch zu klettern und die Zeit, in der sie inaktiv sind und sich an der Wasseroberfläche treiben lassen. Daraus wird der prozentuale Anteil der Immobilität an der Gesamtzeit (Tag 1 900 s, Tag 2 300 s) berechnet.

An Tag 1 zeigte sich zwischen den vier Gruppen kein signifikanter Unterschied. Zwischen Poly(I:C) Sham und NaCl Sham zeichnete sich lediglich ein Trend ab (t-Test  $t(22)=-1.864$ ,  $p=0.076$ , eANOVA  $F(3, 46)=1.272$ ,  $p=0.061$ ). Die NaCl Sham-Tiere sind inaktiver als die anderen Gruppen.

Am zweiten Tag sind die Tiere der NaCl Verum-Gruppe signifikant inaktiver als die der Poly(I:C) Verum-Gruppe. Dies zeigte sich sowohl im t-Test ( $t(21)=-2.426$ ,  $p=0.024$ ) als auch in der eANOVA ( $F(3, 43)=1.595$ ,  $p=0.038$ ). Gegenüber den anderen Gruppen ist dieser

Trend ebenfalls zu erkennen: die NaCl Verum-Tiere lassen sich mehr treiben als die Tiere der anderen Gruppen.



**Dia. 3.1.3.** Ergebnisse des Porsolt Forced Swim Test. (Poly(I:C) Verum n=12 Tiere, Poly(I:C) Sham n=10 Tiere, NaCl Verum n=11 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \*p<0.05; angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler)

### 3.1.4. Ergebnisse Morris Water Maze

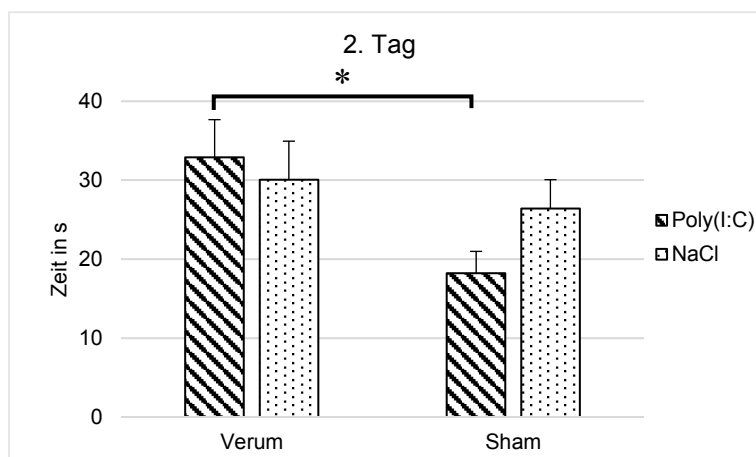
Die vom Water Maze Tracking Programm erhaltenen Daten wurden über ein selbst geschriebenes Programm hinsichtlich benötigter Gesamtzeit bis zum Auffinden des Targets, zurückgelegter Gesamtstrecke, durchschnittlicher Abstand der Ratte zum Target und zum Zentrum und dem Verhaltenstyp analysiert. Es werden 6 verschiedene Verhaltenstypen unterschieden: Thigmotaxis (Entlangschwimmen an der Wand), Circling (Entlangschwimmen am Rand mit Abstand zur Wand), Random (Schwimmen am Rand eines Sektors), Corrected (direktes Schwimmen zum Target mit Korrektur), Direct (direktes Schwimmen zum Target) und nicht klassifizierbar. Verglichen wurden dann die ersten vier Tage und die einzelnen Trials untereinander. Vom letzten Tag, an dem die Plattform entfernt wird, wird analysiert, wie lange sich die Ratte im Sektor des Targets aufhält.

#### 3.1.4.1. Gesamtzeit

##### 3.1.4.1.1. Nach Tagen

Am ersten Tag zeigten sich keine Unterschiede zwischen den 4 Vergleichsgruppen.

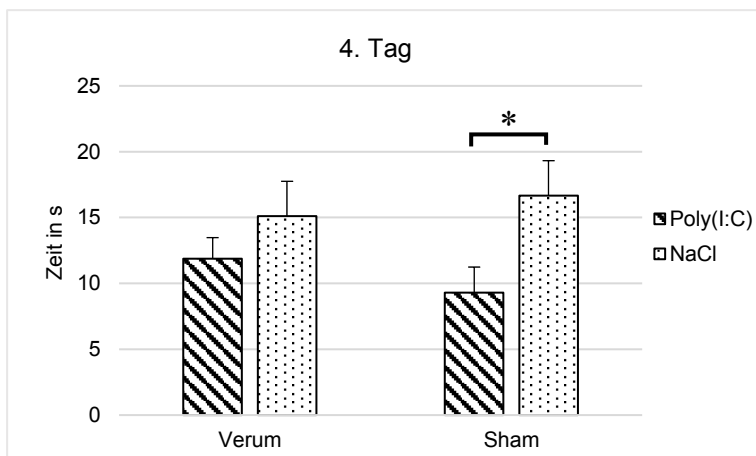
Am zweiten Tag fanden die Tiere der Gruppe Poly(I:C) Sham das Target schneller als die Poly(I:C) Verum (t-Test  $t(87.329)=2.672$ ,  $p=0.009$ , eANOVA  $F(3, 200)=2.459$ ,  $p=0.01$ ). Eine zANOVA mit dem ersten Faktor Poly(I:C)/NaCl und dem zweiten Faktor Verum/Sham gab einen signifikanten Unterschied bei dem Faktor Verum/Sham ( $F(1, 200)=4.892$ ,  $p=0.028$ ).



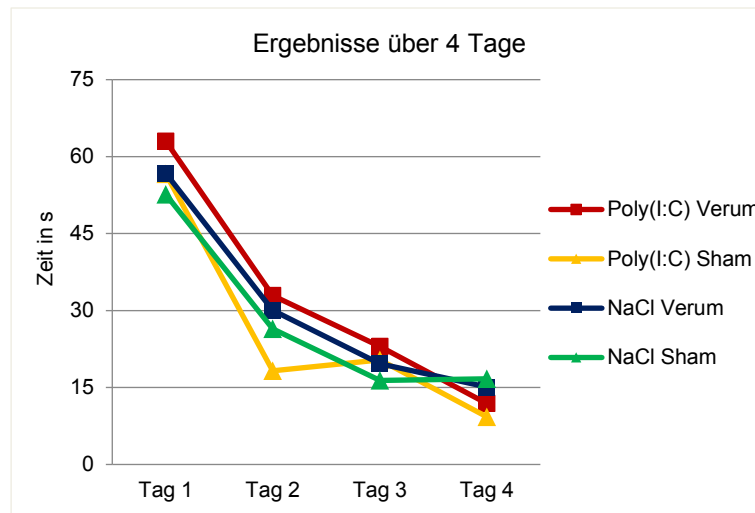
**Dia. 3.1.4.** Ergebnisse des 2. Tages des Morris Water Maze hinsichtlich Gesamtzeit. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Am dritten Tag zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Am vierten Tag verhält es sich ähnlich wie an Tag 2. Die Poly(I:C) Sham-Tiere finden das Target signifikant schneller als die NaCl Sham-Tiere (t-Test  $t(88) = -2.239$ ,  $p = 0.028$ ). In der zANOVA zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei dem Faktor Poly(I:C)/NaCl ( $F(1, 200) = 5.746$ ,  $p = 0.017$ ). Die Poly(I:C)-Tiere finden das Target signifikant schneller als die NaCl-Tiere (t-Test  $t(169.627) = -2.337$ ,  $p = 0.021$ ). Bezogen auf die Gesamtzeit, schneiden die Poly(I:C) Sham-Tiere am besten ab. Die Poly(I:C) Verum-Tiere verbessern ihre Leistung im Laufe des Experiments gegenüber den NaCl-Tieren.



**Dia. 3.1.5.** Ergebnisse des 4. Tages des Morris Water Maze hinsichtlich Gesamtzeit. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

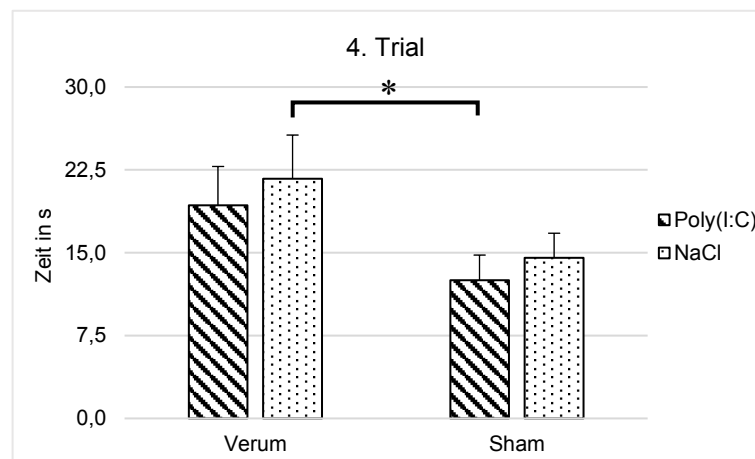


**Dia. 3.1.6.** Ergebnisse des Morris Water Maze über 4 Tage hinsichtlich Gesamtzeit. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere)

### 3.1.4.1.2. Nach Trials

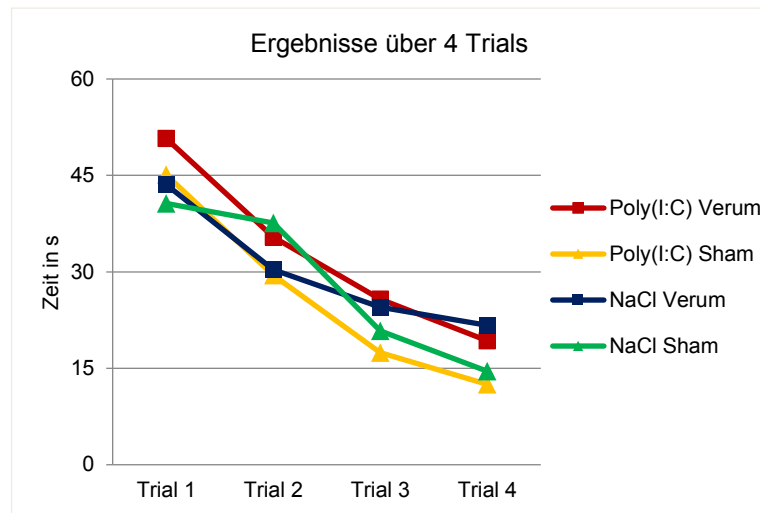
Bei den ersten 3 Trials zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der benötigten Zeit bis zum Auffinden des Targets.

Beim vierten Trial zeigte sich ebenfalls der Trend, dass die Tiere der Gruppe Poly(I:C) Sham das Target schneller finden als die anderen Gruppen. In der zANOVA zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei dem Faktor Verum/Sham ( $F(1, 200)=4.988, p=0.027$ ). Die Sham-Tiere finden das Target signifikant schneller als die iTBS behandelten Tiere (t-Test  $t(169.098)=2.25, p=0.026$ ).



**Dia. 3.1.7.** Ergebnisse des 4. Trials des Morris Water Maze hinsichtlich Gesamtzeit. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test  $*p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)





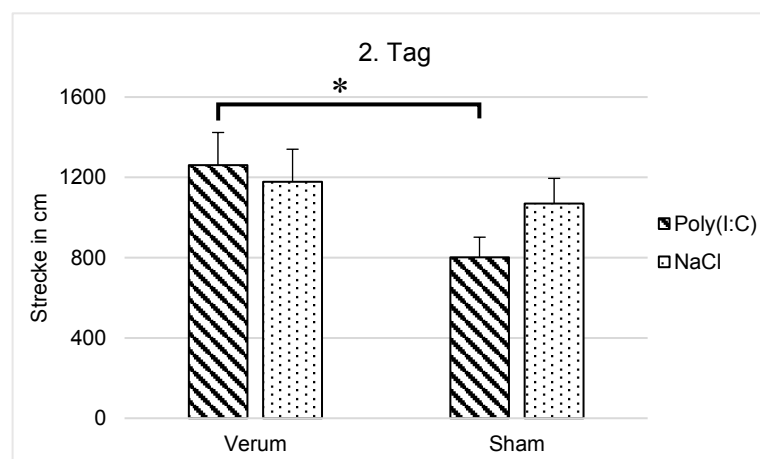
**Dia. 3.1.8.** Ergebnisse des Morris Water Maze über 4 Trials hinsichtlich Gesamtzeit. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere)

### 3.1.4.2. Zurückgelegte Strecke

#### 3.1.4.2.1. Nach Tagen

Am ersten Tag zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

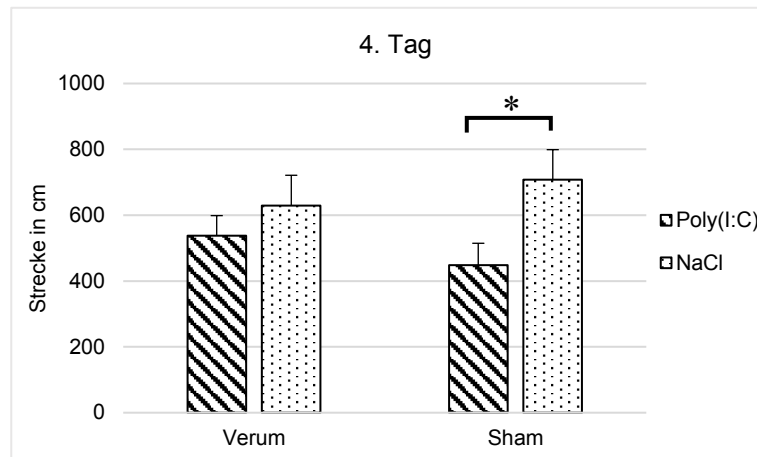
Am zweiten Tag wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Poly(I:C) Verum und Poly(I:C) Sham sichtbar (t-Test  $t(90.333)=90.333$ ,  $p=0.018$ , eANOVA  $F(3, 200)=2.07$ ,  $p=0.019$ ) Die Poly(I:C) Sham-Tiere legten eine kürzere Strecke zurück. In der zANOVA war mit  $F(1, 188)=4.256$  und  $p=0.047$  eine Signifikanz bei dem Faktor Verum/Sham zu erkennen. Auch hier ist es so, dass die Sham-Tiere die besten Ergebnisse zeigen und die kürzeste Strecke zurücklegen (t-Test  $t(182.461)=2.082$ ,  $p=0.039$ )



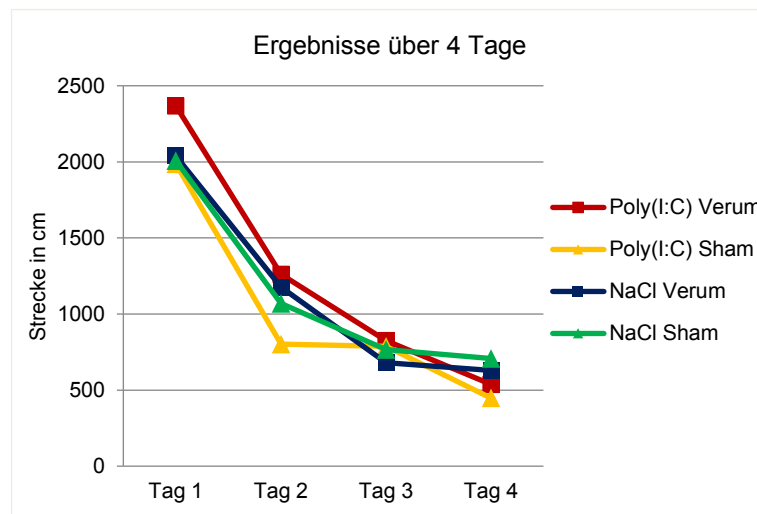
**Dia. 3.1.9.** Ergebnisse des 2. Tages des Morris Water Maze hinsichtlich zurückgelegter Strecke. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test  $*p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Am dritten Tag zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Am vierten Tag legten die Poly(I:C) Sham-Tiere eine signifikant kürzere Strecke als die NaCl Sham-Tiere ( $t$ -Test  $t(87.630)=-2.292$ ,  $p=0.024$ , eANOVA  $F(3, 200)=2.069$ ,  $p=0.02$ ) zurück. Auch die beiden anderen Vergleichsgruppen schwammen tendenziell weiter als die Poly(I:C) Sham-Gruppe um das Target zu finden.



**Dia. 3.1.10.** Ergebnisse des 4. Tages des Morris Water Maze hinsichtlich zurückgelegter Strecke. (Poly(I:C) Verum  $n=14$  Tiere, Poly(I:C) Sham  $n=13$  Tiere, NaCl Verum  $n=12$  Tiere, NaCl Sham  $n=12$  Tiere;  $t$ -Test  $*p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)



**Dia. 3.1.11.** Ergebnisse des Morris Water Maze über 4 Tage hinsichtlich zurückgelegter Strecke. (Poly(I:C) Verum  $n=14$  Tiere, Poly(I:C) Sham  $n=13$  Tiere, NaCl Verum  $n=12$  Tiere, NaCl Sham  $n=12$  Tiere)

### 3.1.4.2.2. Nach Trials

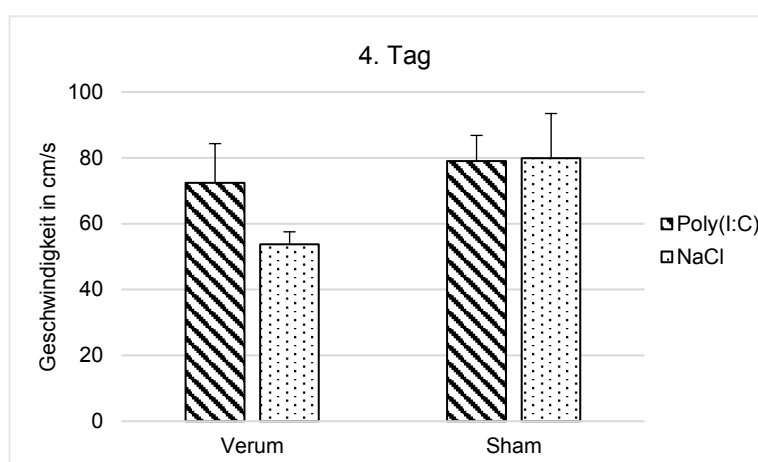
Hinsichtlich zurückgelegter Gesamtstrecke zeigte sich bei den Trials kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

### 3.1.4.3. Durchschnittsgeschwindigkeit

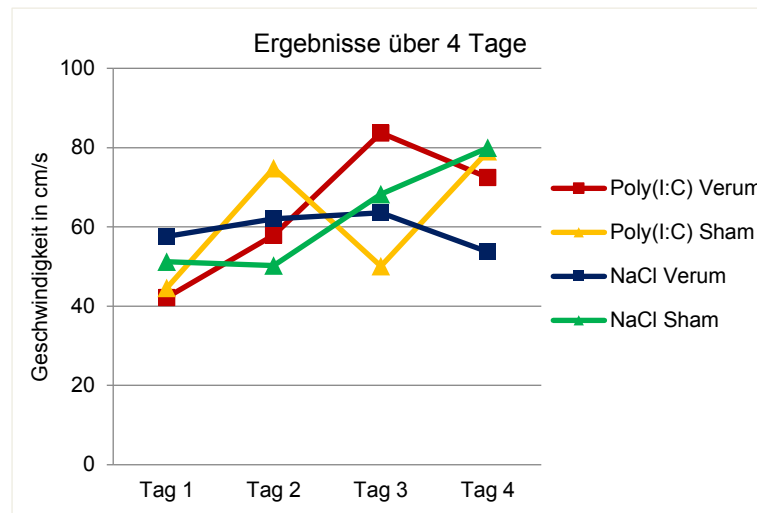
#### 3.1.4.3.1. Nach Tagen

An den ersten drei Tagen zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen.

Am vierten Tag schwammen die Ratten der NaCl Verum-Gruppe schneller als die Tiere der anderen Gruppen, dies zeigte sich allerdings in keiner Signifikanz. Über den Versuchsverlauf gesehen, behalten die NaCl Verum-Tiere ihre Durchschnittsgeschwindigkeit bei, wohingegen die anderen Gruppen ihre Geschwindigkeit erhöhen.



**Dia. 3.1.12.** Ergebnisse des 4. Tages des Morris Water Maze hinsichtlich Durchschnittsgeschwindigkeit. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \*p<0.05; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)



**Dia. 3.1.13.** Ergebnisse des Morris Water Maze über 4 Tage hinsichtlich Durchschnittsgeschwindigkeit. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere)

### 3.1.4.3.2. Nach Trials

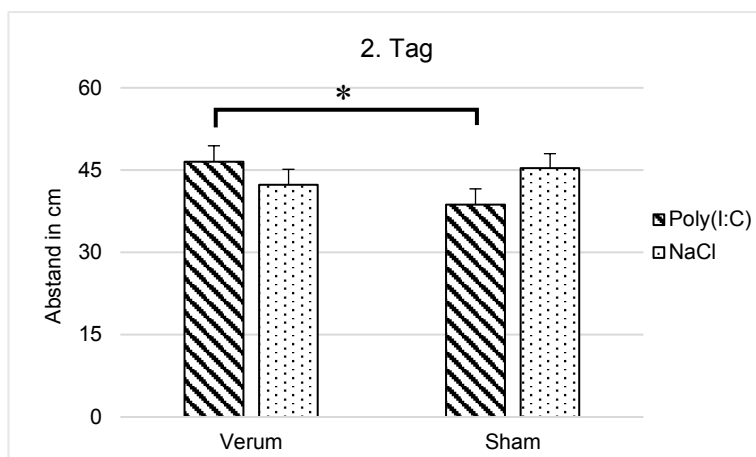
Es gab in keinem Trial einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

### 3.1.4.4. Durchschnittsabstand vom Target

#### 3.1.4.4.1. Nach Tagen

Am ersten Tag zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

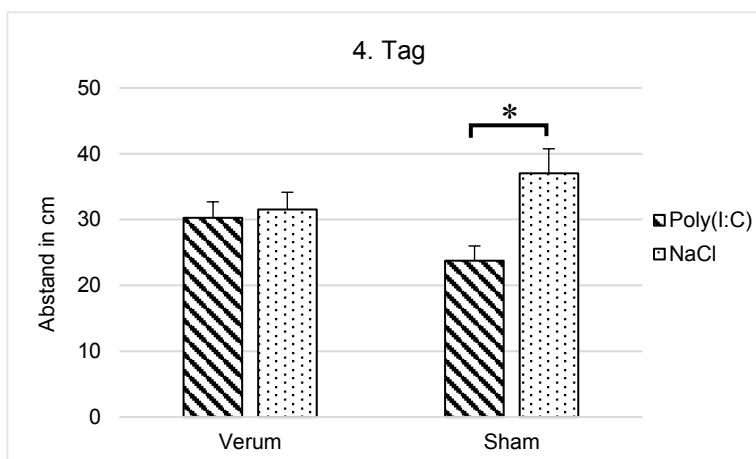
Am zweiten Tag zeigte sich in der zANOVA eine Signifikanz von  $F(1, 188)=4.089$ ,  $p=0.045$  zwischen den Faktoren Poly(I:C)/NaCl und Verum/Sham. Des Weiteren war auch ein signifikant größerer Abstand zum Target bei den Tieren der Poly(I:C) Verum-Gruppe gegenüber denen der Poly(I:C) Sham-Gruppe (eANOVA  $F(3, 200)=1.573$ ,  $p=0.046$ ) zu erkennen. Die Poly(I:C) Sham-Tiere schwimmen im Durchschnitt in einem geringeren Abstand zum Target als die anderen Gruppen.



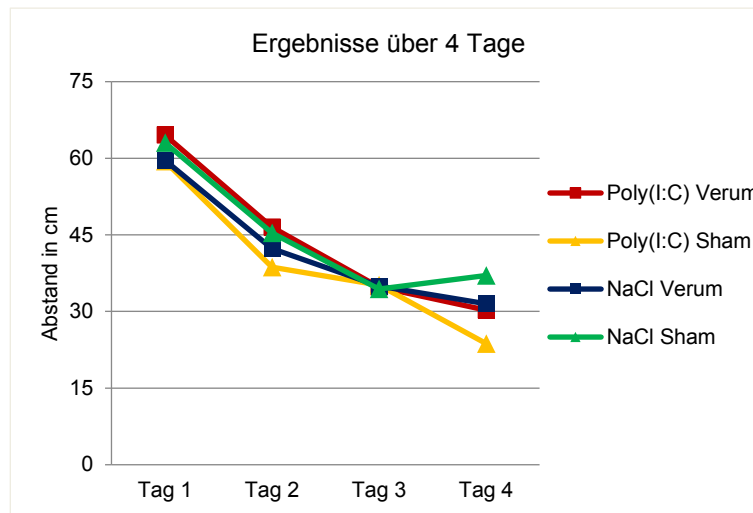
**Dia. 3.1.14.** Ergebnisse des 2. Tages des Morris Water Maze hinsichtlich Durchschnittsabstand vom Target. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Am dritten Tag zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Der Mittelwert des Abstands war nahezu gleich groß.

Am vierten Tag schwammen die Ratten der Gruppe Poly(I:C) Sham ebenfalls mit einem signifikant geringeren Abstand zum Target als die NaCl Sham (t-Test  $t(78.158) = -3.053$ ,  $p = 0.003$ , eANOVA  $F(3, 200) = 3.803$ ,  $p = 0.001$ ). In der zANOVA war eine Signifikanz bei dem Faktor Poly(I:C)/NaCl ( $F(1, 188) = 7.200$ ,  $p = 0.01$ ) als auch zwischen den Faktoren Poly(I:C)/NaCl und Verum/Sham ( $F(1, 188) = 4.932$ ,  $p = 0.028$ ) zu erkennen. Die Poly(I:C)-Tiere hatten auch am vierten Tag einen geringeren Abstand zum Target als die anderen Tiere.



**Dia. 3.1.15.** Ergebnisse des 4. Tages des Morris Water Maze hinsichtlich Durchschnittsabstand zum Target. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

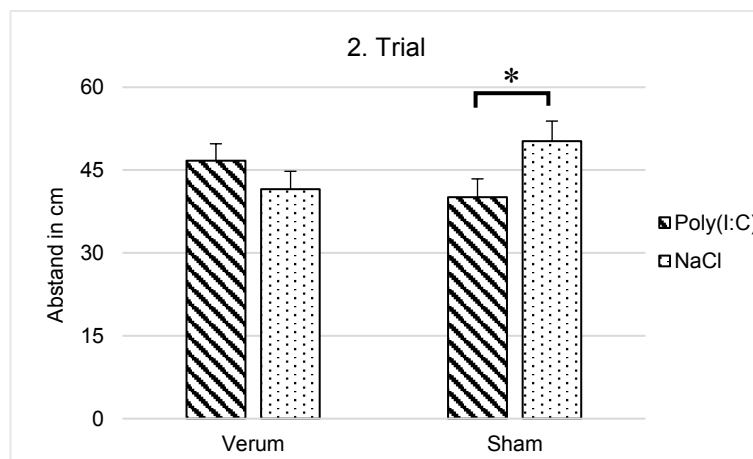


**Dia. 3.1.16.** Ergebnisse des Morris Water Maze über 4 Tage hinsichtlich Durchschnittsabstand zum Target. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere)

### 3.1.4.4.2. Nach Trials

Beim ersten Trial zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

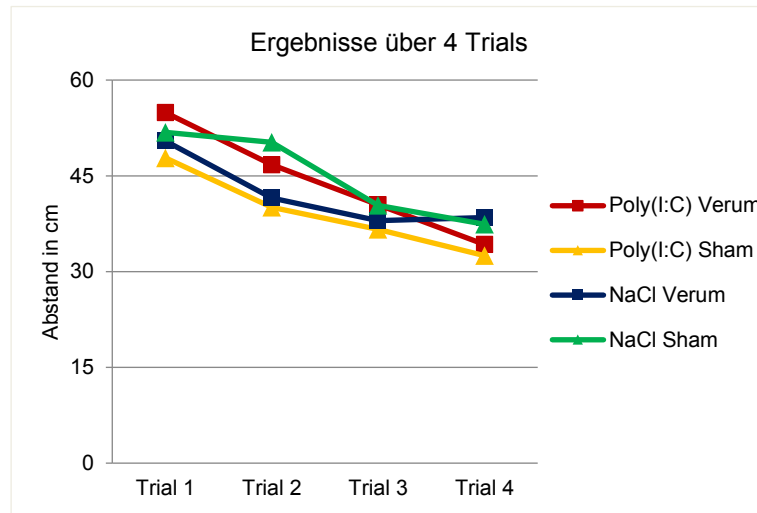
Im zweiten Trial war der Durchschnittsabstand zum Target bei der Poly(I:C) Sham-Gruppe signifikant kleiner als bei der NaCl Sham-Gruppe (t-Test  $t(98)=-2.060$ ,  $p=0.042$ , eANOVA  $F(3, 200)=1.959$ ,  $p=0.033$ ).



**Dia. 3.1.17.** Ergebnisse des 2. Trials des Morris Water Maze hinsichtlich Durchschnittsabstand zum Target. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test  $*p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Beim dritten und vierten Trial war kein Unterschied zu erkennen.

Auch bei den Trials lässt sich erkennen, dass die Poly(I:C) Sham-Gruppe bezüglich des durchschnittlichen Abstands zum Target durchgehend die besten Ergebnisse erzielt.



**Dia. 3.1.18.** Ergebnisse des Morris Water Maze über 4 Trials hinsichtlich Durchschnittsabstand zum Target. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere)

### 3.1.4.5. Durchschnittsabstand vom Zentrum

#### 3.1.4.5.1. Nach Tagen

An allen vier Tagen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

#### 3.1.4.5.2. Nach Trials

Beim ersten Trial zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Beim zweiten Trial war in der zANOVA eine Signifikanz zwischen dem Faktor Poly(I:C)/NaCl und dem Faktor Verum/Sham mit  $F(1, 200)=4.552$ ,  $p=0.034$  zu erkennen.

Beim dritten und vierten Trial zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

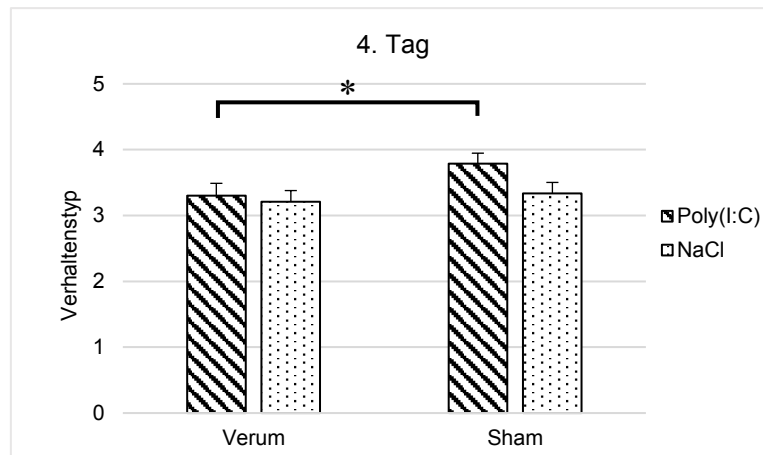
### 3.1.4.6. Verhaltenstyp

Für die Auswertung des Verhaltenstyps werden den Verhaltenstypen verschiedenen Nummern zugeordnet. Hierbei entspricht: 1 – Thigmotaxis, 2 – Circling, 3 – Random, 4 – Corrected, 5 – Direct und 0 - nicht klassifizierbar. „Thigmotaxis“ bedeutet, dass die Ratten nur an der Wand entlang schwimmen. Beim „Circling“ schwimmen sie im Kreis, aber mit einem gewissen Abstand zur Wand. Als „Random“ wird ein ungeordnetes, zufälliges Schwimmen kreuz und quer durchs Bassin bis zur Plattform bezeichnet. Schwimmen die Ratten direkt ohne Umwege zum Ziel, wird dies „Direct“ genannt. Korrigieren die Ratten auf dem Weg zur Plattform jedoch noch einmal die Richtung und benötigen deshalb eine längere Gesamtzeit, wird dies dem Typ „Corrected“ zugeordnet. Entspricht das Verhalten keinem der Typen, ist es „nicht klassifizierbar“.

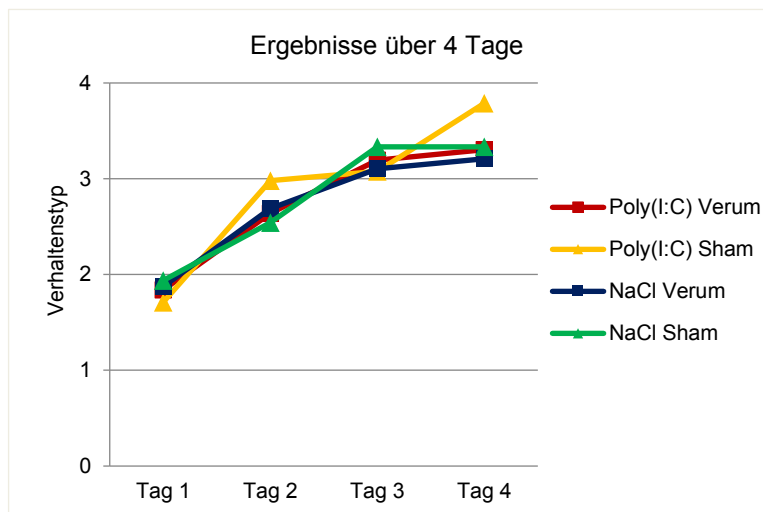
### 3.1.4.6.1. Nach Tagen

An den ersten 3 Tagen zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen.

Am vierten Tag ist der Mittelwert der Verhaltenstypen der Gruppe Poly(I:C) Sham signifikant höher als der Mittelwert der Gruppe Poly(I:C) Verum (t-Test  $t(104.56)=6.276$ ,  $p=0.049$ , eANOVA  $F(3, 200)= 2.269$ ,  $p=0,042$ ). In der Poly(I:C) Sham-Gruppe befinden sich mehr Tiere, die direkt oder direkt nach einer Korrektur, zum Target schwimmen.



**Dia. 3.1.19.** Ergebnisse des 4. Tags des Morris Water Maze hinsichtlich Verhaltenstyp. (Poly(I:C) Verum  $n=14$  Tiere, Poly(I:C) Sham  $n=13$  Tiere, NaCl Verum  $n=12$  Tiere, NaCl Sham  $n=12$  Tiere; t-Test  $*p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)



**Dia. 3.1.20.** Ergebnisse des Morris Water Maze über 4 Tage hinsichtlich Verhaltenstyp. (Poly(I:C) Verum  $n=14$  Tiere, Poly(I:C) Sham  $n=13$  Tiere, NaCl Verum  $n=12$  Tiere, NaCl Sham  $n=12$  Tiere)



### 3.1.4.6.2. Nach Trials

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

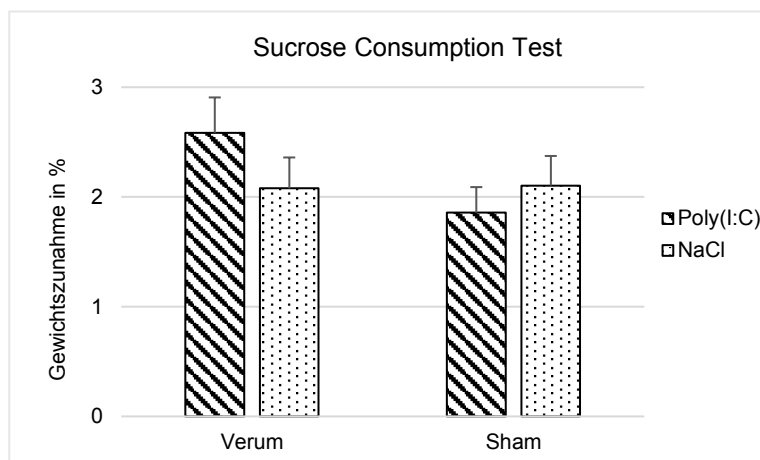
### 3.1.4.7. Tag 5

Am letzten Versuchstag des WM, indem die Plattform entfernt wurde, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Die prozentuale Aufenthaltsdauer der Tiere im Sektor des Tagets ergab nur einen leichten Trend. Die nicht stimulierten Tiere hielten sich etwas mehr im Targetsektor auf. Zwischen Poly(I:C)- und Kontrolltieren zeigte sich kein Unterschied.

### 3.1.5. Ergebnisse Sucrose Consumption Test

Zur Auswertung werden die Differenzen der Gewichte von Ratte und Flasche vor und nach den Tests gebildet. Aus diesen beiden Werten wird dann ein Mittelwert gebildet, aus dem die prozentuale Gewichtszunahme, ausgehend vom Startgewicht des Tieres, errechnet wird.

Zwischen den 4 Vergleichsgruppen ist kein signifikanter Unterschied in der Gewichtszunahme zu erkennen. Bei den Tieren der Poly(I:C) Verum-Gruppe zeigte sich eine höhere Gewichtszunahme als bei den anderen Tieren. Gegenüber Poly(I:C) Sham ist im t-Test ein Trend zu erkennen ( $t(25)=0.526$ ,  $p=0.069$ ).

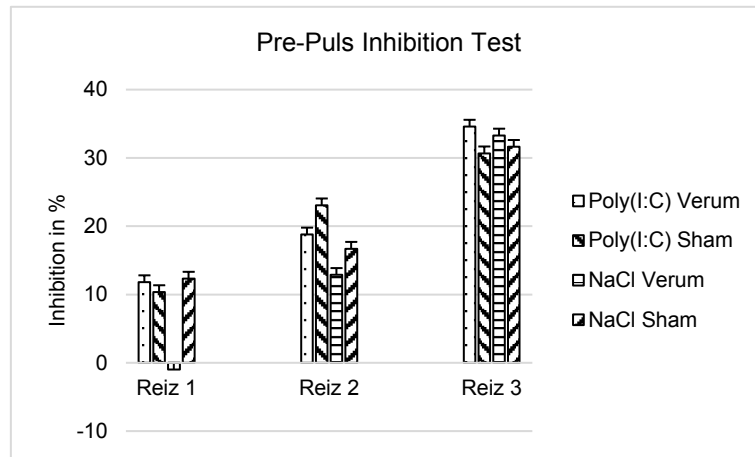


**Dia. 3.1.21.** Ergebnisse des Sucrose Consumption Test. (Poly(I:C) Verum  $n=14$  Tiere, Poly(I:C) Sham  $n=13$  Tiere, NaCl Verum  $n=12$  Tiere, NaCl Sham  $n=12$  Tiere; t-Test  $*p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

### 3.1.6. Ergebnisse Pre-Pulse Inhibitor Test

Für die Reize, die auf einen Pre-Pulse folgen (Reiz 1, 2 und 3), wird die Differenz aus der Reaktion auf den Startle-Reiz und den Pre-Pulse gebildet. Daraus wird wiederum die prozentuale Inhibition der Reaktion auf den Reiz errechnet.

Es zeigten sich zwischen keiner der Gruppen statistisch signifikante Unterschiede.



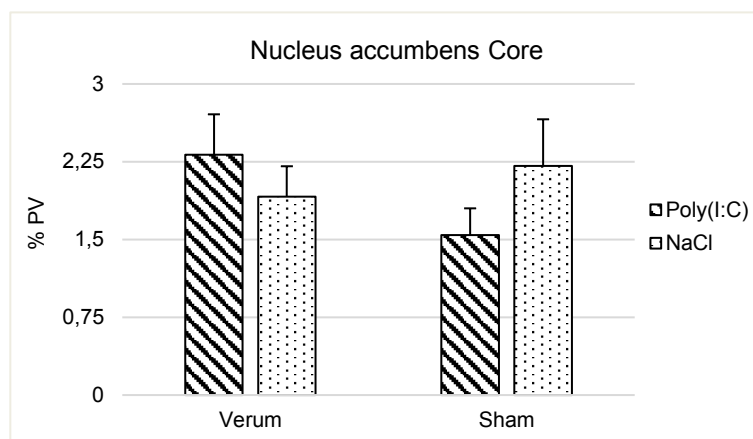
**Dia. 3.1.22.** Ergebnisse des Pre-Pulse Inhibition Test. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

## 3.2. Ergebnisse der Immunhistochemie

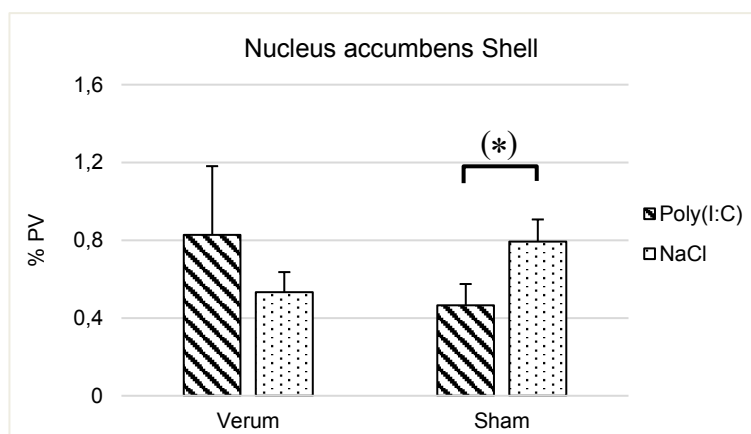
### 3.2.1. Parvalbumin

Im PL und IL zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen im Expressionsmuster.

In beiden Regionen des NAcc, Core und Shell, erkennt man iTBS Effekte. Bei den Poly(I:C)-Tieren wird durch die iTBS Behandlung die Expression von PV erhöht, bei den NaCl-Tieren wird die Expression hingegen verringert. Diese Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant. Des Weiteren ist die PV Expression bei den Poly(I:C) Verum-Tieren ähnlich der von NaCl Sham. Bei den Sham-Tieren ist zu erkennen, dass die Poly(I:C)-Tiere weniger PV exprimieren als die NaCl-Tiere. Im Shell ist ein Trend zwischen Poly(I:C) Verum und Sham zu erkennen (t-Test  $t(20)=-2.062$ ,  $p=0.052$ ).

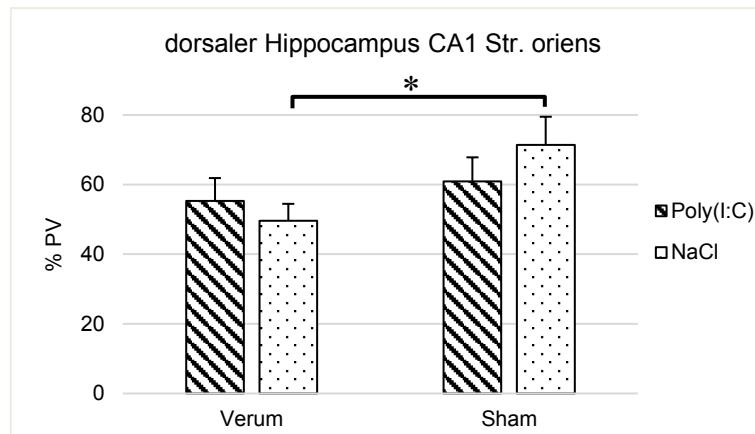


**Dia. 3.2.1.** PV Expression im Core des Nucleus accumbens. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)



**Dia. 3.2.2.** PV Expression im Shell des Nucleus accumbens. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test (\*) $p<0.1$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

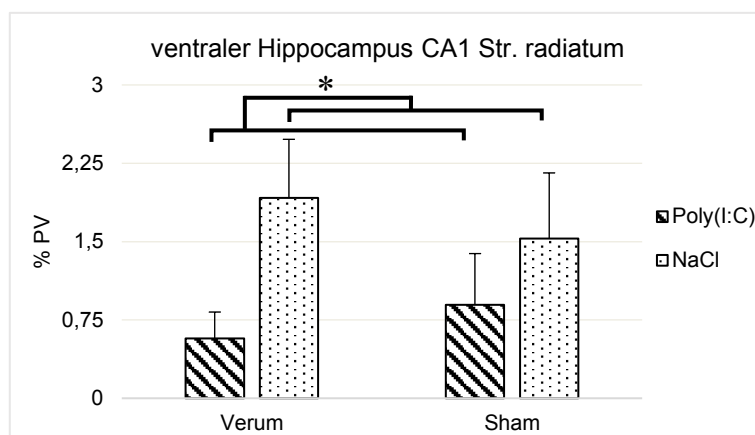
Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der PV-exprimierenden Zellen bei den NaCl-Tieren zeigte sich auch im dHipp. In der Schicht Str. oriens des CA 1 wurde eine signifikant niedrigere Zellzahl in der Gruppe NaCl Verum als in der Gruppe NaCl Sham festgestellt (t-Test  $t(22)=-2.301$ ,  $p=0.031$ , eANOVA  $F(3)=1.856$ ,  $p=0.029$ ). Im Str. oriens des CA3 und im Str. moleculare des GD verhielt es sich ähnlich, allerdings nicht statistisch signifikant. Im Str. radiatum des CA1 und des CA3 und im Hilus konnte man einen umgekehrten Trend erkennen: die iTBS behandelten NaCl-Tiere zeigten hier eine höhere PV Expression. In diesen Regionen ist außerdem zu erkennen, dass die Poly(I:C) Sham-Tiere, wie im NAcc, weniger PV exprimieren als die NaCl Sham-Tiere.



**Dia. 3.2.3.** PV Expression im Str. oriens des CA1 des dorsalen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum  $n=14$  Tiere, Poly(I:C) Sham  $n=13$  Tiere, NaCl Verum  $n=12$  Tiere, NaCl Sham  $n=12$  Tiere; t-Test und eANOVA  $*p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

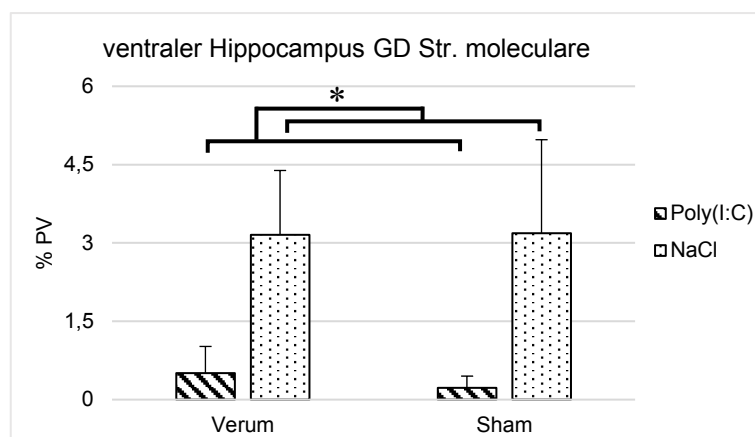
Bei den Poly(I:C)-Tieren sind im dHipp keine signifikanten Unterschiede und kein eindeutiger Trend erkennbar. In den Schichten Str. radiatum des CA1, Str. oriens des CA3, Hilus und Str. moleculare des GD zeigen die Verum-Tiere eine höhere PV Expression, in den Schichten Str. oriens des CA1, Str. radiatum des CA3 und Str. granulare des GD eine niedrigere.

Wie im dHipp, zeigt sich auch im Str. radiatum des CA1 und im Hilus des vHipp eine höhere PV Expression bei den NaCl-Tieren nach iTBS Behandlung, im Str. oriens des CA3 eine niedrigere.



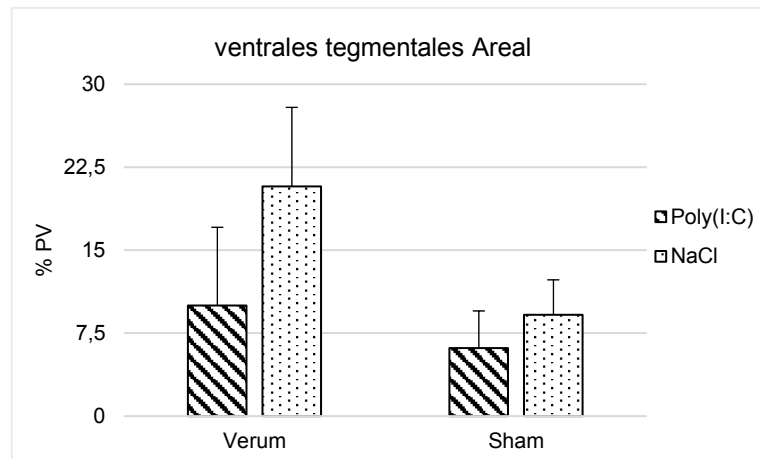
**Dia. 3.2.4.** PV-Expression im Str. radiatum des CA1 des ventralen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; U-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Außerdem zeigte sich, betrachtet man die Gesamtheit der Tiere, ohne Differenzierung nach Verum und Sham, im Str. radiatum des CA1 des vHipp im U-Test signifikanter Unterschied zwischen den Poly(I:C)- und den NaCl-Tieren mit  $p=0.047$ . Die NaCl-Tiere exprimieren mehr PV als die Poly(I:C)-Tiere. Dies zeigte sich auch im Str. moleculare des GD des vHipp (U-Test  $p=0.02$ ) und im VTA. Im Str. pyramidale des CA1 tritt noch einmal der Fall auf, dass die Poly(I:C) Verum-Tiere ungefähr ähnlich viel PV exprimieren wie die NaCl Sham-Tiere. Die Poly(I:C) Sham-Tiere hingegen exprimieren viel mehr PV als die Verum-Tiere. Hier könnte man einen Poly(I:C)-aufhebenden Effekt der iTBS vermuten.



**Dia. 3.2.5.** PV Expression im Str. moleculare des GD des ventralen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; U-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Im VTA exprimierten NaCl- sowie Poly(I:C)-Tiere nach iTBS Behandlung mehr PV. Die Poly(I:C) Sham-Gruppe zeigt auch hier eine niedrigere PV Expression als die NaCl Sham-Gruppe.

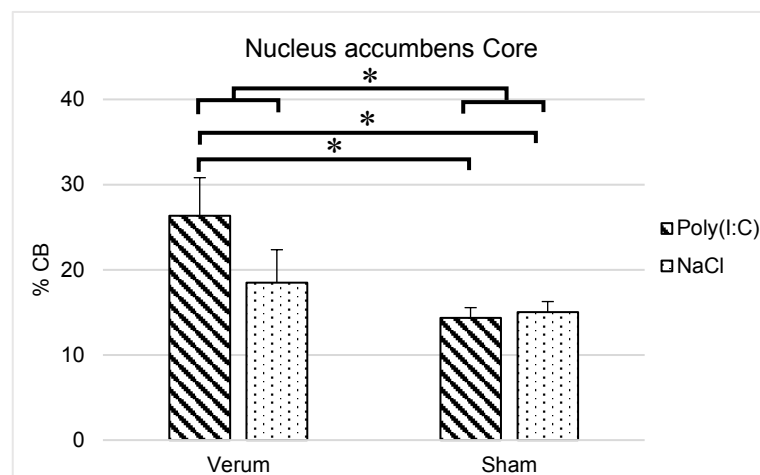


**Dia. 3.2.6.** PV Expression im ventralen tegmental Areal. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; U-Test; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

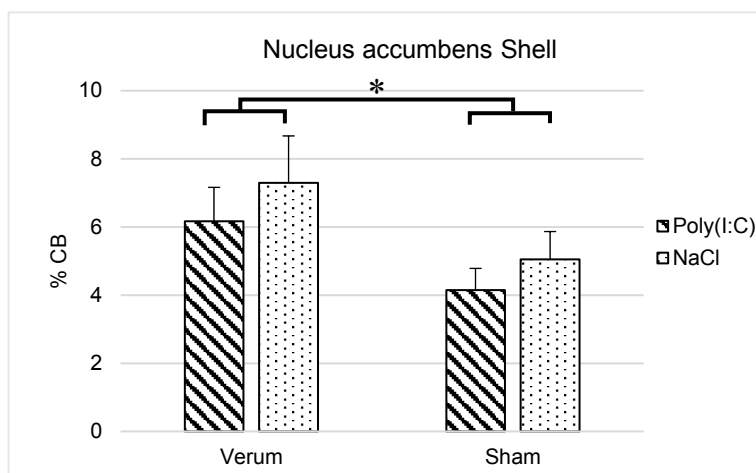
### 3.2.2. Calbindin

Im PL und IL zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen im Expressionsmuster.

In Core und Shell des NAcc war zu erkennen, dass nach der iTBS Behandlung, sowohl bei den Poly(I:C)- als auch bei den NaCl-Tieren, eine höhere CB Expression stattfindet. Dies zeigte sich im Core statistisch signifikant im t-Test ( $t(25.473)=2.504$ ,  $p=0.019$ ) und in der zANOVA ( $F(1, 41)=5.920$ ,  $p=0.019$ ). Des Weiteren war eine Signifikanz zwischen der Gruppe Poly(I:C) Verum und der Gruppe Poly(I:C) Sham (t-Test  $t(12.609)=2.584$ ,  $p=0.023$ , eANOVA  $F(3, 41)=3.116$ ,  $p=0.01$ ) zu erkennen. Im Shell des NAcc konnte die höhere CB Expression in den Verum-Gruppen ebenfalls durch Signifikanzen belegt werden (zANOVA Faktor Verum/Sham  $F(1, 52)=4.728$ ,  $p=0.035$ ).

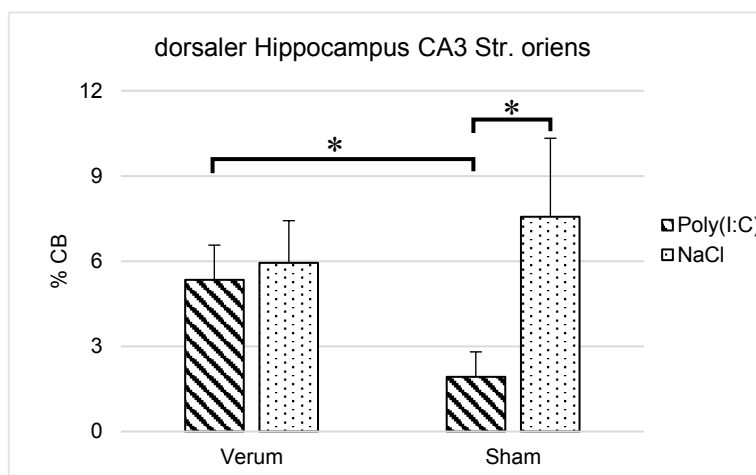


**Dia. 3.2.7.** CB Expression im Core des Nucleus accumbens. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test und zANOVA \* $p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)



**Dia. 3.2.8.** CB Expression im Shell des Nucleus accumbens. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; zANOVA \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Im dHipp konnte man vor allem im Str. radiatum des CA1 und CA3 sowie im Hilus Auffälligkeiten erkennen. iTBS behandelte Poly(I:C)-Tiere exprimieren weniger CB als die Sham-Tiere. NaCl-Tiere hingegen exprimieren nach der iTBS Behandlung im CA1 und CA3 mehr CB, wie auch schon im NAcc sichtbar wurde. Im Str. oriens des CA1 und CA3 kehrt sich dieses Verhältnis um: Poly(I:C) Verum exprimiert mehr CB, NaCl Verum weniger. Im Str. oriens des CA3 konnte dies statistisch signifikant belegt werden. Die Gruppe Poly(I:C) Sham exprimiert signifikant weniger CB-positive Zellen als die Tiere der Poly(I:C) Verum-Gruppe (t-Test  $t(23)=2.233$ ,  $p=0.036$ ). Die Poly(I:C) Sham-Gruppe exprimiert signifikant weniger CB als die NaCl Sham-Gruppe (eANOVA  $F(3, 45)=1.863$ ,  $p=0.027$ ).

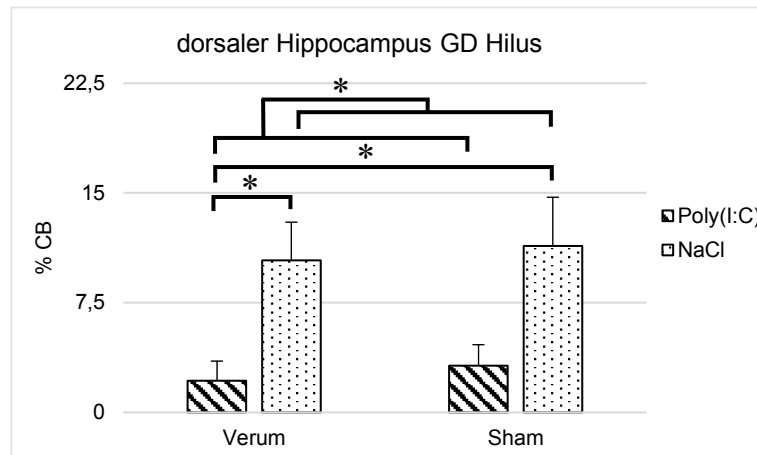


**Dia. 3.2.9.** CB Expression im Str. oriens des CA3 des dorsalen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test und eANOVA \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Im Hilus des GD des dHipp zeigten die NaCl-Tiere allgemein eine signifikant höhere Anzahl an CB-exprimierenden Zellen als die Poly(I:C)-Tiere (U-Test  $p=0.02$ ). Im U-Test ist ebenso

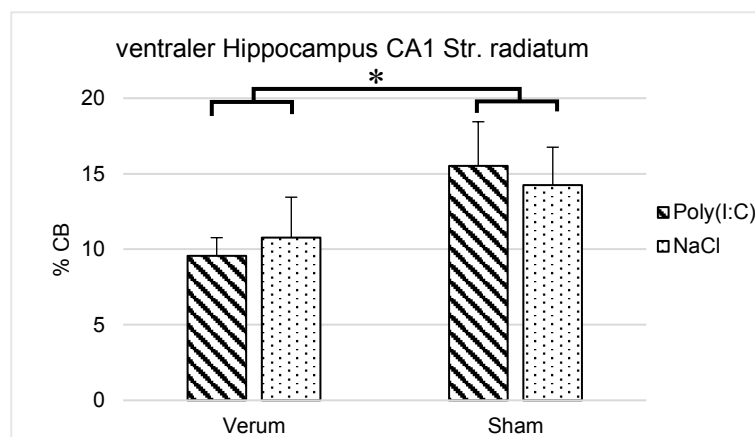
die geringere CB Expression der Poly(I:C) Verum-Gruppe gegenüber der der NaCl Verum- (U-Test  $p=0.39$ ) und der der NaCl Sham-Gruppe (U-Test  $p=0.14$ ) statistisch signifikant.

Allgemein lässt sich sagen, dass im Str. radiatum von CA1 und 3 des dorsalen Hippocampus sehr viele CB-exprimierende Zellen vorhanden sind (MD bis 28.3 %), im Str. pyramidale (MD bis 0.7 %) und Str. oriens (MD bis 8.5 %) hingegen eher weniger.



**Dia. 3.2.10.** CB Expression im Hilus des GD des dorsalen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; U-Test \* $p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

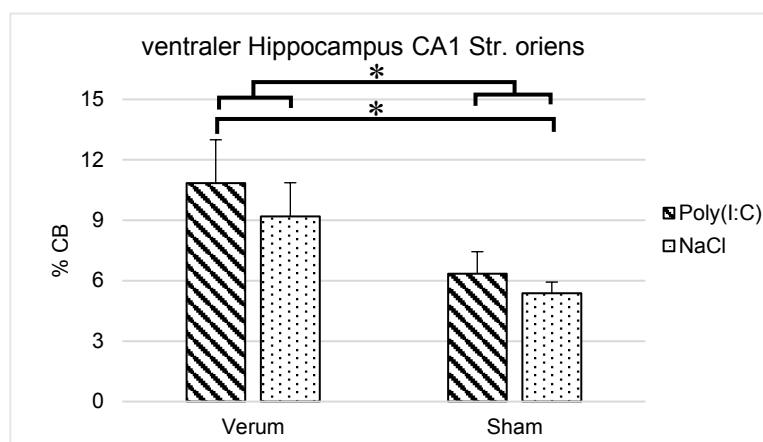
Im Str. radiatum des CA1 des vHipp zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Verum- und den Sham-Tieren (t-Test  $t(45)=-2.064$ ,  $p=0.045$ ). Die Verum-Tiere exprimieren weniger CB. Dies ist ebenfalls im Str. radiatum des CA3 und im Hilus zu erkennen.



**Dia. 3.2.11.** CB Expression im Str. radiatum des CA1 des ventralen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; U-Test \* $p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

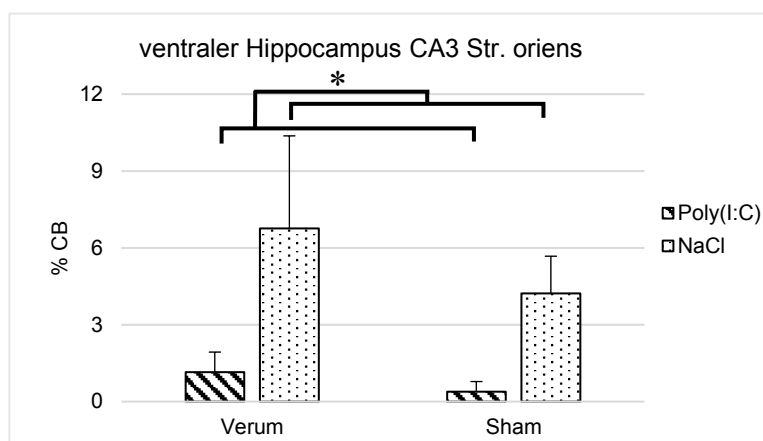


Im Str. oriens des CA1 kehrt sich dieses Verhältnis um und die Anzahl der CB-exprimierenden Zellen ist bei den Verum-Tieren signifikant höher (t-Test  $t(32.935)=2.767$ ,  $p=0.009$ ). Die Poly(I:C) Verum-Tiere exprimieren signifikant mehr CB als die NaCl Sham-Tiere (t-Test  $t(14.675)=2.462$ ,  $p=0.027$ ).



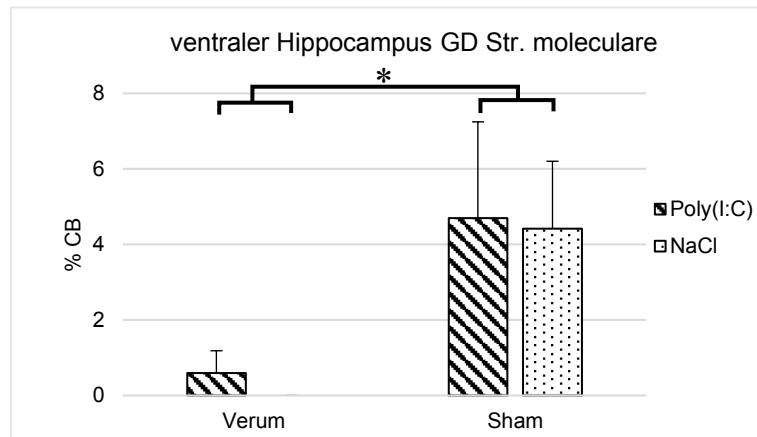
**Dia. 3.2.12.** CB Expression im Str. oriens des CA1 des ventralen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test  $*p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Im Str. oriens des CA3 des vHipp wird von den NaCl-Tieren signifikant mehr CB exprimiert als von den Poly(I:C)-Tieren (U-Test  $p=0.006$ ).



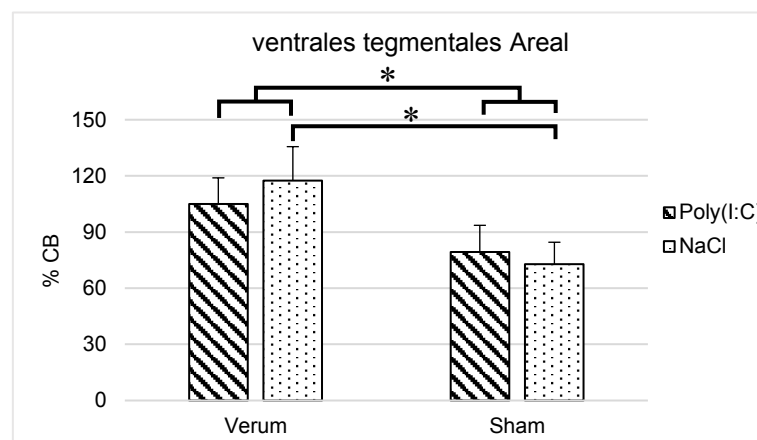
**Dia. 3.2.13.** CB Expression im Str. oriens des CA3 des ventralen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; U-Test  $*p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Im Str. moleculare des GD zeigte sich eine signifikant niedrigere CB Expression bei den Verum-Tieren als bei den Sham-Tieren (U-Test  $p=0.009$ ).



**Dia. 3.2.14.** CB Expression im Str. moleculare des GD des ventralen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; U-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

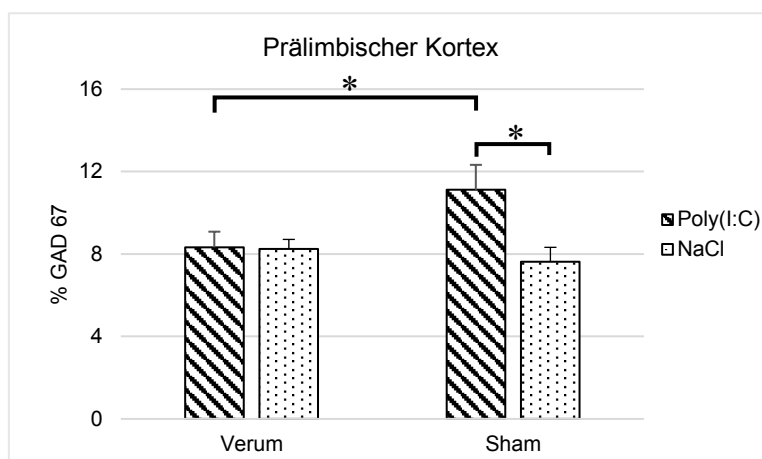
Im VTA wird von den iTBS behandelten Tieren signifikant mehr CB exprimiert als von den Sham-Tieren (t-Test  $t(45)=2.248$ ,  $p=0.03$ ). Dies zeigte sich auch beim Faktor Verum/Sham der zANOVA mit  $F(1, 43)=4.940$ ,  $p=0.032$ . In der eANOVA wurde eine signifikant höhere CB Expression bei der NaCl Verum-Gruppe als bei der NaCl Sham-Gruppe festgestellt ( $F(3)=1.916$ ,  $p=0.044$ ).



**Dia. 3.2.15.** CB Expression im ventralen tegmentalen Areal. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test, eANOVA und zANOVA \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

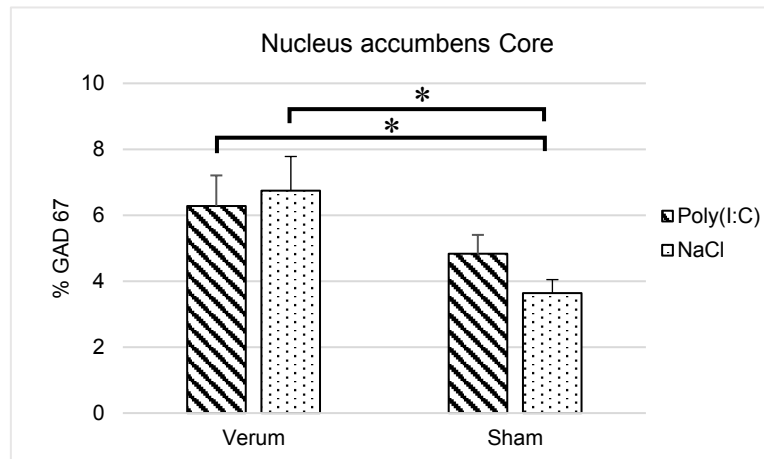
### 3.2.3. GAD 67

Die Zellen des PrL zeigten bei den Poly(I:C) Sham Tieren eine höhere GAD 67 Expression als alle anderen Gruppen. Die Signifikanzen betragen im t-Test  $t(22)=2.491$ ,  $p=0.021$  im Vergleich mit NaCl Sham und in der eANOVA  $F(3)=3.431$ ,  $p=0.005$  im Vergleich mit NaCl Sham und  $F(3)=3.431$ ,  $p=0.019$  mit Poly(I:C) Verum. In der zANOVA gab es außerdem eine Signifikanz bei dem Faktor Poly(I:C)/NaCl ( $F(1, 46)=4.661$ ,  $p=0.036$ ) als auch zwischen den Faktoren Poly(I:C)/NaCl und Verum/Sham ( $F(1, 46)=4.256$ ,  $p=0.045$ ). Auch im IL exprimieren die Poly(I:C)-Tiere geringgradig mehr GAD 67 als die NaCl-Tiere.

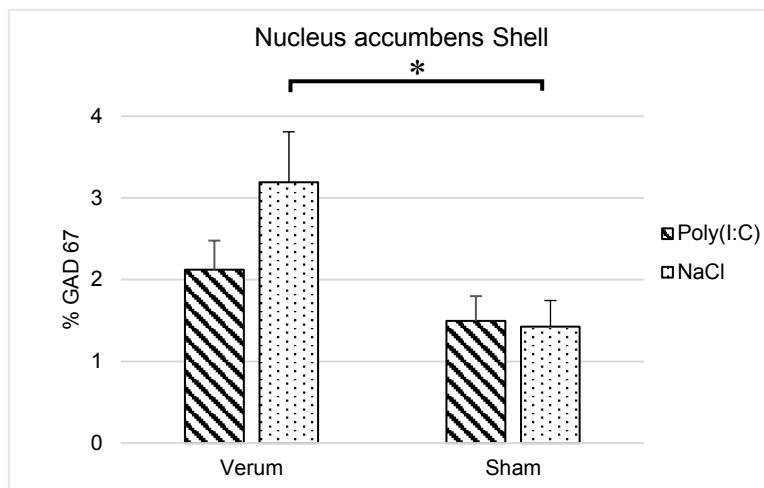


**Dia. 3.2.16.** GAD 67 Expression im prälimbischen Kortex. (Poly(I:C) Verum  $n=14$  Tiere, Poly(I:C) Sham  $n=13$  Tiere, NaCl Verum  $n=12$  Tiere, NaCl Sham  $n=12$  Tiere; t-Test  $*p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

In Core und Shell des NAcc wurde von den iTBS behandelten Tieren signifikant mehr GAD 67 exprimiert als von den Sham-Tieren (t-Test Core:  $t(35.125)=2.929$ ,  $p=0.006$ , Shell:  $t(34.831)=2.784$ ,  $p=0.009$ ). Dies zeigte sich im Core statistisch signifikant zwischen den Gruppen NaCl Sham und NaCl Verum (t-Test  $t(12.989)=2.773$ ,  $p=0.016$ , eANOVA  $F(3)=3.083$ ,  $p=0.01$ ). Auch im Shell exprimierten die iTBS behandelten NaCl-Tiere signifikant mehr GAD 67 als die NaCl Sham-Gruppe (t-Test  $t(19)=2.617$ ,  $p=0.017$ , eANOVA  $F(3)=3.832$ ,  $p=0.005$ ).



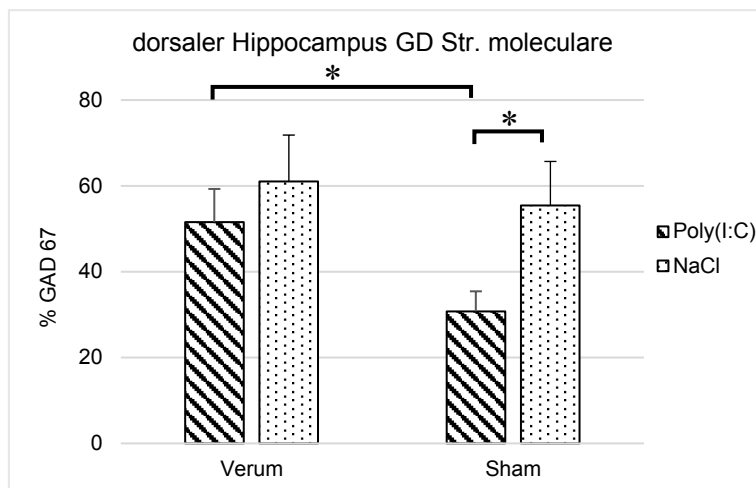
**Dia. 3.2.17.** GAD 67 Expression im Core des Nucleus accumbens. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)



**Dia. 3.2.18.** GAD 67 Expression im Shell des Nucleus accumbens. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

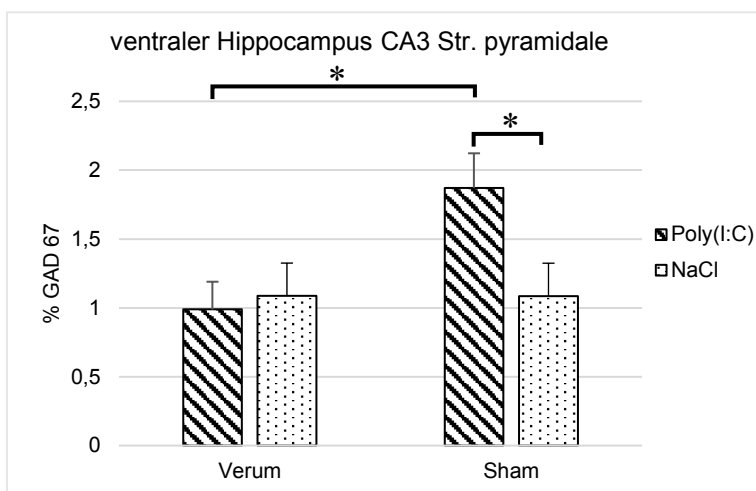
Tendenziell war im Str. radiatum des CA1 und CA3 sowie im Hilus des GD des dHipp eine verringerte GAD 67 Expression bei den iTBS behandelten NaCl-Tieren sichtbar. Zwischen den Poly(I:C)-Gruppen gab es keinen großen Unterschied.

Im Str. oriens des CA1 und CA3 und im Str. moleculare des GD ist zwischen den Poly(I:C)-Gruppen ein Unterschied zu erkennen: hier exprimieren die Verum-Tiere mehr GAD 67. Dies zeigt sich im Str. moleculare als Signifikanz (t-Test  $t(19.323)=2.297$ ,  $p=0.033$ ).



**Dia. 3.2.19.** GAD 67 Expression im Str. moleculare des GD des dorsalen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Im Str. pyramidale des CA1 und CA3 des vHipp war eine geringere Expression von GAD 67-positiven Zellen bei den iTBS behandelten Tieren zu erkennen. Dies zeigte sich statistisch signifikant im CA3 zwischen der Poly(I:C) Sham-Gruppe und der Poly(I:C) Verum-Gruppe (t-Test  $t(21) = -2.757$ ,  $p = 0.012$ , eANOVA  $F(3) = 3.196$ ,  $p = 0.009$ ). Auch hier sieht es so aus, als könnte die iTBS Behandlung die Poly(I:C)-Effekte aufheben.

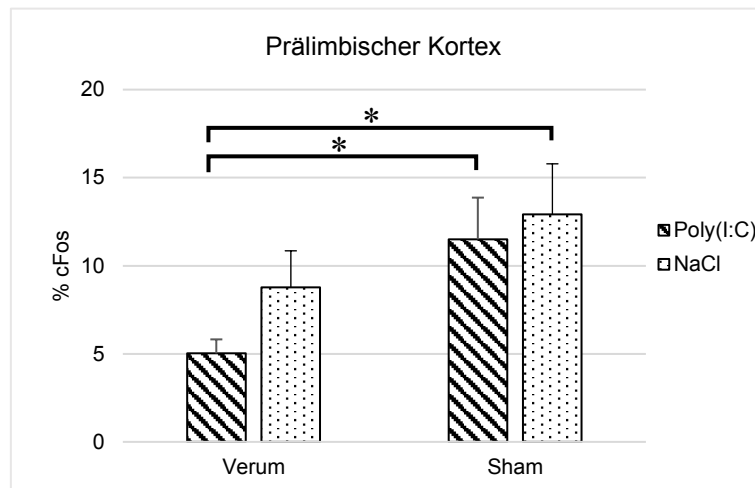


**Dia. 3.2.20.** GAD 67 Expression im Str. pyramidale des CA3 des ventralen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

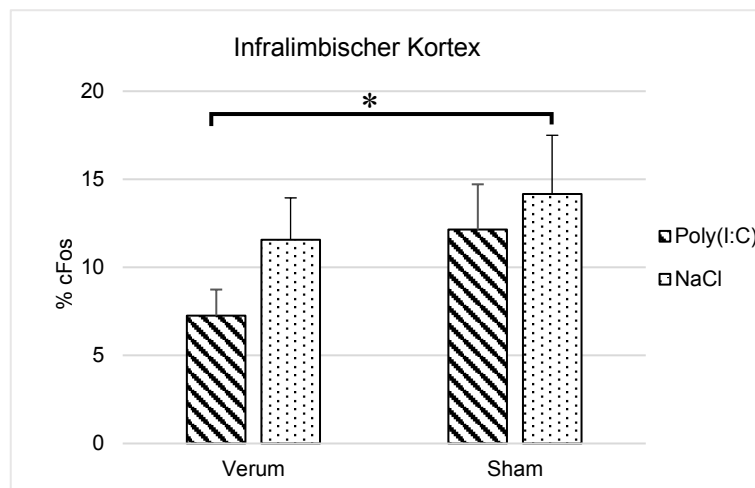
Auch in den beiden anderen Schichten des CA3, Str. radiatum und Str. oriens, ist dieser Trend zu erkennen. In der VTA hingegen kehrt sich dies um und die iTBS behandelten Tiere exprimieren im Vergleich mehr GAD 67.

### 3.2.4. cFos

Im PrL zeigte sich im t-Test mit  $t(35.815)=-2.567$ ,  $p=0.015$  eine signifikant höhere cFos Expression bei den Sham-Gruppen gegenüber den Verum-Gruppen. Auch in der zANOVA konnte eine Signifikanz bei dem Faktor Verum/Sham mit  $F(1, 43)=6.222$ ,  $p=0.017$  festgestellt werden. Bei den Tieren der Poly(I:C) Verum-Gruppe wird signifikant weniger cFos exprimiert als bei der Poly(I:C) Sham-Gruppe (t-Test  $t(12.247)=-2.595$ ,  $p=0.023$ , eANOVA  $F(3)=2.835$ ,  $p=0.035$ ). Auch im IL wird nach iTBS Behandlung sowohl von Poly(I:C)- als auch NaCl-Tieren weniger cFos exprimiert.

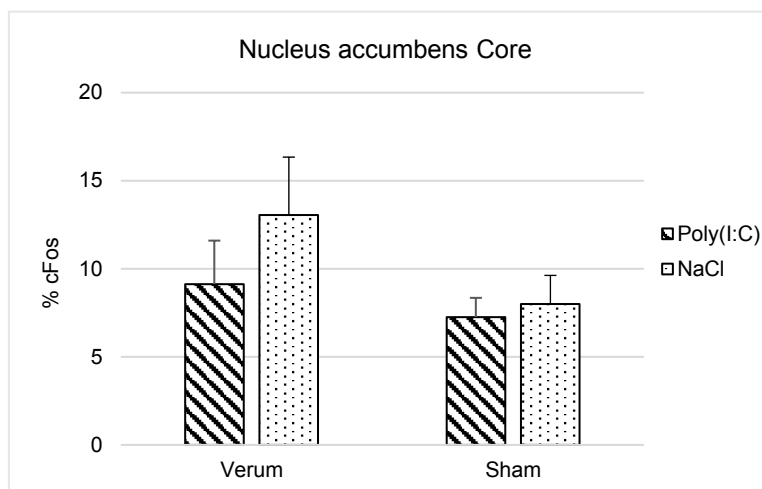


**Dia. 3.2.21.** cFos Expression im prälimbischen Kortex. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \* $p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

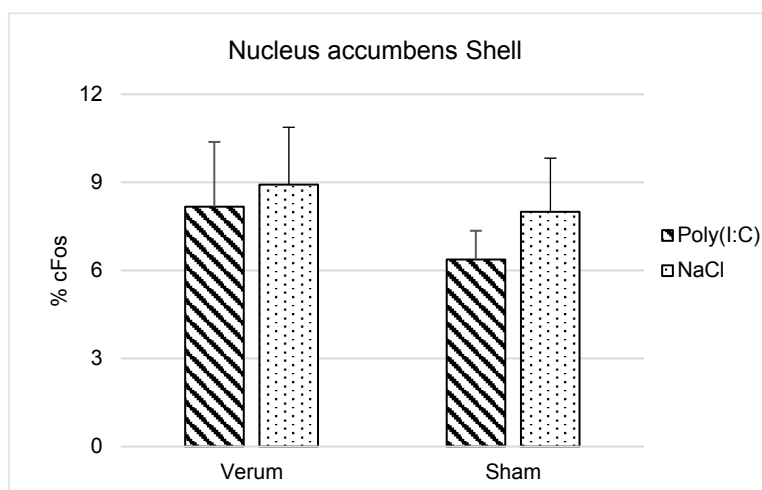


**Dia. 3.2.22.** cFos Expression im infralimbischen Kortex. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \* $p<0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

In Core und Shell des NAcc zeigte sich der Trend zu einer höheren cFos Expression bei den iTBS behandelten Tieren im Vergleich zu den Sham-Tieren, allerdings ohne Signifikanz.



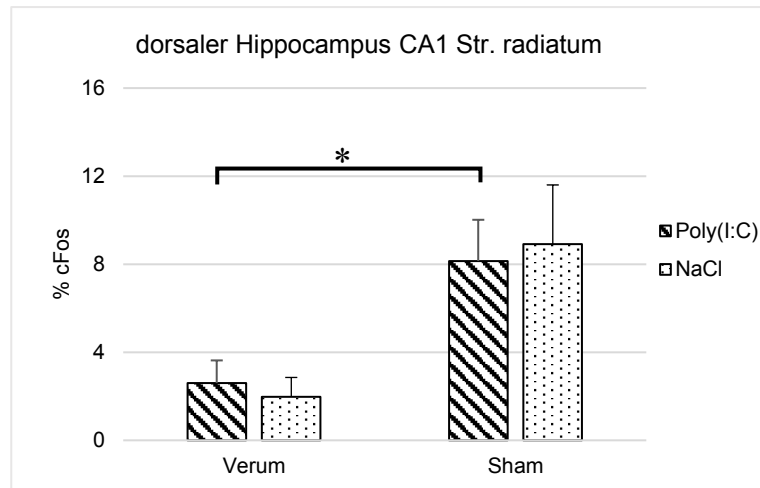
**Dia. 3.2.23.** cFos Expression im Core des Nucleus accumbens. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)



**Dia. 3.2.24.** cFos Expression im Shell des Nucleus accumbens. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Betrachtet man die Verum- und Sham-Tiere der Gruppen gemeinsam, lässt sich erkennen, dass die NaCl-Tiere im PrL, IL und NAcc tendenziell mehr cFos exprimieren als die Poly(I:C)-Tiere. Signifikant mehr cFos wird von den NaCl-Tieren im Str. pyramidale des CA1 des dHipp ( $t$ -Test  $t(36.170)=-2.039$ ,  $p=0.049$ ,  $z$ ANOVA  $F(1, 46)=4.220$ ,  $p=0.046$ ) und Str. moleculare des GD des dHipp (U-Test  $p=0.003$ ) exprimiert.

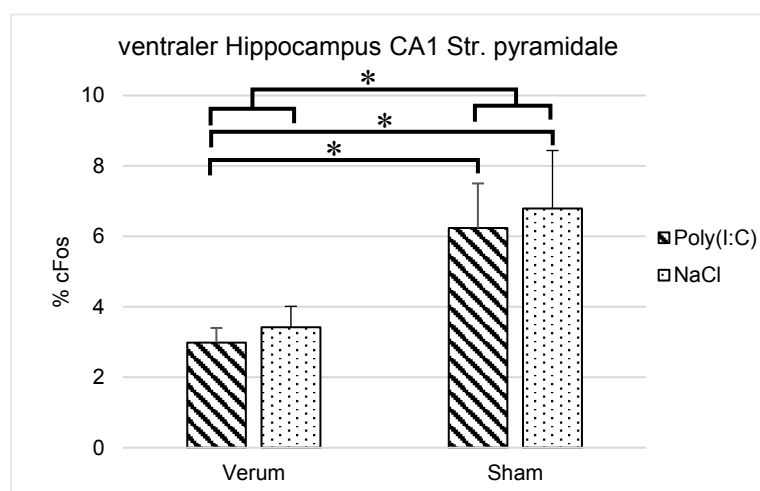
Im Str. radiatum des CA1 des dHipp zeigte die Gruppe Poly(I:C) Verum eine signifikant geringere cFos Expression als die Gruppen Poly(I:C) Sham (U-Test  $p=0.03$ ). Der U-Test zeigte eine schwächere cFos Expression bei den iTBS behandelten als bei den Sham-Tieren mit einer Signifikanz von  $p=0.004$ .



**Dia. 3.2.25.** cFos Expression im Str. radiatum des CA1 des dorsalen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; U-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

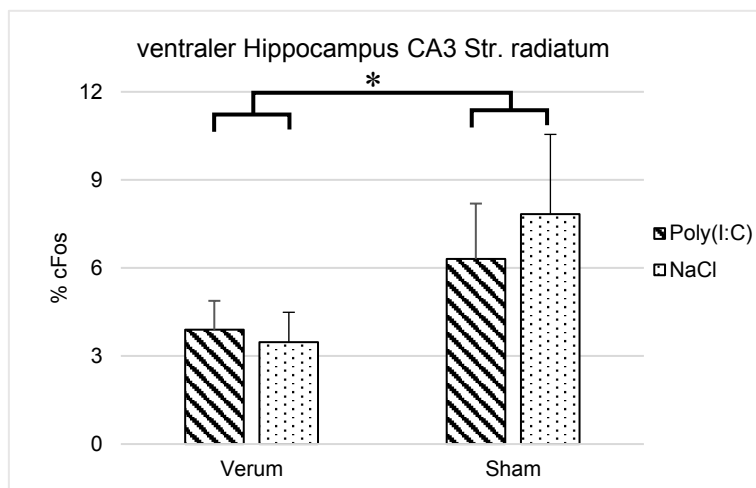
Im Gegensatz dazu exprimieren die Zellen im Str. radiatum des CA3 sowie im Hilus des GD des dHipp tendenziell mehr cFos nach der iTBS Behandlung.

Im Str. pyramidale des CA1 des vHipp exprimierten die Zellen der Verum-Tiere, ähnlich wie im dHipp, signifikant weniger cFos als die der Sham-Tiere (t-Test  $t(27.283) = -3.113$ ,  $p = 0.004$ , zANOVA Verum/Sham  $F(1, 45) = 10.194$ ,  $p = 0.003$ ). Dies zeigte sich auch zwischen den Gruppen Poly(I:C) Verum und Poly(I:C) Sham (t-Test  $t(13.324) = -2.431$ ,  $p = 0.03$ , eANOVA  $F(3) = 3.496$ ,  $p = 0.027$ ). Außerdem lässt sich eine geringere Expression von cFos bei den Poly(I:C) Sham-Tieren gegenüber den NaCl Sham-Tieren erkennen. Auch in allen 3 Schichten des CA3 senkt die iTBS Behandlung die cFos Expression, wobei dies im Str. radiatum auch in der zANOVA statistisch signifikant ist ( $F(1, 42) = 4.223$ ,  $p = 0.046$ ). Vergleicht man die Sham-Gruppen, zeigen auch hier die Poly(I:C)-Tiere eine niedrigere Expression.



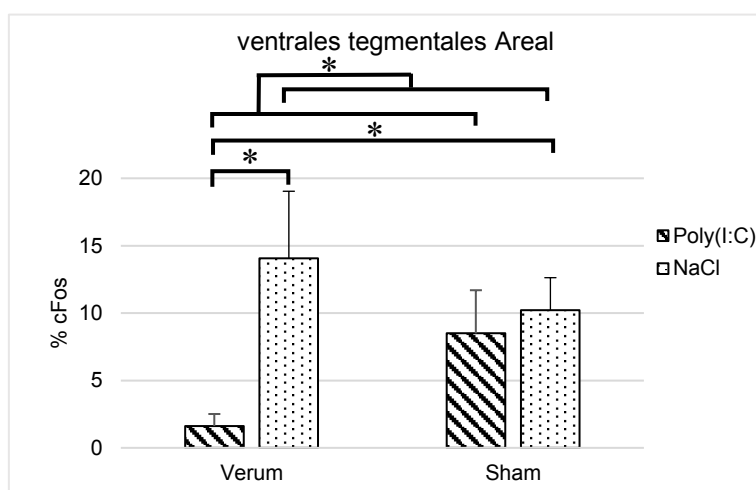
**Dia. 3.2.26.** cFos Expression im Str. pyramidale des CA1 des ventralen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)





**Dia. 3.2.27.** cFos Expression im Str. radiatum des CA3 des ventralen Hippocampus. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

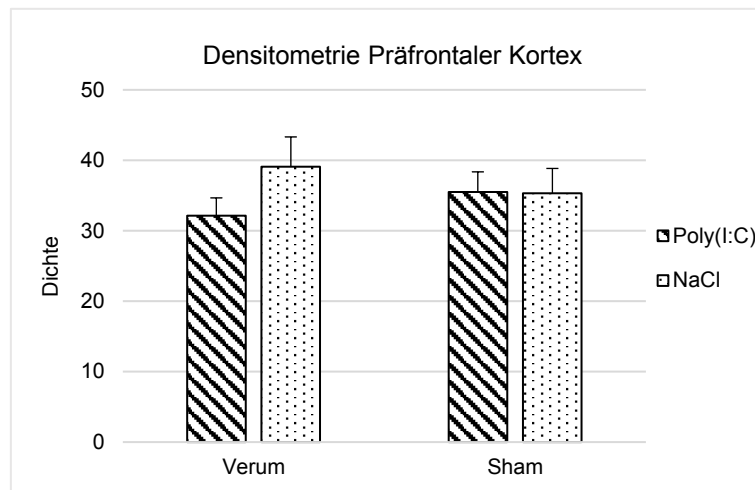
Im VTA zeigte sich eine signifikant höhere cFos Expression bei der Gesamtheit der NaCl-Tiere als bei der Gesamtheit der Poly(I:C)-Tiere (U-Test  $p = 0.02$ ). Durch die iTBS Behandlung wird bei den NaCl-Tieren eine signifikant höhere Anzahl an cFos-positiven Zellen exprimiert (U-Test  $p = 0.007$ ). Bei den Poly(I:C)-Tieren verhält sich dies umgekehrt. Die Poly(I:C) Sham-Tiere exprimieren tendenziell weniger cFos als die NaCl Sham-Tiere.



**Dia. 3.2.28.** cFos Expression im ventralen tegmentalen Areal. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test \* $p < 0.05$ ; angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

### 3.2.5. BDNF

Bei der statistischen Analyse der densitometrischen Werte von BDNF konnte in keiner Gehirnregion ein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. In Diagramm 3.2.29. sind die Ergebnisse der Densitometrie des PFC zu sehen. In den anderen Regionen verhält sich die Expression ähnlich.



**Dia. 3.2.29.** Densitometrie von BDNF im Präfrontalen Kortex. (Poly(I:C) Verum n=14 Tiere, Poly(I:C) Sham n=13 Tiere, NaCl Verum n=12 Tiere, NaCl Sham n=12 Tiere; t-Test; angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler)

#### 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte einer repetitiven transkraniellen Theta-Burst Stimulation auf Ratten eines Modells maternaler Immunstimulation untersucht. Das verwendete Poly(I:C)-Rattenmodell ist ein translationales Modell für die Schizophrenie beim Menschen. Durch eine i.v. Injektion von Poly(I:C) bei tragenden Ratten im letzten Trimester wird bei den Feten eine der Schizophrenie des Menschen ähnliche Erkrankung induziert (Meyer und Feldon 2012). Zum einen wurde durch die Durchführung einer Reihe von Verhaltensexperimenten der Verhaltensphänotyp bestimmt um die Auswirkungen der Poly(I:C)-Injektion und der iTBS auf das Verhalten zu charakterisieren, zum anderen wurde durch immunhistochemische Untersuchungen die Wirkung auf zellulärer Ebene genauer betrachtet. Beides ist nötig um die Ergebnisse mit den typischen Symptomen und Gehirnveränderungen bei an Schizophrenie erkrankten Menschen zu vergleichen. Im Folgenden werden die Ergebnisse noch einmal kurz zusammengefasst und anschließend die Methodik und die Ergebnisse diskutiert.

Betrachtet man die Ergebnisse der Verhaltensversuche der Sham-Tiere lässt sich sagen, dass die Poly(I:C)-Tiere eine reduzierte Ängstlichkeit im EPM und eine schlechtere Gedächtnisleistung im NOB gegenüber den NaCl-Tieren zeigen. Trotz des schlechten Abschneidens im NOB, sind die Resultate im WM bei den Poly(I:C)-Tieren sehr positiv. Sie schneiden hinsichtlich räumlicher Orientierung und Arbeitsgedächtnis deutlich besser ab. Besonders auffällig ist, dass sie sich im PPI nicht von den anderen Gruppen unterscheiden.

Betrachtet man die Wirkung der iTBS auf das Verhalten, so sind die Poly(I:C) im EPM nach der Stimulation deutlich ängstlicher, wohingegen bei den NaCl-Tieren das Explorationsverhalten steigt. Dass die iTBS die Lernleistung verbessert, zeigt sich sowohl bei den Poly(I:C) als auch bei den NaCl-Tieren im NOB. Eine gesteigerte Lernleistung erkennt man ebenso bei den NaCl-Tieren im PF. Die Leistung der NaCl-Tiere im WM wird durch die iTBS positiv beeinflusst. Bei den Poly(I:C)-Tieren ist dieses Verhältnis umgekehrt: die Verum-Gruppe schneidet schlechter ab. Im SC wird durch die Stimulation der Poly(I:C)-Tiere die Anhedonie reduziert, die Motivation steigt. Auch die iTBS hat keinerlei Einfluss auf das PPI.

In der Immunhistochemie sind die Ergebnisse je nach Gehirnregion sehr unterschiedlich. Im PrL und IL zeigte lediglich das Markerprotein cFos eindeutige Unterschiede in der Expression. Die iTBS Behandlung senkt die Expression bei den Poly(I:C)- als auch bei den NaCl-Tieren. Bei GAD 67 konnte im PrL eine niedrigere Expression nach der iTBS Behandlung nur bei den Poly(I:C)-Tieren nachgewiesen werden. Im NAcc zeigten sich sowohl im Core als auch im Shell bei jedem der Markerproteine Unterschiede. Die PV Expression war bei den Poly(I:C) Verum-Tieren erhöht, bei den NaCl Verum-Tieren hingegen erniedrigt. CB, GAD 67 und cFos wurden alle nach der iTBS Behandlung, sowohl bei den Poly(I:C), als auch den NaCl-Tieren verstärkt von den Zellen exprimiert. Im dHipp und vHipp konnte kein klarer Trend festgestellt werden. Die verschiedenen Schichten der betrachteten Regionen reagierten alle unterschiedlich auf die iTBS Behandlung. Allerdings kann man sagen, dass bei Schichten ähnlicher Struktur und Funktion, z.B. im Str. radiatum des CA1 und CA3, auch die Expression der Proteine ähnlich ausfiel. In der VTA zeigte sich nochmal ein deutlicher Trend: hier war bei allen Markerproteinen die Expression nach der iTBS Behandlung bei den Poly(I:C) und den NaCl-Tieren erhöht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit entsprechen, vor allem hinsichtlich des Verhaltensphänotyps der nicht-stimulierten Poly(I:C)-Tiere, nicht den Erwartungen. Das Verhalten der Tiere stellte sich im PPI, SC und PF anders dar als in vorangegangenen Poly(I:C)-Studien. Dies macht die Interpretation der Ergebnisse in Bezug auf die Wirkung der iTBS schwierig und lässt die Frage aufkommen, ob der Poly(I:C)-Phänotyp durch andere Faktoren, wie Stress oder ausführliches Handlungen, zu leicht beeinflusst werden kann, sodass das Poly(I:C)-Modell

kein geeignetes Modell für die Erforschung von Schizophrenie, zumindest bei Untersuchungen zum Verhalten, darstellt.

#### **4.1. Methodische Aspekte**

##### **4.1.1. Wirkung des Poly(I:C)s**

In dieser Arbeit wurde die Poly(I:C)-Injektion am 15. Gestationstag mit einer Dosierung von 4 mg/kg durchgeführt. Das Poly(I:C)-Modell hat sich, neben anderen Modellen maternaler Immunstimulation, welche z.B. mit Hilfe von LPS oder Influenzaviren arbeiten, in den letzten Jahren in der internationalen Forschung etabliert (Meyer und Feldon 2012). Ursprünglich entwickelt wurde das Poly(I:C), und ebenso das LPS-Modell, um zu untersuchen inwieweit Cytokinimbilanzen eine Auswirkung auf die Entwicklung des Gehirns und das Verhalten der Nachkommen haben (Meyer et al. 2009b). Ein großer Vorteil des Poly(I:C)s ist, dass es einfach gehandhabt und angewendet werden kann ohne dass, wie bei pathogenen Viren, strenge Sicherheitsvorschriften beachtet werden müssen. Die Einhaltung des vorgegebenen Injektionszeitpunktes ist sehr wichtig, da die Immunreaktion auf eine Dauer von 24–48 h, je nach benutzter Dosierung, limitiert ist (Meyer et al. 2005, Cunningham et al. 2007). Untersucht wurde dies über die Veränderung der Körpertemperatur, des Körpergewichts, der Cytokinkonzentration sowie des Verhaltens des injizierten Tieres, wie eine reduzierte lokomotorische Aktivität und ein reduziertes Grabeverhalten. Die Injektion muss so erfolgen, dass die kritische, sensible Phase der Embryonalentwicklung des Gehirns, welche durch das Poly(I:C) beeinflusst werden soll, in den Zeitraum der Wirkdauer fällt. Bei Ratten entspricht dies dem 15.–17. Gestationstag. Damit diese Phase komplett mit der Wirkung des Poly(I:C)s abgedeckt wird, wurde der 15. Gestationstag als Injektionstag gewählt. Beim Mensch konnte als die kritische Phase für die Beeinflussung der Entwicklung durch eine Infektion und damit ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung des Kindes an Schizophrenie, das zweite Trimester der Schwangerschaft bestimmt werden (Mednick et al. 1988, Wrigth et al. 1995). Je nach Fragestellung der Studie, muss der Injektionszeitpunkt individuell festgelegt werden. Bei Untersuchungen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass nach Injektion am Gestationstag 9, also in der frühen bis mittleren Trächtigkeit, vor allem in mesolimbischen Arealen eine erhöhte Konzentration von Dopamin und dessen Metaboliten vorliegt und somit eher die Symptome der Positivsymptomatik der Schizophrenie nachgeahmt werden konnten (Winter et al. 2009). Bitanirwe et al. nutzen ebenfalls 5 mg/kg Poly(I:C) i.v., injizierte allerdings erst am 17. Gestationstag. Hier zeigte sich eine reduzierte Konzentration von Dopamin, Glutamat und GABA in verschiedenen Gehirnregionen und eine Negativsymptomatik (Bitanirwe et al. 2010).

Es wurden terminiert verpaarte Ratten zugekauft, die alle zum gleichen Zeitpunkt angepaart wurden. Wichtig für die Wirkung des Poly(I:C) ist, dass die Muttertiere während der Tage um die Injektion herum keinem Stress ausgesetzt werden. Der Transport der trächtigen Tiere und der damit verbundene Stress, könnte möglicherweise eine negative Auswirkung auf die Wirkung der Immunstimulation haben (Meyer et al. 2009a). Allerdings muss auch erwähnt werden, dass es Untersuchungen gibt, welche nachweisen, dass Stress im letzten Drittel der Trächtigkeit das Risiko für das Erkranken an Schizophrenie oder anderen psychischen Erkrankungen stark erhöht (Koenig et al. 2002, 2005, Bethus et al. 2005, Fumagalli et al. 2007, Müller und Bale 2007, 2008, Charil et al. 2010). So ist es ebenso möglich, dass durch den Stressfaktor zusammen mit der Poly(I:C)-Injektion die Wirkung der Immunstimulation noch gesteigert wird. Um dies genauer zu untersuchen, müsste man eine weitere Studie mit selbst verpaarten Muttertieren und zugekauften, trächtigen Tieren im Vergleich durchführen.

Wie bereits erwähnt, ist die richtige Dosierung des Poly(I:C)s sehr wichtig. Sie muss so gewählt werden, dass die größtmöglichen Effekte ausgelöst werden, jedoch die Trächtigkeit und die Entwicklung der Tiere nicht zu stark nachteilig beeinflusst werden. Ist die Dosierung

zu hoch, kann es zu einer erhöhten fetalen Sterblichkeit sowie spontanen Aborten kommen (Entrican 2002). Es wurden bereits viele Studien durchgeführt, die sich mit den Dosis-abhängigen Effekten beschäftigten und somit eine Orientierung für die Planung neuer Versuche liefern. Shi et al. führten dazu Verhaltensversuche an Mäusen durch. Die Tiere mit der höchsten Dosierung von 20 mg/kg zeigten ein Defizit im PPI gegenüber den Kontrolltieren. Allerdings war auch die Wurfgröße bei infizierten Tiere mit  $4.14 \pm 0.26$  Tieren deutlicher kleiner als bei den Kontrolltieren (Wurfgröße Kontrolltiere:  $8.25 \pm 1.03$ ) (Shi et al. 2003). Meyer et al. injizierten das Poly(I:C)-Mäusen intravenös (i.v.) in einer Konzentration von 2.5 mg/kg, 5 mg/kg und 10 mg/kg. Je höher die Poly(I:C)-Dosis, umso höher war der danach gemessene IL-10 Spiegel im Muttertier. Auch in den Feten steigt dieser mit der Dosierung. Durch eine größere Anzahl an spontanen Aborten bei einer höheren Dosis war die Anzahl an Feten der Gruppe mit einer Injektionsdosis von 10 mg/kg für weitere Untersuchungen schon zu klein. Auch Meyer et al. zeigten Defizite im PPI erst bei den höheren Dosierungen von 5 mg/kg und 10 mg/kg. Im Test auf vermehrte lokomotorische Aktivität nach Amphetamininjektion wurde ebenso erst ein Unterschied bei den beiden höchsten Poly(I:C)-Dosierungen sichtbar. Andere Versuche, wie das LI, zeigten keine Dosis-abhängigen Unterschiede. Um einen sicheren Poly(I:C)-Effekt zu erzielen, wird eine Dosis von ungefähr 5 mg/kg als Richtwert angegeben (Meyer et al. 2005). Neben den beiden genannten Studien an Mäusen, wurden auch die Auswirkungen verschiedener Dosierungen auf Ratten untersucht. Fortier et al. nutzen hierbei relativ niedrige Dosen (0.75 mg/kg und 1 mg/kg), welche an verschiedenen Gestationstagen Spargue-Dawley Ratten i.p. injiziert wurden. Hier konnten, unabhängig von der Dosis, keine Unterschiede im PPI im Vergleich zu den Kontrolltieren festgestellt werden (Fortier et al. 2007). Allerdings muss man sagen, dass die Dosierungen im Gegensatz zu den Versuchen von Meyer et al. und Shi et al. sehr niedrig gewählt wurden. Dem Protokoll dieser Arbeit am ähnlichsten ist die Studie von Wolff und Bilkey. Sie injizierten Spargue-Dawley Ratten 4 mg/kg Poly(I:C) i.v. und testeten die Nachkommen am 35. Lebenstag im PPI, wobei ein Defizit festgestellt wurde. Die Wurfgröße der Poly(I:C)-Tiere unterschied sich nicht von der der Kontrollgruppe (Wolff und Bilkey 2008). Demnach konnte mit der Dosierung von 4 mg/kg eine Veränderung ausgelöst werden ohne dabei die fetale Sterblichkeit und Abortrate zu erhöhen. Unterschiede in den Wurfgrößen konnten auch in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

In dieser Arbeit wurde die Injektion i.v. in die Schwanzvene durchgeführt. Viele andere Studien nutzen eine i.p. Injektion, welche schneller und einfacher durchgeführt werden kann. Allerdings ist gerade im späten Trächtigkeitsstadium die Gefahr groß, bei der i.p. Injektion Strukturen des Uterus oder die Feten selbst zu treffen. Des Weiteren benötigt man bei der i.v. Injektion im Vergleich zu i.p. oder subcutanen (s.c.) Injektionen eine niedrigere Dosis des Poly(I:C)s, da der Wirkstoff dann eine Bioverfügbarkeit von 100 % aufweist und keine Teile durch unzureichende Resorption aus dem Gewebe verloren gehen. Für die i.v. Injektion werden die Muttertiere mit Isofluran in eine leichte Narkose gelegt, um eine korrekte Punktion der Schwanzvene zu gewährleisten und Stress durch eine starke Fixation zu vermeiden. Allerdings besteht dabei immer ein Narkoserisiko, weshalb die Inhalation des Isoflurans so kurz wie möglich gehalten werden muss. In dieser Arbeit haben alle Muttertiere die Narkose gut überstanden.

Neben der Injektion des Poly(I:C)s können genetische Komponenten zusätzlich einen Einfluss auf die Entwicklung des schizophrenen Phänotyps haben. In dieser Arbeit wurde mit Ratten des Wistar Stammes gearbeitet, welche nicht speziell genetisch verändert sind. Eine andere Studie nutzte genetisch veränderte Mäuse, welche vermehrt das Cytokin IL-10 exprimieren und stellten im Vergleich zu normalen Mäusen eine geringere Ausprägung der Poly(I:C) bedingten Veränderungen fest (Meyer et al. 2008b). Smith et al. stellten den gleichen Sachverhalt an IL-6 dar (Smith et al. 2007). In beiden Fällen zeigten die genetisch veränderten Tiere ohne Poly(I:C)-Injektion allerdings Auffälligkeiten im Verhalten der Jungtiere. Auch Polymorphismen in den Genen für die Catechol-O-Methyltransferase (COMT), für Neuregulin 1 (NRG 1) und für disrupted in

shizophrenia-1 (DISC 1) können ähnlich wie eine pränatale Infektion wirken und das Risiko für ein Erkranken an Schizophrenie erhöhen (Harrison und Weinberger 2005). Diese synergistische Wirkung von DISC 1 bestätigten Abazyan et al. durch eine Studie an DISC 1 mutierten Mäusen mit und ohne maternaler Immunstimulation, wobei bei doppelter Belastung die Veränderungen noch verstärkt wurden. (Abazyan et al. 2010). Ibi et al. zeigten zusätzlich eine stark reduzierte PV Expression (Ibi et al. 2010).

Wie bereits erwähnt, kann Stress die Wirkung des Poly(I:C)s beeinflussen. So können kritische Lebensereignisse in der Kindheit, wie der Verlust eines geliebten Menschen oder ein schlechtes Verhältnis innerhalb der Familie, bei bereits genetischen oder durch maternale Infektionen vorbelasteten Kindern das Risiko für die Entstehung des Krankheitsbildes der Schizophrenie stark erhöhen. In vielen Untersuchungen wurden deshalb zwei der auslösenden Faktoren angewendet (Meyer et al. 2008b, Abazyan et al. 2010, Richtand et al. 2012), um die Wahrscheinlichkeit der Ausprägung der typischen Merkmale, wie sensorische Gating-Defizite, Lerndefizite, Anhedonie, Antriebslosigkeit und die Auffälligkeiten im Gehirn, zu erhöhen. Für die Versuche dieser Arbeit wurde sich bewusst dazu entschieden lediglich das Poly(I:C) als einzelnen Faktor zu benutzen, da somit dessen Wirkung im Zusammenspiel mit der iTBS unbeeinflusst beurteilt werden kann. Es wurde besonders stark darauf geachtet, dass die Tiere keinem Stress ausgesetzt waren. Durch ein sehr ausführliches und intensives Handling vor der Stimulation und während der Wartezeit auf das Erreichen des nötigen Alters für die Verhaltensversuche wurden die Ratten an den Kontakt mit dem Menschen, die Umgebung und die Versuchsapparate gewöhnt und somit jeglicher Stress während der Versuche weitestgehend verhindert. Jedoch weichen die Ergebnisse der Versuche dieser Arbeiten, teilweise von den bereits durchgeführten Studien, welche im Folgenden in der Diskussion der Ergebnisse genauer betrachtet werden, ab. Unerwartet ist das Ergebnis des PPI, da bei Poly(I:C)-Tieren in nahezu allen vorhanden Studien ein Defizit festgestellt wurde, welches die Tiere in dieser Studie nicht zeigen. Ursächlich hierfür könnte das unterschiedliche Handling der Tiere im Vorfeld sein, welches in der publizierten Literatur nicht beschrieben wurde. Möglicherweise beeinflusst das lange, stressfreie Handling der Tiere im Vorfeld der Versuche den Verhaltensphänotyp so, dass sich keine typischen schizophrenen Verhaltensmuster, zumindest bei bestimmten Fähigkeiten, wie hier der Filterfunktion des Gehirns, ausbilden.

Die Symptome der Schizophrenie treten üblicherweise erst im späten Jugend- oder frühen Erwachsenenalter auf. Warum dies so ist, ist noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt verschiedene Erklärungsansätze. Eine Hypothese ist, dass die Reifung und Verknüpfung der kortikalen Strukturen erst im späten Jugendalter abgeschlossen ist, das Gehirn dadurch an Plastizität verliert und sich die typischen pathologischen Veränderungen ausbilden (Keshavan und Hogarty 1999). Hormonelle Veränderungen im Körper während der Pubertät werden als weitere mögliche Ursache angesehen (Halbreich und Kahn 2003). Betrachtet man die hormonellen Einflüsse auf das Krankheitsbild der Schizophrenie, ist besonders interessant, dass Männer im Durchschnitt wesentlich früher als Frauen erkranken. Laut Hafner liegt das Durchschnittsalter bei Männern bei 26.5 Jahren, bei Frauen hingegen erst bei 30.6 Jahren. Ein zweiter auffälliger Anstieg der Erkrankungsrate bei Frauen erfolgt im Alter von 40–50 Jahren, wenn sich die Postmenopause einstellt. Auch die Prognose fällt bei Männern schlechter aus (Hafner 2003). Diese Tatsachen legen nahe, dass das Östradiol einen Einfluss auf die Entwicklung der Erkrankung hat. Ihm wird eine neuroprotektive Wirkung, eine Beteiligung am embryonalen und fetalen Wachstum, sowie an der Entwicklung des Gehirns zugesprochen (Rao und Kolsch, 2003). Des Weiteren ist es an der Regulation des dopaminergen- und serotonergen Systems beteiligt. Damit die Verhaltensversuche durch die Schwankungen des Östrogenspiegels und der anderen am Zyklus der weiblichen Tiere beteiligten Hormone nicht beeinflusst werden, wurden für die Versuche ausschließlich männliche Wistar Ratten verwendet. Studien, welche Nagermodelle benutzten, sprachen von der post-pubertären Lebensspanne ab dem 55.–60. Lebensjahr (Spear 2000, Ojeda und Skinner 2006). Viele Studien, welche Untersuchungen an juvenilen als auch an adulten Tiere

des Poly(l:C)-Modells durchführten, zeigen, dass erst im Erwachsenenalter Unterschiede zu den Kontrollgruppen bestehen (Zuckermann et al. 2003, Zuckermann und Weiner 2005, Meyer et al. 2006b, Ozawa et al. 2006, Vuillermot et al. 2010). Damit die Tiere sich sicher in dem für das Auftreten der Symptome relevanten Alter befinden, wird mit den Verhaltensversuchen in der 11. LW begonnen.

#### 4.1.2. Durchführung der iTBS

Die Tatsache, dass das Gehirn von Nagern um ein vielfaches kleiner ist als das des Menschen, macht den Vergleich der Wirkung der iTBS schwierig. Durch die Verwendung einer Doppelspule, welche das Maximum des Magnetfeldes sehr stark auf eine Stelle, an den Berührungspunkt der beiden zusammengefügt Rundspulen, konzentriert, wird das stimulierte Areal kleinstmöglich gehalten. Nichtsdestotrotz ist es bei Ratten nicht möglich, ein bestimmtes Gehirnareal einzeln zu stimulieren. Die Spule wird mittig über dem Schädel platziert mit dem Ziel, das Corpus callosum zu stimulieren, welches beide Gehirnhälften miteinander verbindet und über Neurone und Interneurone die Erregung an die relevanten Gehirnareale weiterleitet. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind somit nicht nach Reaktionen der einzelnen Gehirnregionen zu unterscheiden wie es beim Mensch möglich ist, wenn die Stimulation z.B. nur über dem motorischen Handareal erfolgt. Des Weiteren ist durch die gleichzeitige Stimulation der rechten und linken Hemisphäre weniger relevant, ob man von rechts nach links oder von links nach rechts stimuliert.

Die Wirkung der Stimulation ist weiterhin davon abhängig, wie weit entfernt sich das Gehirn vom Magnetfeld befindet. Wie bereits erwähnt, ist es für eine optimale Stimulation nötig, dass die Kopfhaut gerade so nicht die Ummantelung der Spule berührt, aber auch nicht mehr als ein Blatt Papier dazwischen passt. Da die Ratten während der Stimulation nicht narkotisiert waren, ist die richtige Fixation als auch die Kooperationsbereitschaft der Tiere von entscheidender Bedeutung. Auch hier ist das vorangegangene intensive Handling der Tiere eine Grundvoraussetzung für die optimale Durchführung der Stimulation. Die wenigen Tiere, die trotz der Gewöhnung an den Menschen und die Fixation nervös waren, wurden in ein Stofftuch gewickelt, welches sich beruhigend auswirkt da es ihnen Schutz bietet. In vorangegangenen Studien dieser (Thimm und Funke 2015) und anderer (Post et al. 1999) Arbeitsgruppen wurden die Tiere für die TMS mit Urethan narkotisiert, nach der Stimulation jedoch zeitnah perfundiert. Eine Narkose mit Urethan kommt für den Versuchsaufbau dieser Arbeit nicht in Frage, da die Tiere unbeeinträchtigt in den Verhaltensversuchen getestet werden müssen. Urethan kann lediglich in Versuchen verwendet werden, bei denen eine Narkose nötig ist, anschließend die Lebensfunktionen aber nicht wiederhergestellt werden sollen. Es wirkt organotoxisch und kanzerogen. Eine Narkose mit Isofluran reicht bei der Gesamtdauer der Stimulation von 45 min nicht aus. Des Weiteren könnte die Wirkung der Anästhetika die Ergebnisse der TMS als auch der Verhaltensversuche verfälschen.

Bei der hier verwendeten iTBS wird eine hohe Frequenz von 50 Hz angewendet. In Untersuchungen am Menschen wird die Frequenz aus Sicherheitsgründen hingegen oft nicht höher als 10 Hz gewählt (Wassermann 1998), da die TMS, vor allem bei vorbelasteten Menschen, das Risiko für das Auslösen eines epileptischen Anfalls birgt. Die Anwendung des Theta-Burst-Protokolls ist die vielversprechendste Variante, da die Effekte langanhaltend sind (Huang et al. 2005). Aus diesem Grund war die iTBS für die Untersuchung der Langzeiteffekte in dieser Arbeit die einzig richtige Wahl.

Die Intensität der Stimulation sollte so gewählt werden, dass ein ausreichend starkes Magnetfeld für die Nervenreizung entsteht, die motorische Reizschwelle der Tiere jedoch nicht überschritten wird. Ob die motorische Reizschwelle überschritten ist, kann man durch Muskelzuckungen der Nackenmuskulatur der Ratten bei der Fixation für die Stimulation feststellen. Die Stimulationsintensität wird so gewählt, dass sie 80 % der motorischen

Reizschwelle beträgt. Bei adulten Ratten wird diese mit 23 % angegeben. Da sich die nötige Intensität umgekehrt proportional zur Größe des Gehirns verhält, ist bei jüngeren Tieren eine höhere Intensität nötig. Am ersten Tag der Stimulation wurde über Einzelpulse getestet, wo sich die motorische Reizschwelle befindet und die Intensität danach angepasst. Auch während der 2-wöchigen Stimulationsphase wurde dies immer wieder überprüft, da die Tiere stetig an Gewicht zunehmen und sich damit auch das Gehirn vergrößert. Die optimale Stimulationsintensität wurde für die Tiere dieser Arbeit auf 30 % festgelegt.

Wie bereits in 1.3.8. erwähnt, sind bisher nur Kurzzeiteffekte der TBS nachgewiesen. Benali et al. konnten Veränderungen in der Expression des Calcium-bindenden Proteins PV bis 7 Tage nach der Stimulation feststellen (Benali et al. 2011). Da die Stimulation bei den meisten Studien allerdings erst im Erwachsenenalter durchgeführt wurde, wurde in den Untersuchungen dieser Arbeit auf eine Applikation der iTBS noch vor der Pubertät gesetzt, um langanhaltende Effekte zu erlangen. Wie Mix et al. zeigten, ist allerdings auch eine zu frühe Stimulation ohne Wirkung (Mix et al. 2015). Vom prä-pubertalen Lebensabschnitt spricht man bei Ratten zwischen dem 28. und 35. Lebenstag (Spear et al. 2000), was den Beginn der Stimulationsphase in der 5. LW, wie es in dieser Arbeit der Fall war, als den optimalen Zeitpunkt darstellt.

Da es zur Wirkung der iTBS an Poly(I:C)-Tieren bisher sehr wenig Studien gibt, ist die Interpretation der Ergebnisse schwierig. Der sehr lange Abstand zwischen iTBS und Verhaltensversuchen von 4 Wochen ist bisher in keiner Studie untersucht und kann deshalb einen großen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die iTBS auch langfristig einen positiven Einfluss auf das Lernverhalten hat. Die vorhandenen Studien weichen in ihrem Aufbau meist hinsichtlich des Alters der Tiere bei der Stimulation, der Stimulationsdauer, dem Stimulationsprotokoll, der Rasse der Ratten und dem Abstand zwischen Stimulation und Verhaltensversuch voneinander ab, wodurch ein Vergleich schwierig wird. Gerade für die Etablierung der iTBS als alternative Behandlungsmöglichkeit für Schizophrenie ist es wichtig das Studiendesign so zu gestalten, dass die Zeitpunkte der Behandlungen und Untersuchungen so realistisch wie möglich auf den Menschen übertragbar sind. Dies wurde in dieser Arbeit mit der iTBS Behandlung während der Neuronalentwicklung und den Verhaltensversuchen im Erwachsenenalter, wenn sich der Phänotyp der Schizophrenie mit Anhedonie, Defiziten im PPI, verringerter Ängstlichkeit und Lerndefiziten nach bereits genannten Studien zeigt (Zuckermann et al. 2003, Zuckermann und Weiner 2005, Meyer et al. 2006b, Ozawa et al. 2006, Vuillermot et al. 2010), berücksichtigt. Es wurde sich bewusst für die Verwendung von Ratten des Wistar-Stammes entschieden, da sich diese sehr gut händeln lassen und sich deshalb für Verhaltensversuche eignen.



## 4.2. Diskussion der Ergebnisse der Verhaltensversuche

### 4.2.1. Beeinflussung des Angstverhaltens

Das EPM ist eine schon lang praktizierte und einfache Methoden das Angstverhalten von Nagern, zum Beispiel auch unter dem Einfluss von Medikamenten, zu untersuchen. Ratten sind von Natur aus neugierig und wollen eine neue Umgebung erkunden, bevorzugen jedoch auch geschlossene, geschützte Räume. Diese beiden Aspekte konkurrieren beim EPM miteinander. Normalerweise überwiegt die Ängstlichkeit, sodass sich die Ratten vermehrt in den geschlossenen Armen aufhalten. Entgegen den Erwartungen, zeigten die Poly(I:C) Sham-Tiere im EPM eine reduzierte Ängstlichkeit gegenüber den NaCl Sham-Tieren. Sie hielten sich mehr in den offenen Armen auf. Eine Wirkung der iTBS lässt sich bei den Poly(I:C)-Tieren erkennen: die Poly(I:C) Verum-Gruppe zeigte eine erhöhte Ängstlichkeit gegenüber den nicht stimulierten Tieren. Das Ergebnis der Poly(I:C) Verum-Gruppe entsprach in etwa dem der nicht-stimulierten NaCl-Kontrolltieren. Dies spricht dafür, dass die iTBS bei vor der Pubertät befindlichen Ratten die Wirkung des Poly(I:C)s beeinflusst. Nichtsdestotrotz ist das sich hier zeigende Verhalten der Poly(I:C) Sham-Tiere nicht typisch für Tiere dieses Schizophreniemodells. Yee et al. konnten eine erhöhte Ängstlichkeit bei Poly(I:C)-Tieren feststellen (Yee et al. 2011). Diesen Trend zeigten auch die Untersuchungen von Abazyán et al., wobei eine noch stärkere Ausprägung der Ängstlichkeit bei Mäusen mit, neben der Poly(I:C)-Injektion, zusätzlichen Mutationen im disrupted-in-schizophrenia-Gen 1 zu finden war (Abazyán et al. 2010). Andere Untersuchungen, wie die von Ratnayake et al. und Li et al., konnten keine Unterschiede im Verhalten im EPM zwischen Poly(I:C)- und Kontrolltieren finden (Ratnayake et al. 2012, Li et al. 2014). Eine zweite Möglichkeit das Angstverhalten von Nagern zu untersuchen ist der Open-Field-Test. Dabei werden die Tiere in eine leere viereckige Kiste verbracht und deren Bewegungen über einen bestimmten Zeitraum aufgezeichnet. Auch hier ist es normal, dass die Tiere sich um Schutz zu suchen eher an den Wänden aufhalten, jedoch auch gelegentlich aus Neugier den inneren Teil der Kiste erkunden. Es konnte gezeigt werden, dass Poly(I:C)-Tiere zu einer erhöhten Ängstlichkeit neigen (Shi et al. 2003, Ratnayake et al. 2012, Li et al. 2014), was somit das Gegenteil zu den Ergebnissen dieser Arbeit darstellt und die Eignung des Poly(I:C)-Modells für den Versuchsaufbau in Frage stellt. Das ausführliche Handling der Ratten oder die iTBS Behandlung an sich, unabhängig davon ob Sham oder Verum, kann die Entstehung des erwarteten Phänotyps in Bezug auf das Angstverhalten beeinflusst haben.

Bei den Kontrolltieren bewirkte die Stimulation das Gegenteil: die Ängstlichkeit der Tiere wurde reduziert und sie erkundeten mehr die offenen Arme. Eine vorangegangene, noch nicht publizierte Studie meiner Arbeitsgruppe, welche für die folgenden Betrachtungen als Studie<sub>Adult</sub> bezeichnet wird, beschäftigte sich mit dem Verhalten von Poly(I:C)-Tieren, welche schon ausgewachsen waren. Hier wurden mit mindestens 3 Monate alten Tieren erst Verhaltensversuche durchgeführt, dann mit Verum oder Sham iTBS stimuliert und anschließend die Verhaltensversuche wiederholt. Die Verhaltensversuche liefen nach dem gleichen Protokoll wie in dieser Studie. Im EPM konnte man bei den älteren Tieren ähnliche Ergebnisse erkennen. Im Verhalten vor der Stimulation zeigte sich zwischen Poly(I:C) und NaCl kein Unterschied. Nach der Stimulation hingegen bewegten sich die Kontrolltiere mit iTBS ebenso deutlich mehr in den offenen Armen. Möglicherweise fördert die iTBS bei gesunden Tieren das Explorationsverhalten und die Motivation. Somit kann man schlussfolgern, dass die iTBS bei gesunden Tieren unabhängig vom Stimulationszeitpunkt Veränderungen im Angstverhalten bewirken kann. Das Nicht-Erkunden der Umgebung kann auch als eine reduzierte lokomotorische Aktivität und reduzierte Motivation interpretiert werden.

Kritisch bei der Durchführung des EPM sind die räumlichen Bedingungen zu betrachten. Durch die Platzierung des EPM im Versuchsraum kommt es dazu, dass einer der offenen Arme relativ nah an der Wand des Raumes endet. Dadurch könnten sich die Ratten

vermehrt im offenen Arm aufgehalten haben, da sie an der Wand Schutz suchten. Um eine Ablenkung der Ratte durch Gerüche, z.B. der Ratte aus dem vorherigen Versuchsdurchgang, zu vermeiden, wird das EPM nach jedem Tier sorgfältig mit Ethanol gereinigt. Hier könnten die Ratten gegebenenfalls durch unvollständiges Reinigen vom eigentlichen Versuch abgelenkt worden sein.

#### **4.2.2. Beeinflussung der verschiedenen Gedächtnisformen sowie des räumlichen Orientierungsvermögens**

Der NOB ist ein weit verbreiteter Test zur Untersuchung von Gedächtnisfunktionen. Neben der Beurteilung des Arbeitsgedächtnisses, kann auch eine Aussage über Angstverhalten, Aufmerksamkeit, Motivation und Interesse an neuen Dingen getroffen werden. Im ersten Wiederholungsdurchgang nach 1 h, in dem das Kurzzeitgedächtnis überprüft wird, zeigten die 4 Vergleichsgruppen keine Unterschiede im Verhalten. Alle beschäftigten sich mehr mit dem neuen als mit dem alten Objekt. Beim zweiten Durchgang nach 24 h treten jedoch deutliche Unterschiede auf. Die nicht mit iTBS behandelten Poly(I:C)-Ratten beschäftigten sich signifikant mehr mit dem bereits bekannten Objekt. Die Stimulation führte bei den Poly(I:C) als auch den Kontrolltieren zu einer Verbesserung des Langzeitgedächtnisses, wobei die Poly(I:C)-Ratten trotzdem noch schlechter abschnitten. Dass die TMS die Lernleistung verbessern kann, zeigten schon Mix et al. in ihren Untersuchungen an Ratten in einem modifizierten Radial Maze (Mix et al. 2010). Ein Hinweis darauf, dass die iTBS die Effekte des Poly(I:C) möglicherweise nur bei juvenilen Tieren beeinflussen kann, zeigt sich wenn man vergleichend die Studie<sub>Adult</sub>, welche in Abschnitt 4.2.1. genauer beschrieben wurde, betrachtet. Die Kontrolltiere mit iTBS beschäftigen sich am zweiten Tag wesentlich mehr mit dem neuen Objekt als die nicht stimulierten Ratten. Bei den Poly(I:C)-Tieren lässt sich dies jedoch nicht erkennen, die Verum-Gruppe beschäftigt sich vermehrt mit dem bereits bekannten Objekt.

In einer Studie an Poly(I:C)-Mäusen wurden im NOB schon im Durchgang nach 1 h Unterschiede sichtbar. Die Poly(I:C)-Tiere beschäftigten sich weniger mit dem neuen Objekt (Ratnayake et al. 2012). Bei Betrachtung von juvenilen und adulten Mäusen wurde dies sowohl im Durchgang nach 1 h als auch nach 1 Tag nur bei den adulten Tieren sichtbar (Ozawa et al. 2006). Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich die Verhaltensauffälligkeiten der Tiere erst mit Erreichen des Erwachsenenalters manifestieren. Ito et al. stellten hingegen das Gegenteil fest: die Mäuse der Poly(I:C)-Gruppe hatten deutlich mehr Interesse am neuen Objekt als die Kontrolltiere. Allerdings hatten die Tiere hier nur 5 min Zeit sich mit den Objekten zu beschäftigen und der Versuchsdurchgang fand anschließend schon nach 5 min statt (Ito et al. 2010). Fast denselben Versuchsablauf nutzten Mattei et al.: die Mäuse haben 5 min Zeit die Objekte zu erkunden, nach 5 min Pause folgt der Versuchsdurchgang, allerdings mit einer Dauer von nur 3 min. Hier beschäftigten sich die Poly(I:C)-Tiere weniger mit dem neuen Objekt (Mattei et al. 2017). Die Ergebnisse der verschiedenen Studien sind sehr unterschiedlich und zeigen, dass wahrscheinlich der Abstand zwischen den Testdurchgängen sowie die Zeitdauer, welche die Tiere zum Einprägen der Objekte zur Verfügung haben, eine entscheidende Rolle spielt.

Durch die Habituation der Ratten an die Versuchskiste über 2 Tage à 45 min wurde versucht zu verhindern, dass die Tiere sich wie im Open-Field verhalten und sich aus Angst nur am Rand der Kiste aufhalten. Bei Tieren mit einer erhöhten Ängstlichkeit könnte diese Zeit jedoch nicht ausgereicht haben, um sie an die Versuchsbedingungen zu gewöhnen, wodurch der NOB beeinflusst worden sein könnte. Die Kiste war in einer ruhigen Ecke des Versuchsraums platziert. Dadurch findet sich immer ein Objekt etwas geschützter an der Wand, was die Ratten dazu veranlassen könnte, sich vermehrt mit diesem zu beschäftigen. Betrachtet man die Position im Vergleich mit der Zeitdauer der Beschäftigung mit dem

Objekt, lässt sich allerdings kein Zusammenhang erkennen. Um eine Präferenz für ein bestimmtes Objekt auszuschließen, wurden diese bei jeder Ratte in einer anderen Kombination verwendet. Auch hier war die Reinigung der Objekte und der Kiste mit Ethanol ein weiterer wichtiger Faktor, um eine olfaktorische Orientierung zu verhindern.

Durch das Verhalten im WM können die Tiere hinsichtlich des Arbeitsgedächtnisses sowie des räumlichen Orientierungsvermögens beurteilt werden. Angetrieben durch ihren natürlichen Instinkt aus dem Wasser schnellstmöglich zu entkommen, prägen sich die Ratten ihre Umgebung nach dem erstmaligen Auffinden der Plattform ein, um diese anschließend schneller zu finden. Entwickelt wurde das Testverfahren von Richard Morris (Morris 1984). Auffällig bei den Ergebnissen ist vor allem, dass die Poly(I:C) Sham-Tiere, sowohl hinsichtlich der Zeit bis zum Auffinden der Plattform, zurückgelegter Gesamtstrecke, Durchschnittsabstand zum Target und zum Zentrum als auch dem Verhaltenstyp, die besten Resultate liefern. An den Tagen 2 und 4 zeigen sich die größten Unterschiede zwischen den Gruppen. Richtand et al. stellten in seinen Untersuchungen fest, dass zwischen Poly(I:C)- und Kontrolltieren im normalen WM keine Unterschiede zu erkennen sind (Richtand et al. 2012). Han et al. kamen zu denselben Ergebnissen (Han et al. 2011). Ändert man allerdings den Standort der Plattform, schnitten die Poly(I:C)-Tiere beim Erlernen der neuen Position signifikant schlechter ab (Richtand et al. 2012). Eine weitere Studie mit wechselndem Plattformstandort zeigte ebenfalls, dass die stark von Poly(I:C) beeinflussten Tiere eine längere Strecke zurücklegten um die Plattform zu finden (Vorhees et al. 2015). In allen drei Studien wurde allerdings das Poly(I:C) i.p. injiziert. Nach einer i.v. Poly(I:C)-Injektion am Gestationstag 15 bei Ratten fanden sich bei den Nachkommen im WM keine Unterschiede zwischen Poly(I:C)- und Kontrolltieren hinsichtlich der Zeit bis zum Auffinden der Plattform (Piontkewitz et al. 2009, Zuckerman und Weiner 2015). Betrachtet man die bereits durchgeführten Versuche über die Wirkung einer 11-wöchigen rTMS auf das Verhalten von 3 Monate alten Wistar Ratten im WM, konnten von Post et al. keine Unterschiede gefunden werden (Post et al. 1999). Tan et al. stellten jedoch eine kürzere Zeit, eine kürzere zurückgelegte Strecke, sowie beim letzten Durchgang ohne Plattform, eine längere geschwommene Strecke und längere prozentuale Aufenthaltsdauer im Zielsektor bei den über zwei Wochen niederfrequent stimulierten Spargue-Dawley Ratten gegenüber den Kontrolltieren fest (Tan et al. 2013). Diese positive Auswirkung konnten auch Shang et al. an Wistar Ratten feststellen (Shang et al. 2016). Bei einer anderen Untersuchung schnitten sowohl niedrig- als auch hochfrequent stimulierte Wistar Ratten schlechter ab als die Kontrolle (Wang et al. 2010). Han et al. nutzten, wie in dieser Studie, iTBS und führte das WM vor und nach der 10-tägigen Stimulation an Spargue-Dawley Ratten durch. Hier zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen (Han et al. 2013). In der bereits in Abschnitt 4.2.1. erwähnten Studie<sub>Adult</sub> zeigten die Poly(I:C)-Tiere über alle Tage bessere Leistungen als die NaCl-Kontrolltiere. Nach der Behandlung mit iTBS fanden die Tiere das Target nochmal schneller und hielten sich am letzten Testtag prozentual gesehen noch mehr im Targetsektor auf als vor der Stimulation. Allerdings muss hier angemerkt werden, dass die Tiere durch das zweimalige Testen im WM, direkt in der 13. LW und anschließend nochmals in der 17., den Versuch bereits kennen und sich möglicherweise an den ersten Versuch erinnerten. Wie diese Auflistung zeigt, fallen die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen sehr unterschiedlich aus und weichen von den Ergebnissen dieser Arbeit ab. Die Resultate bereits durchgeführter Versuche dieser Arbeitsgruppe an Poly(I:C)-Ratten lassen immer wieder auf eine bessere Lernleistung der Poly(I:C)-Tiere schließen. Beim Betrachten der aufgezeichneten Videos des WM scheint es so, als schauen sich die Poly(I:C)-Tiere mehr im Bassin um und orientieren sich an den Wandmarkierungen bevor sie los schwimmen. Bei Kontrolltieren konnte dies nicht beobachtet werden. Sowohl im NOB als auch WM konnten in dieser Studie und der Studie<sub>Adult</sub> ähnliche Ergebnisse festgestellt werden. Andere Studien zeigten hingegen sehr variable Resultate. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Poly(I:C)-Modell und damit die Ausprägung des Schizophrenie-Phänotyps stark vom Versuchsaufbau und anderen äußeren Faktoren beeinflusst werden kann und es nicht für alle Arten von Untersuchungen geeignet ist. Die Interpretation der Ergebnisse

bezüglich der iTBS Wirkung auf die Schizophreniesymptome gestaltet sich schwierig, wenn kein klarer Schizophrenie-Phänotyp vorliegt.

Da für die Versuche Wistar Ratten, welche weißes Fell haben, verwendet wurden, konnte das Wasser nicht, wie in anderen Studien, weiß eingefärbt werden um die Plattform unsichtbar zu machen. Die selbstgeschriebene Software, welche die Bewegungen der Ratte aufzeichnet und auswertet, orientiert sich durch das Abheben der weißen Ratte vor dunklem Hintergrund. Mit weiß gefärbtem Wasser wäre der Kontrast für den Sensor zu gering. So wurde eine durchsichtige Plattform verwendet, um sie für die Ratten unsichtbar zu machen. Eine mögliche Fehlerquelle könnte sein, dass die Ratte je nach Lichteinfall die Plattform trotzdem wahrnimmt. Trotz des für die Ratten in der Software genau definierten Farbspektrum, kommt es vor, dass die Verfolgung der Ratte durch z.B. Tauchen unterbrochen wird. Dies könnte fehlerhafte Ergebnisse liefern, was jedoch durch die automatische Berechnung der fehlenden Sequenz durch die Software weitestgehend verhindert wird.

#### **4.2.3. Beeinflussung von depressiven Verhaltenszügen**

Der PF ist eine Möglichkeit auf depressive Verhaltensmuster zu untersuchen. Es wird davon ausgegangen, dass depressive Tiere eine reduzierte Motivation und damit verbunden eine höhere Immobilität im Wasserbehälter zeigen. Am ersten Tag waren die Kontrolltiere ohne iTBS Behandlung immobiler. Am Zweiten lassen sich die Kontrolltiere mit iTBS mehr treiben. Bei den Poly(I:C)-Tieren sind keinerlei Unterschiede zu erkennen. Wie bereits erwähnt, wurde in der Studie von Mix et al. gezeigt, dass die iTBS einen Einfluss auf das Lernverhalten haben kann (Mix et al. 2010). Möglicherweise lernten die Kontrolltiere mit iTBS Behandlung im ersten Versuchsdurchgang, dass sie nach einer gewissen Zeit aus dem Wasser genommen werden und sparen anschließend im zweiten Durchgang durch die Immobilität ihre Kraft. Bei den älteren Tieren aus Studie<sub>Adult</sub> (siehe Abschnitt 4.2.1.) verhielten sich am ersten Tag alle Gruppen gleich. Am zweiten Tag ist ein Unterschied zu erkennen. Die Poly(I:C)-Tiere mit iTBS sind inaktiver als die Sham-Tiere, was für ein Lernen spricht. Die stimulierten Kontrolltiere sind hier, im Gegensatz zu den Ergebnissen der juvenilen Tiere, deutlich aktiver als die Tiere der NaCl Sham-Gruppe. Auch dies spricht für die unterschiedliche Wirkung der iTBS je nach Stimulationsalter. Bei den Untersuchungen an Mäusen von Li et al. zeigten sich keine Unterschiede im PF zwischen Poly(I:C)- und Kontrolltieren (Li et al. 2014). Die Poly(I:C)-Injektion erfolgte hier am 9,5. Gestationstag. Khan et al. injizierten hingegen erst am 12,5. Tag und bekamen andere Ergebnisse. Die Poly(I:C)-Mäuse zeigten eine höhere Immobilität (Khan et al. 2014). Diesen Trend fanden auch Reisinger et al., jedoch ohne Signifikanz (Reisinger et al. 2016) Das Ergebnis des PF der ersten Verhaltensversuche der Studie<sub>Adult</sub>, bei der noch keine Stimulation stattgefunden hat, stimmt mit den Veröffentlichungen der anderen Arbeitsgruppen überein. Allerdings muss man beachten, dass es bisher keine Publikationen gibt in welchen an Ratten des Poly(I:C)-Modells der PF durchgeführt wurde. Die oben genannten Untersuchungen wurden alle an Mäusen durchgeführt, wobei das Versuchsprotokoll von dem bei Ratten verwendeten abweicht. Die Mäuse werden lediglich in einem Durchgang von 6 min getestet, bei dem nur die letzten 4 min ausgewertet werden. Für die Beurteilung bei Ratten sind die 5 min des zweiten Testtages entscheidend. Bei der Auswertung wurde zur Mobilität jede Bewegung gezählt, die nicht nur durchgeführt wurde um die Balance beim Treiben und den Kopf über Wasser zu halten. Hier liegt möglicherweise eine Fehlerquelle, da die Phasen von aktivem Schwimmen zum Treiben lassen fließend ineinander übergehen und oft schnell wechseln. Um alle Tiere gleich zu beurteilen, wurde diese Auswertung immer von ein und derselben Person mit der gleichen Stoppuhr durchgeführt.

#### 4.2.4. Beeinflussung der Anhedonie

Mit Hilfe des SC kann das Verhalten der Ratten hinsichtlich Anhedonie beurteilt werden. Anhedonie bezeichnet die Unfähigkeit Freude, Lust und Vergnügen zu empfinden und ist ein Symptom der Negativsyptomatik. Das Interesse an Dingen, die für die Ratten normalerweise interessant sind, wie z.B. süß riechende und schmeckende Lebensmittel oder Flüssigkeiten, ist reduziert oder nicht vorhanden. Katz et al. stellten in seinen Untersuchungen fest, dass chronisch gestresste Tiere einen reduzierten Konsum von Sucrose enthaltenden Flüssigkeiten zeigen (Katz et al. 1982), was als Grundlage für die Entwicklung des SC diente. In dieser Studie gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Es zeigt sich im Diagramm ein leichter Trend, dass die unbehandelten Poly(I:C)-Tiere eine geringere Gewichtszunahme als die Poly(I:C)-Tiere mit iTBS aufweisen. Dies könnte auf einen positiven Effekt der iTBS auf Lust und Motivation hindeuten. Betrachtet man im Vergleich die Studie<sub>Adult</sub>, welche im Abschnitt 4.2.1. genauer beschrieben wurde, zeigt sich die Wirkung der iTBS deutlicher bei den Kontrolltieren. Die NaCl Verum-Tiere haben eine höhere Gewichtszunahme als die NaCl Sham-Tiere. Zwar gab es auch einen Anstieg bei den Poly(I:C)-Tieren mit iTBS, jedoch nur geringgradig. Auch hier zeigt sich somit, dass die iTBS je nach Stimulationsalter unterschiedlich wirkt. Es gibt viele Studien, die die Wirkung des Poly(I:C) auf den Sucrosekonsum untersucht haben. Eine Mehrheit konnte eine reduzierte Aufnahme der süßen Flüssigkeit bei Poly(I:C)-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren feststellen (Bitanihirwe et al. 2010, da Silveira et al. 2017, Ronovsky et al. 2017, Berger et al. 2018). Die Ergebnisse sind damit identisch mit den Resultaten der beiden Sham-Gruppen in dieser Arbeit. Es muss angemerkt werden, dass in den genannten Studien der SC anders durchgeführt wurde als in dieser Studie. Der Test bestand aus einer mehrtägigen Habituations- sowie Testphase, in denen den Tieren zwei verschiedene Flaschen, welche mit Wasser und mit gezuckertem Wasser gefüllt waren, angeboten wurden. In die Auswertung wird dann der prozentuale Anteil des Konsums des gezuckerten Wassers an der gesamten Flüssigkeitsaufnahme berechnet. In diesem Projekt wurde mit einer 15-minütigen Testphase in der eine Trinkflasche angeboten wurde, welche gezuckerte Kondensmilch verdünnt mit Wasser enthielt, gearbeitet. Dieser Versuchsaufbau wurde ebenfalls schon zahlreich publiziert (Schneider et al. 2010, Rea et al. 2014, Edemann-Callesen et al. 2015, Hadar et al. 2016), allerdings noch nicht im Zusammenhang mit Untersuchungen am Poly(I:C)-Modell. Wang et al. zeigten, dass die rTMS einen positiven Effekt auf den Sucrosekonsum haben kann (Wang et al. 2014). Weitere Studien an Depressionsmodellen bestätigten dies (Feng et al. 2012, Kim et al. 2014, Peng et al. 2018).

Kritisch zu sehen ist der Futterentzug für 24 h vor Versuchsbeginn. Da die Tiere zu viert im Käfig gehalten werden, ist nicht sicher zu sagen, ob ein dominantes Tier mehr Futter als die pro Tier abgewogenen 15 g zu sich genommen hat. Dadurch kann der Konsum der gezuckerten Milch durch einen unterschiedlichen Sättigungsgrad unabhängig von der Motivation beeinflusst werden.

#### 4.2.5. Beeinflussung des sensomotorischen Gatings

Im PPI wird die Filterfunktion des Gehirns überprüft. Gesunde Tiere reagieren auf einen Schreckreiz mit einer Schreckreaktion, z.B. einem Zusammenzucken. Tritt dieser Reiz jedoch wiederholt auf und wird eventuell vorangekündigt, schwächt sich die Reaktion immer mehr ab. Es erfolgt eine Gewöhnung und eine Reizüberflutung wird verhindert. Im PPI wird dies durch eine Abfolge von Pre-Puls – Startle-Kombinationen überprüft. Dieser Versuch ist besonders interessant, da er auch an Menschen durchgeführt werden kann. Hier wird die Zuckung des Musculus orbicularis oculi, dem Augenringmuskel, mittels EEG aufgezeichnet. Bei Schizophrenie zeigen die Patienten typischerweise Defizite im PPI (z.B. Braff et al. 1992, 1999, 2001, Kumari et al. 1999, Parwani et al. 2000, Takahashi et al. 2008), weshalb das PPI als Biomarker für diese Erkrankung angesehen wird. So kann mit Hilfe des PPI eine

Aussage über Prognose und das Ansprechen auf eine Behandlung getroffen werden (Light und Swerdlow 2014).

Vorhees et al. beschrieben nach i.p. maternaler Poly(I:C)-Injektion eine reduzierte Inhibition bei hoher Dosierung und eine Erhöhte bei niedriger Dosierung (Vorhees et al. 2013 und 2015). Eine reduzierte Inhibition bei der höchsten Poly(I:C)-Dosierung war ebenfalls in den Versuchen von Shi et al. zu finden (Shi et al. 2003). In anderen Studien, bei denen das Poly(I:C) i.v. verabreicht wurde, war auch eine Reduktion der Inhibition zu erkennen (Wolff und Bilkey 2008, Wolff und Bilkey 2010, Dickerson et al. 2010, Yee et al. 2011, Howland et al. 2012). Fortier et al. konnten nach einer i.p. Injektion an verschiedenen Gestationstagen keine Veränderungen im PPI adulter Ratten finden. Hier zeigten nur Tiere mit maternaler Lipopolysaccharid-Immunistimulation ein reduziertes PPI (Fortier et al. 2007). Auch eine s.c. Injektion von Poly(I:C) bei Mäusen konnte ein Defizit im PPI auslösen. Die getesteten Tiere waren hier noch juvenil (Ratnayake et al. 2014). Andere Studien konnten einen Unterschied zu den Kontrolltieren nur an adulten Mäusen feststellen (Vuillermot et al. 2010). Der Effekt der rTMS auf die Ergebnisse des PPI wurde bisher kaum untersucht. Wang et al. stimulierten Spargue-Dawley Ratten mit rTMS und dies löste eine reduzierte Inhibition aus (Wang et al. 2015). In der Studie<sup>Adult</sup> dieser Arbeitsgruppe zeigte sich im PPI bei den Poly(I:C)-Kontrolltieren eine reduzierte Inhibition gegenüber den NaCl-Kontrolltieren. Nach der Stimulation zeigen die Tiere beider Gruppen ein noch größeres Defizit im PPI.

In dieser Arbeit zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen im PPI, was nicht den Erwartungen entspricht. Aufgrund der bereits vorhanden Studien wurde mit einer reduzierten Inhibition bei den Poly(I:C)-Tieren gegenüber den Kontrolltieren gerechnet. Ein Fehler in der Durchführung des PPI kann sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da die gleichen Geräte und das gleiche Protokoll verwendet wurde, wie bei vorausgegangen Untersuchungen der Arbeitsgruppe und dabei das PPI Defizit nachgewiesen werden konnte. Auffällig ist allerdings, dass die PPI Werte dieser Studie generell deutlich kleiner sind als bei Tieren vorangegangener Untersuchungen, welche älter waren oder vor dem PPI keine ausführliche Habituation an die Versuchsbedingungen hatten. Sehr wahrscheinlich hat besonders im PPI das bereits erwähnte ausführliche Handling der Tiere vor und während der Versuche einen einschneidenden Einfluss auf das Verhalten der Tiere. Besonders dieses Ergebnis weist darauf hin, dass das Poly(I:C)-Modell für Studien mit einem ähnlichen Versuchsaufbau wie in dieser Arbeit nicht geeignet ist, da das für den Schizophrenie-Phänotyp typische Defizit im sensomotorischen Gating nicht festzustellen war. Für kommende Studien sollte ein anderes Schizophreniemodell gewählt werden.

#### **4.1. Diskussion der Ergebnisse der Immunhistochemie**

In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Gehirnregionen, von denen jede eine andere funktionelle Bedeutung hat, untersucht. Dadurch ist es nötig, die einzelnen Schichten der Regionen unabhängig voneinander zu betrachten und die Ergebnisse zu interpretieren. Es kann keine allgemeingültige Aussage über die Expression eines Markerproteins in allen Regionen getroffen werden. Vorangegangene Studien beschäftigten sich meist nur mit einer Region, häufig mit dem PFC oder dem Hippocampus. Des Weiteren ist es schwierig, die Ergebnisse dieser Arbeit mit vorangegangenen Studien zu vergleichen, da zur Langzeitwirkung der iTBS keine Untersuchungen vorliegen. Jedes Markerprotein zeigt nach der Stimulation einen individuellen zeitlichen Verlauf der Expression (Benali et al. 2003, Hoppenrath und Funke 2013).

#### 4.1.1. Beeinflussung der Expression von PV

Das Calcium-bindende Protein PV wird im Gehirn von GABAergen Interneuronen exprimiert. Wie bereits gezeigt, ist PV (Beasley und Reynolds 1997, Reynolds und Beasley 2001, Reynolds et al. 2002, 2004, Han et al. 2017) sowie die mRNA des PV (Hashimoto et al. 2003) im PFC bei an Schizophrenie erkrankten Menschen verringert. Betrachtet man den PFC, lässt sich in dieser Arbeit zwischen den Poly(I:C)- und den NaCl-Kontrolltieren kein Unterschied erkennen. Meyer et al. hingegen fanden, wie bei Schizophrenie, eine verringerte Expression des PV bei den Poly(I:C)-Tieren im PFC (Meyer et al. 2008c). Nach der iTBS Stimulation verringerte sich in den Versuchen von Benali et al. ebenfalls die PV Expression (Benali et al. 2011). Auch dies konnte im PFC in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Beide erwähnten Auffälligkeiten, die reduzierte Expression bei Poly(I:C)-Tieren als auch nach iTBS konnte hingegen in den Ergebnissen der Zellzählung aus dem NAcc wiedergefunden werden. Poly(I:C)-Tiere exprimieren weniger PV als die NaCl-Kontrolltiere. Die iTBS reduzierte die Expression nur bei den Kontrolltieren, bei den Poly(I:C)-Tieren stieg sie an. Dies ist ein sehr interessantes Ergebnis, da die behandelten Poly(I:C)-Tiere eine ähnliche Expression wie die Sham-Kontrolltiere zeigen. Somit bewirkt in dieser Region die iTBS eine Aufhebung der Effekte des Poly(I:C)s. Da der NAcc am Lernen und der Gedächtnisbildung beteiligt ist, kann man die niedrigste Konzentration des PV bei den Poly(I:C)-Tieren ohne Stimulation mit dem schlechten Abschneiden dieser Gruppe im NOB in Verbindungen bringen. Des Weiteren ist er ein Teil des Belohnungssystems des Gehirns und hat einen Einfluss auf die Motivation, was die geringe Gewichtszunahme dieser Gruppe im SC erklären würde.

Im dHipp konnten Han et al. bei Poly(I:C)-Mäusen ein Defizit an PV-exprimierenden Neuronen nur im CA1 feststellen (Han et al. 2017). Dies ist auch anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nachvollziehbar. In den anderen Regionen des dHipp lässt sich kein klarer Trend erkennen. Da der Hippocampus für die Gedächtnisbildung, vor allem des räumlichen Gedächtnisses, zuständig ist, wäre die Erwartung nach diesem Ergebnis in der IHC, dass die Poly(I:C)-Sham-Tiere schlecht im WM abschneiden. Genau das Gegenteil war jedoch der Fall. Sie schnitten im Vergleich zu den anderen Gruppen am besten ab. Meyer et al. konnten auch im vHipp ein PV-Defizit feststellen (Meyer et al. 2008c). Dieser Trend zeigte sich hier nicht.

Da das VTA stark mit dem NAcc verknüpft ist, ist es nicht verwunderlich, dass auch hier die PV Expression bei den Poly(I:C)-Tieren niedriger ausfällt als bei den NaCl-Kontrolltieren. Die iTBS bewirkt eine Erhöhung der Expression bei beiden Gruppen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den Regionen, in denen ein klarer Trend erkennbar ist, wie dem NAcc, dem CA1 des dHipp und dem VTA, die iTBS Behandlung der Poly(I:C)-Tiere die Expression von PV deutlich erhöht. Somit kann man schlussfolgern, dass die GABAergen Interneurone durch iTBS langanhaltend positiv beeinflusst werden können, wenn die Tiere bereits vor der Pubertät stimuliert werden.

#### 4.2.6. Beeinflussung der Expression von CB

Die Expression des Calcium-bindenden Proteins CB bei Nachkommen maternaler Immunstimulation mit Poly(I:C) wurde bisher nicht untersucht, wodurch ein Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht möglich ist. Wie bereits in 2.6.4. erwähnt, liefern die Untersuchungen zur Expression des CB an schizophrenen Patienten sehr unterschiedliche Ergebnisse, welche von einer erhöhten Anzahl an CB-exprimierenden Zellen, über keine Auffälligkeiten bis hin zur erniedrigten Anzahl reichen. Die von Tooney und Chahl beschriebene gleiche Stärke der CB Expression bei Schizophrenie wie bei gesunden

Menschen im PFC stimmt mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein (Tooney und Chahl 2004). Im PFC der Ratten zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Nach der iTBS Behandlung zeigte sich in beiden Regionen des NAcc, Core und Shell, eine deutliche, auch statistisch signifikante, Erhöhung der CB Expression. Des Weiteren ist CB im NAcc, wie auch schon PV, bei den Poly(I:C) Sham-Tieren in einer geringeren Konzentration als bei den NaCl-Kontrolltieren vorhanden. Da CB ebenfalls in GABAergen und glutamatergen Neuronen vorkommt, lassen sich hier die gleichen Schlüsse ziehen wie bei PV: das Defizit im NOB und der geringen Gewichtszunahme im SC der Poly(I:C) Sham-Tiere spiegelt die geringe CB Expression wieder. Auch im VTA ist die Expression des CB nach der iTBS signifikant erhöht, was ebenfalls bereits bei PV festgestellt wurde. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Betrachtung des CB zwischen den Poly(I:C) und NaCl keine großen Unterschiede zu erkennen sind, die iTBS allerdings Wirkung zeigt. Wie auch bei PV, entspricht dies nicht den Erwartungen. In bisher vorhandenen Studien wurde nur von einer gleichbleibenden (Benali et al. 2011) oder reduzierten Expression (Hoppenrath und Funke 2015) gesprochen. Möglicherweise ist die Zunahme der CB-exprimierenden Zellen eine Langzeitwirkung der iTBS bei Anwendung vor der Pubertät. Die erhöhte Expression im NAcc und VTA könnte allerdings auch ein indirekter Effekt der Stimulation kortikaler Areale sein. Durch die Zwischenschaltung verschiedener Interneurone kann sich die Erregung inhibitorisch oder exzitatorisch ausbreiten und je nachdem die Expression der Markerproteine beeinflussen. Durch die Durchführung der Verhaltensversuche nach der iTBS könnte auch die Durchführung der Versuche an sich das Expressionsmuster im Gehirn verändern.

In einer Studie an CB Knock-out Mäusen wurde gezeigt, dass diese eine reduzierte Ängstlichkeit zeigen und sich dadurch mehr in den offenen Armen des EPM aufhalten (Harris et al. 2016). Die Verarbeitung von Emotionen, wie Angst, findet vor allem in der Amygdala statt, die in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde. Daneben sind PFC und Hippocampus beteiligt. Die Tiere der Gruppen Poly(I:C) Sham und NaCl Verum hielten sich im EPM deutlich mehr in den offenen Armen auf als die anderen beiden Gruppen. Es lassen sich aufgrund der sehr unterschiedlichen CB Expressionsmuster innerhalb der einzelnen Schichten des Hippocampus jedoch keine klaren Rückschlüsse ziehen, dass eine niedrige CB Expression mit dem Verhalten im EPM korreliert. Auch im PFC zeigte sich, wie bereits erwähnt, kein Unterschied in der Expression zwischen den Gruppen. Um den Zusammenhang zwischen CB Expression und Angstverhalten genauer zu untersuchen, wäre es sinnvoll in kommenden Untersuchungen die Amygdala intensiver zu betrachten.

#### **4.2.7. Beeinflussung der Expression von GAD 67**

Die in den Neuronen exprimierte GAD 67 ist für die Decarboxylierung von GABA aus Glutamat verantwortlich, welches für neuronale Aktivitäten wie Neuroprotektion und Synaptogenese zuständig ist. Schaltet man die GAD 67 durch Genmutation (Asada et al. 1997) oder einen GAD-Inhibitor (Manson et al. 2001) aus, kommt es zu einer starken Reduzierung des GABA Spiegels im Gehirn. Die zweite Isoform, die GAD 65, welche sich am Nervenende befindet und GABA als Neurotransmitter synthetisiert, hat im Vergleich keinen so großen Einfluss. Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit die GAD 67 verwendet. Bei der Expression von GAD 67 stimmen die Ergebnisse von bereits durchgeführten Studien miteinander überein: an Schizophrenie erkrankte Menschen exprimieren weniger GAD 67 (Impagnatiello et al. 1998, Guidotti et al. 2000, Fatemi et al. 2005) und GAD 67 mRNA (Akbarian et al. 1995, Hashimoto et al. 2003, Guidotti et al. 2000, Veldic et al. 2004) im PFC und Kleinhirn.

Auch bei adulten Poly(I:C)-Tieren konnte bereits eine reduzierte Konzentration von GAD 67 mRNA im PFC gefunden werden (Labouesse et al. 2015, Casella et al. 2016). In den



Ergebnissen dieser Arbeit war bei der Poly(I:C) Sham-Gruppe eine signifikant höhere GAD 67 Expression als bei den anderen Gruppen zu finden, was nicht zu den Ergebnissen der Studien von Labouesse et al. und Casella et al. sowie den Untersuchungen an schizophrenen Patienten passt. Die miteinander übereinstimmenden Ergebnisse der GAD 67 Expression der Poly(I:C) Verum und NaCl Sham-Gruppe weisen auf einen Poly(I:C)-aufhebenden Effekt der iTBS hin, wie er bereits bei PV im NAcc zu erkennen war.

Zur Expression von GAD 67 im NAcc gibt es bisher keine Studien. In dieser Arbeit exprimieren die Poly(I:C)-Tiere im Core tendenziell mehr GAD 67, im Shell ist kein Unterschied zu erkennen. Allerdings zeigt sich im NAcc bei Poly(I:C) als auch NaCl-Tieren durch eine erhöhte Expression ein signifikanter iTBS Effekt. Auch im VTA, welches stark mit dem NAcc verknüpft ist, ist die Expression bei Poly(I:C)-Tiere sowie nach iTBS erhöht. Dies passt zu den Ergebnissen in diesen Regionen von PV und CB. Da alle 3 Markerproteine Aufschluss über die Aktivität der GABAergen Neurone geben, ist ein ähnliches Verhalten nach Stimulation ein eindeutiges Zeichen für eine Langzeitwirkung der iTBS bei Applikation vor der Pubertät. Im Vergleich zur bereits bekannten expressionsverminderten Kurzzeitwirkung (Mix et al. 2010, Benali et al. 2011, Hoppenrath und Funke 2013, Labedi et al. 2014), ist jedoch die Wirkung hier genau umgekehrt. Beachtet werden muss, dass die verwendeten Tiere in den Studien zur Kurzzeitwirkung immer adult waren. Ob die Wirkung der iTBS nun auf die frühe Applikation zurückzuführen ist oder sich die Expression erst Wochen nach der Stimulation verstärkt muss durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden

Harvey und Boksa untersuchten Poly(I:C)-Mäuse am 14. und 28. Lebenstag hinsichtlich GAD 67 Expression im CA1 des Hippocampus und deren Abhängigkeit vom Geschlecht. Betrachtet man die Ergebnisse der männlichen Tiere, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden, zeigte sich eine verringerte Expression von GAD 67 am 28. Lebenstag im Str. oriens des dHipp, sowie eine leicht erhöhte Expression im Str. oriens des vHipp am 14. Lebenstag (Harvey und Boksa 2012). In dieser Arbeit zeigte sich ebenfalls eine verringerte Expression im Str. oriens des CA1 des dHipp und keine Veränderung im vHipp bei den Poly(I:C) Sham-Tieren. Eine andere Studie stellte bei adulten Poly(I:C)-Tieren (Lebenstag 60) eine signifikant erhöhte Konzentration an GAD 67 mRNA im GD und CA2 des dHipp fest (Casella et al. 2016). Ein eindeutiger Trend der GAD 67 Expression ist im GD des dHipp in dieser Arbeit nicht sichtbar, im Str. granulare kann eine erhöhte Expression bei den Poly(I:C)-Tieren festgestellt werden.

#### 4.2.8. Beeinflussung der Expression von cFos

cFos ist ein Transkriptionsfaktor, der die Bildung neuronaler Verknüpfung und das Zellwachstum beeinflusst und dadurch Einfluss auf die synaptische Plastizität nimmt. Bei an Schizophrenie erkrankten Menschen ist eine verringerte cFos Expression zu finden (Boyajyan et al. 2015). Er dient im Gegensatz zu PV, CB und GAD 67, welche als Marker für das inhibitorische System gelten, als Marker für das exzitatorische System.

Ito et al. stellten nach maternaler Poly(I:C)-Injektion bei den adulten Nachkommen im CA1 des dHipp als auch des vHipp eine reduzierte cFos Expression fest (Ito et al. 2010). In der genannten Studie wurde des Weiteren untersucht, wie sich die cFos Expression verändert, wenn die Tiere 2 h vor dem Tod mit neuen Objekten konfrontiert wurden. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der cFos Expression im CA1 des dHipp (Ito et al. 2010). Im CA1 des dHipp als auch des vHipp zeigte sich in dieser Arbeit ebenfalls eine reduzierte cFos Expression bei den Poly(I:C) Sham-Tieren. Weitere Untersuchungen zum Einfluss des Poly(I:C) auf die Expression von cFos sind nicht vorhanden. Auch im PFC, NAcc und VTA konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass cFos von den Poly(I:C)-Tieren weniger exprimiert wird, wie es auch bei Schizophrenie der Fall ist.

Nach der iTBS bei Hoppenrath und Funke steigt cFos kurzfristig an, um dann unter den Wert der Expression der nicht stimulierten Tiere abzusinken (Hoppenrath und Funke 2013). Volz et al. zeigten ebenfalls einen immer stärkeren Abfall von cFos, je öfter die Stimulation wiederholt wurde (Volz et al. 2013). In einer weiteren Studie wurde die Expression bei verschiedenen Stimulationsprotokollen verglichen. Hier zeigte sich eine erhöhte Expression bei hochfrequenter und niederfrequenter rTMS. Die Expression nach iTBS wurde nur in den limbischen Kortexarealen beeinflusst und dies in beide Richtungen (Aydin Abidin et al. 2008). Im sensomotorischen Kortex konnte nach iTBS eine Erhöhung der cFos Expression und nach cTBS eine Reduktion gezeigt werden (Thimm und Funke 2015). Die Wirkung der iTBS auf cFos in dieser Arbeit fällt sehr unterschiedlich aus. Im PFC, in dem sonst bei keinem Marker ein Unterschied zu erkennen war, ist die Expression nach iTBS sowohl bei den Poly(I:C) als auch den NaCl-Tieren reduziert. Möglicherweise reagiert im PFC nur cFos auf die Stimulation, da es der einzige Marker ist, der das exzitatorische und nicht das inhibitorische System widerspiegelt. Im NAcc wird die Expression durch die Stimulation, wie bei den bereits genannten Markern, erhöht. Im CA1 des dHipp und des vHipp erfolgt wiederum eine Reduktion. Wie in den anderen Studien ist auch hier kein eindeutiger Trend zu erkennen. Die Reaktion fällt je nach betrachteter Gehirnregion sehr unterschiedlich aus.

Durch das methodische Vorgehen bei cFos die DAB Reaktion mit Nickel durchzuführen konnte eine stärkere Färbung als bei vorangegangenen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe erreicht werden. Dies ermöglichte eine genauere und bessere Auswertung. Bei der normalen DAB Reaktion trat oft das Problem auf, dass die cFos-exprimierende Zellen sehr schlecht angefärbt wurden, wodurch eine Auszählung schwierig wurde.

#### **4.1.2. Beeinflussung der Expression von BDNF**

BDNF ist ein Neurotrophin und hat damit ebenfalls einen Einfluss auf die synaptische Plastizität. Zur BDNF Expression bei Schizophrenie gibt es bereits viele Untersuchungen, deren Ergebnisse unterschiedlich ausfallen. Eine erhöhte Expression wurde im anterioren Gyrus cinguli (Takahashi et al. 2000), im Hippocampus (Takahashi et al. 2000) und in kortikalen Arealen (Durany et al. 2001) festgestellt, verringerte Konzentrationen im dorsolateralen PFC (Weickert et al. 2003) und im Hippocampus (Durany et al. 2001). Auch von einem verringerten mRNA Spiegel im dorsolateralen PFC wurde berichtet (Weickert et al. 2003).

Betrachtet man die Wirkung des Poly(I:C)-Modells auf BDNF, so wurde direkt nach der Poly(I:C)-Injektion eine verringerte Expression im frontalen Kortex und Hippocampus festgestellt (Gibney et al. 2013). Han et al. zeigten eine reduzierte BDNF Expression im PFC der Poly(I:C)-Jungtiere (Han et al. 2017). Eine erhöhte BDNF mRNA Konzentration am 60. Lebensstag im PFC konnte ebenfalls gefunden werden, wohingegen im anterioren cingulären Kortex am 14. Lebensstag eine verminderte Konzentration vorhanden war (Hemmerle et al. 2015).

Auch zum Einfluss der TMS auf das BDNF wurden bereits einige Studien durchgeführt. Müller et al. berichteten nach einer 11-wöchigen rTMS Behandlung von Wistar Ratten von einer erhöhten BDNF mRNA Expression im CA3, Hilus und Gyrus dentatus (Müller et al. 2000). Eine Studie an depressiven Patienten zeigte, dass eine hochfrequente rTMS die Symptome verringert und die Patienten, die auf diese Therapie gut ansprechen, auch eine erhöhte BDNF Konzentration im Plasma aufweisen (Yukimasa et al. 2006). Auch Zanardini et al. stellten die negative Korrelation zwischen BDNF Plasmaspiegel und der Symptomstärke sowie eine erhöhte Plasmakonzentration von BDNF nach rTMS fest, wobei es keine Rolle spielte, ob niederfrequent oder hochfrequent stimuliert wurde (Zanardini et al. 2006). Eine 5-tägige 5 Hz rTMS erhöhte ebenfalls den BDNF Plasmaspiegel (Wang et al. 2011). Bei Spargue-Dawley Ratten mit einem ischämischen Gehirnfarkt im PFC konnte

nach niederfrequenter rTMS eine höhere Zahl BDNF positiver Zellen gefunden werden, was für einen protektiven und regenerativen Effekt spricht (Zhang et al. 2007).

Die Tatsache, dass in dieser Arbeit keine Unterschiede in der BDNF Expression zwischen den 4 Gruppen gefunden wurden, kann unterschiedliche Ursachen haben. Zum einen könnte die BDNF Expression nur kurzfristig und nicht auf Dauer beeinflusst worden sein. Da keine Tiere unmittelbar nach der Stimulation untersucht wurden, kann dies nicht beurteilt werden. Zum anderen kann die bei BDNF verwendete Messung der optischen Dichte der Gehirnregionen ein Grund sein. Die IHC von BDNF zeigte eine sehr intensive Färbung, wodurch die Zellen schlecht vom Hintergrund zu unterscheiden waren und eine Zählung der einzelnen Zellen nicht möglich war. In folgenden Untersuchungen sollte man eine andere Nachweismethode für BDNF auswählen, um dieses Problem zu umgehen. Mögliche Alternativen wären ein ELISA oder ein Western Blot.

## 4.2. Abschließende Beurteilung

Mit den Versuchen konnte bestätigt werden, dass sich das Verhalten von adulten Ratten des Poly(I:C)-Modells von dem der Kontrolltiere unterscheidet. Vergleicht man den Phänotyp der Poly(I:C)-Tiere dieser Arbeit allerdings mit dem vorangegangener Studien, lassen sich Unterschiede feststellen, welche wahrscheinlich auf den Versuchsaufbau dieser Studie zurückzuführen sind. Das schlechtere Langzeitgedächtnis im NOB der Poly(I:C)-Tiere wurde auch in früheren Untersuchungen festgestellt. Ein Unterschied in der Leistung im WM konnte hingegen bisher nicht festgestellt werden. Im EPM zeigte sich mit einer reduzierten Ängstlichkeit das Gegenteil zu vorangegangenen Studien. Die Unterschiede im SC, PF und PPI, welche in vorangegangenen Studien aufgezeigt wurden, konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Sowohl in den Verhaltensexperimenten als auch der IHC konnte ein Effekt der iTBS festgestellt werden. Dies beweist, dass die iTBS, wenn sie vor der Pubertät während sich das Nervensystem noch in der Entwicklung befindet angewendet wird, einen langanhaltenden Effekt auf die neuronale Aktivität hat. Im EPM hat die iTBS einen die Poly(I:C)-Wirkung aufhebenden Einfluss. Auch auf die Kontrolltiere wirkt sich die iTBS durch Steigerung der Motivation und Verbesserung der Lernleistung positiv aus. Bis auf Mix et al., welche ebenfalls eine bessere Lernleistung nach iTBS feststellen konnten (Mix et al. 2010), gibt es keine weiteren Untersuchungen zur Beeinflussung des Verhaltens durch iTBS. In der IHC zeigte sich größtenteils kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll und Poly(I:C)-Tieren, allerdings gibt es auch hier iTBS Effekte, welche teilweise, wie die Expression von PV im NAcc, bei Kontroll und Poly(I:C)-Tieren gegenteilig ausfallen. Bereits vorhandene Studien betrachteten meist nur den PFC und Teile des Hippocampus, was einen Vergleich der Ergebnisse schwierig macht. Die Ergebnisse des Hippocampus fallen aufgrund der vielen verschiedenen Schichten und Abschnitte und damit verbundenen komplexen Funktion sehr unterschiedlich aus.

Es muss bedacht werden, dass nicht nur die Poly(I:C)-Applikation und die iTBS an sich einen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Arbeit haben, sondern auch eine Vielzahl anderer Faktoren eine Rolle spielen. Zum einen wurden die Tiere bereits vor der Pubertät mit iTBS behandelt, was wie erwähnt, einen anderen Einfluss auf die Entwicklung der Nervenzellen haben kann als bei der Behandlung adulter Tiere. Zum anderen kann neben der Verum iTBS auch die reine Sham iTBS einen Einfluss auf die Verhaltensversuche als auch die darauffolgende IHC gehabt haben. Die Sham-Tiere werden ebenso für die Zeit der Stimulation gehandelt, fixiert und hören das typische Knackgeräusch der Magnetspule. Auch dies ist eine Erfahrung für das Tier und kann einen Einfluss auf die späteren Versuche gehabt haben. Die Expression der Markerproteine in der IHC kann zusätzlich von den Verhaltensversuchen an sich beeinflusst worden sein. Durch Lernen, Erfahrungen sammeln und Stress kann es zu einer erhöhten oder reduzierten Expression und somit zur Modifizierung neuronaler Strukturen im Gehirn kommen. Wie die Ergebnisse des PPI zeigen, hat wahrscheinlich das ausführliche Handling der Tiere während der gesamten Versuchsdauer einen sehr starken Einfluss auf die Entwicklung des Verhaltensphänotyps. Es konnte beobachtet werden, dass die Tiere während des Handlings von Zeit zu Zeit immer ruhiger wurden, allerdings lässt sich nicht genau sagen, ob die Tiere dadurch trotzdem einem gewissen permanenten Stresslevel ausgesetzt waren oder dies als angenehm empfanden und somit der Kontakt zu Menschen einen die Poly(I:C)-Wirkung verringenden Effekt hatte.

## 4.3. Ausblick

Mit dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse zur zellulären Wirkung der iTBS, vor allem hinsichtlich der Langzeitwirkung auf zellulärer Ebene und auf das Verhalten von Ratten des Poly(I:C)-Modells, gewonnen werden. Die Ergebnisse werden in die Arbeit des „German Center for Brain Stimulation“ einbezogen. Dies ist ein deutsches Forschungskonsortium

bestehend aus führenden Experten auf den Gebieten der Neurowissenschaften, der Neurophysiologie und der klinische Psychologie, welche sich zum Ziel gesetzt haben, die Wirkung der Gehirnstimulationen genauer zu untersuchen und ein wirksames Behandlungsprotokoll für psychiatrische Erkrankungen zu entwickeln. Prof. Dr. Klaus Funke, der Zweitbetreuer dieser Arbeit, ist Mitglied dieses Konsortiums und nutzt für seine Forschung Tiermodelle. Durch andere Wissenschaftler wird am Menschen die Beeinflussung der kognitiven Funktionen, die Veränderungen in der funktionellen Magnetresonanztomographie, der Einfluss von Medikamenten und schließlich in klinischen Studien die Wirkung am Patienten untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern einen Beitrag zur Aufklärung der zellulären Wirkmechanismen der TMS und weitere Untersuchungen sind unabdingbar. Parallel zu diesem Projekt laufen in der Forschungsgruppe um Prof. Dr. Klaus Funke an der Ruhr-Universität Bochum elektrophysiologische in-vitro Untersuchung an Gehirnschnitten zur Wirkung der iTBS auf juvenile Ratten des Poly(I:C)-Modells. Geplant ist weiterhin Zell- und Netzwerkaktivitäten in kultivierten Gehirnschnitten von Ratten nach TMS mittels verschiedenen Imagingverfahren, wie z.B. Calcium oder Voltage-Sensitive Dyes Imaging, zu untersuchen. Die klinischen Forschungsgruppen wenden derzeit verschiedene Protokolle der TMS und der transkranielle Gleichstromstimulation an einer großen Anzahl an Patienten an, um repräsentative Ergebnisse über den Effekt der Stimulationen zu erlangen.

## 5. Zusammenfassung

Schizophrenie ist weltweit eine der häufigsten und schwerwiegendsten psychiatrischen Erkrankungen. Trotz der Anwendung von modernsten Antipsychotika in Kombination mit individueller Psychotherapie leiden ungefähr 30 % der Patienten unter Rückfällen oder sprechen nur unzureichend auf die pharmakologische Behandlung an. Deshalb ist es wichtig, nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten zu suchen. Eine vielversprechende Methode ist die transkranielle Magnetstimulation, da sie nicht-invasiv und schmerzfrei am Patienten angewendet werden kann. Mittels einer Magnetspule wird ein Magnetfeld erzeugt, das in der Lage ist über Depolarisation von Nervenzellen auf kortikale Bereiche des Gehirns erregend oder auch hemmend einzuwirken. Dadurch können Veränderungen in der Hirnaktivität, wie sie bei neuropsychiatrischen Krankheiten vorkommen, beeinflusst werden. Um die pathologischen Veränderungen im Gehirn hervorzurufen, wird in diesem Projekt das Poly(I:C)-Modell maternaler Immunstimulation an Ratten angewendet. Auf die Plastizität der Nervenzellen im Gehirn kann während seiner Entwicklung am meisten eingewirkt werden, daher findet die Magnetstimulation noch vor der Pubertät der Ratten im Alter von 6 Wochen statt. Verwendet wird ein intermittierendes Theta-Burst Protokoll repetitiver Stimulation.

Da die vollständige Ausprägung des Verhaltensphänotyps bei Schizophrenie erst im Erwachsenenalter auftritt, werden die Ratten im Alter von 12 Wochen in verschiedenen Verhaltensexperimenten getestet. Dazu gehören das Elevated Plus Maze, der Novel Object Recognition Test, das Morris Water Maze, der Pre-Pulse Inhibition Test, der Sucrose Consumption Test und der Porsolt Forced Swim Test. Anschließend wird eine Immunhistochemie der Gehirne mit den neuronalen Aktivitätsmarkern NeuN, Parvalbumin, Calbindin, cFos, Glutamat-Decarboxylase 67 und BDNF angefertigt.

Es konnten sowohl Unterschiede zwischen NaCl Kontroll- und Poly(I:C)-Tieren als auch zwischen Verum und Sham iTBS behandelten Tieren gefunden werden. Die Poly(I:C)-Tiere waren im Elevated Plus Maze weniger ängstlich als die Kontrolltiere. Nach der iTBS Behandlung kehrte sich dieses Verhältnis um. Im Novel Object Recognition Test zeigten die Poly(I:C)-Tiere ein Defizit im Langzeitgedächtnis, wohingegen sie im Morris Water Maze an den Tagen 2 und 4 hinsichtlich räumlichem Lernen und Gedächtnisbildung besser abschnitten als die anderen Gruppen. Im Porsolt Forced Swim Test waren die Sham-Kontrolltieren am inaktivsten. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen im Pre-Puls Inhibition Test gefunden werden. In der Immunhistochemie sank die Expression von cFos und der Glutamat-Decarboxylase 67 im präfrontalen Kortex nach iTBS signifikant. Im Nucleus accumbens und dem ventralen tegmentalen Areal stieg die Expression von Calbindin und Glutamat-Decarboxylase 67 nach iTBS in den Poly(I:C)-Ratten signifikant an, wohingegen die Expression von cFos im ventralen tegmentalen Areal sank. Die Ergebnisse im dorsalen und ventralen Hippocampus waren sehr unterschiedlich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein Langzeiteffekt der iTBS vorhanden ist und sie das Lernen in Poly(I:C)- und Kontrolltieren fördert. Allerdings haben viele Faktoren, wie das Handling, das Alter der Tiere und der Zeitraum zwischen Stimulation und Verhaltensversuchen, einen Einfluss auf die Ergebnisse. Die nicht vorhandenen Defizite im Pre-Puls Inhibition Test, welche normalerweise ein typisches Merkmal der Poly(I:C)-Tiere sind, sind ein Anzeichen dafür.

## 6. Summary

### Effects of Pre-Adolescent Transcranial Magnetic Stimulation on the Behavioural and Neuronal Phenotype of Rats of a Maternal Immune Stimulation Model

Schizophrenia is one of the most serious and most frequent psychiatric disorders in the world. Despite the use of modern antipsychotics in combination with individual psychotherapy, about 30 % of the patients relapse or show inadequate response to pharmacological treatment. Therefore, it is important to look for alternative treatment options. One promising method is transcranial magnetic stimulation, which can be applied in a non-invasive and painless fashion. A coil creates a magnetic field which, via the induced electric field within the brain, is able to depolarise or hyperpolarise neurons. It has an outlasting excitatory or inhibitory effect on brain activity when applied in a repetitive fashion. This way, magnetic stimulation may normalise unbalanced excitatory and inhibitory activity supposed to be one reason for psychiatric disorders. To create a schizophrenia-like phenotype in rats, we used the Poly(I:C) maternal immune stimulation model. Since brains are more plastic during development and thus more sensitive for disturbances but also corrective mechanisms, transcranial magnetic stimulation was applied before puberty at the age of 6 weeks. The intermittent theta-burst stimulation protocol (iTBS) had been chosen because it had the strongest modulatory effect on inhibitory cortical systems in previous studies. Behavioural abnormalities of patients who suffer from schizophrenia occur during adulthood; therefore, the rats were tested in different behaviour experiments at the age of 12 weeks. These included Elevated Plus Maze, Novel Object Recognition Test, Morris Water Maze, Pre-Pulse Inhibition Test, Sucrose Consumption Test and Porsolt Forced Swim Test. The rats' brains were subsequently analysed by the aid of immunohistochemistry to determine the expression levels of the neuronal activity markers NeuN, Parvalbumin, Calbindin, cFos, Glutamate-Decarboxylase 67, and BDNF. Differences between NaCl Controls and Poly(I:C) animals as well as Verum and Sham iTBS treated animals were detected. iTBS-treated Poly(I:C) rats were less anxious than Poly(I:C) Sham rats in Elevated Plus Maze. In Novel Object Recognition Test Poly(I:C) Sham rats showed a deficit in long-term memory while they performed better than the other groups with regard to spatial learning and memory in Morris Water Maze on day 2 and 4. Porsolt Forced Swim Test revealed the NaCl Verum rats as being the most inactive group. No differences were found between groups in case of Pre-Pulse Inhibition. According to immunohistochemistry, iTBS significantly reduced the expression of Glutamate-Decarboxylase 67 and cFos in the prefrontal cortex. Both, in the nucleus accumbens and in the ventral tegmental area expression of Calbindin and Glutamate-Decarboxylase 67 significantly increased after iTBS in Poly(I:C) rats while cFos decreased in the ventral tegmental area. Effects within the dorsal and ventral hippocampus were highly variable. The results of this study show a long-lasting effect of iTBS and an improved learning ability after iTBS in Poly(I:C) rats and Controls. The absence of a Pre-Pulse Inhibition deficit in adult Poly(I:C) rats which had been treated with iTBS during adolescence could be one indication that this interventions has a positive effect, however, a couple of other factors like handling and testing the animals, their age and the time interval between stimulation and behavioural testing appear to modulate the behavioral and molecular phenotyp in addition.

## 7. Literaturverzeichnis

Abazyán B, Nomura J, Kannan G, Ishizuka K, Tamashiro KL, Nucifora F, Pogorelov V, Ladenheim B, Yang C, Krasnova IN, Cadet JL, Pardo C, Mori S, Kamiya A, Vogel MW, Sawa A, Ross CA, Pletnikov MV (2010). Prenatal interaction of mutant DISC1 and immune activation produces adult psychopathology. *Biol. Psychiatry*, 68(12): 1172–1181.

Aicardi G, Argilli E, Capello S, Santi S, Riccio M, Thoenen H, Canossa M (2004). Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(44): 15788–15792.

Akbarian S, Kim JJ, Potkin SG, Hagman JO, Tafazzoli A, Bunney Jr WE, Jones EG (1995). Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics. *Arch. Gen. Psychiatry*, 52(2): 258–266.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857): 732–738.

Altshuler LL, Conrad A, Kovelman JA, Scheibel A (1987). Hippocampal pyramidal cell orientation in schizophrenia. A controlled neurohistologic study of the Yakovlev collection. *Arch. Gen. Psychiatry*, 44(12): 1094–1098.

Andreasen NC, Arndt S, Swayze V, Cizadlo T, Flaum M, O'Leary D, Ehrhardt JC, Yuh WT (1994). Thalamic abnormalities in schizophrenia visualized through magnetic resonance image averaging. *Science*, 266(5183): 294–298.

Arnold SE, Franz BR, Gur RC, Gur RE, Shapiro RM, Moberg PJ, Trojanowski JQ (1995). Smaller neuron size in schizophrenia in hippocampal subfields that mediate cortical-hippocampal interactions. *Am. J. Psychiatry*, 152(5): 738–748.

Arnold SE, Franz BR, Trojanowski JQ, Moberg PJ, Gur RE (1996). Glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocytosis in elderly patients with schizophrenia and dementia. *Acta Neuropathology*, 91(3): 269–277.

Arnold SE, Lee VM, Gur RE, Trojanowski JQ (1991). Abnormal expression of two microtubule-associated proteins (MAP2 and MAP5) in specific subfields of the hippocampal formation in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(23): 10850–10854.

Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding R-G, Ji FY, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T, Obata K (1997). Cleft palate and decreased brain  $\gamma$ -aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(12): 6496–6499.

Aydin Abidin S, Trippe J, Funke K, Eysel U, Benali A (2008). High- and low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation differentially activates c-Fos and zif268 protein expression in the rat brain. *Exp. Brain Research*, 188(22): 249–261.

Barker AT, Freeston IL, Jalinous R, Jarratt JA (1986). Clinical evaluation of conduction time measurements in central motor pathways using magnetic stimulation of human brain. *Lancet*, 1(8493): 1325–1326.

Barker AT, Jalinous R, Freeston IL (1985). Non-invasive magnetic stimulation of human motor cortex. *Lancet*, 1(8437): 1106–1107.



Bartholow R (1874a). Experimental investigations into the functions of the human brain. *Am. J. Med. Sciences*, 134: 305–313.

Bartholow R (1874b). Experiments On The Functions Of The Human Brain. *Br. Med. Journal*, 1(700): 727.

Beasley CL, Reynolds GP (1997). Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Schizophr. Research*, 24(3): 349–355.

Benali A, Trippe J, Weiler E, Mix A, Petrasch-Parwez E, Girzalsky W, Eysel UT, Erdmann R, Funke K (2011). Theta-Burst Transcranial Magnetic Stimulation Alters Cortical Inhibition. *J. Neuroscience*, 31(4): 1193–1203.

Benes FM, Sorensen I, Bird ED (1991). Reduced neuronal size in posterior hippocampus of schizophrenic patients. *Schizophr. Bulletin*, 17(4): 597–608.

Bennett JP Jr, Enna SJ, Bylund DB, Gillin JC, Wyatt RJ, Snyder SH (1979). Neurotransmitter receptors in frontal cortex of schizophrenics. *Arch. Gen. Psychiatry*, 36(9): 927–34.

Berger S, Ronovsky M, Horvath O, Berger A, Pollak DD (2018). Impact of maternal immune activation on maternal care behavior, offspring emotionality and intergenerational transmission in C3H/He mice. *Brain Behav Immunology*, 70: 131–140.

Bethus I, Lemaire V, Lhomme M, Goodall G (2005). Does prenatal stress affect latent inhibition? It depends on the gender. *Behav. Brain Research*, 158(2): 331–338.

Bickford RG, Fremming BD (1965). Neural stimulation by pulsed magnetic fields in animals and man. 6th Int. Conf. Med. Elect. Biol. Eng. Tokyo, 7–6.

Bitanirwe BK, Peleg-Raibstein D, Mouttet F, Feldon J, Meyer U (2010). Late prenatal immune activation in mice leads to behavioral and neurochemical abnormalities relevant to the negative symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 35(12): 2462–2478.

Boggio PS, Rigonatti SP, Ribeiro RB, Myczkowski ML, Nitsche MA, Pascual-Leone A, Fregni F (2008). A randomized, double-blind clinical trial on the efficacy of cortical direct current stimulation for the treatment of major depression. *Int. J. Neuropsychopharmacology*, 11(2): 249–254.

Boyajyan A, Zakharyan R, Atshemyan S, Chavushyan A, Mkrtchyan G (2015). Schizophrenia-associated risk and protective variants of c-Fos encoding gene. *Recent Adv. DNA Gene Sequences*, 9(1): 51–57.

Braff DL, Geyer MA, Light GA, Sprock J, Perry W, Cadenhead KS, Swerdlow NR (2001). Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Schizophr. Research*, 49(1–2): 171–178.

Braff DL, Grillon C, Geyer MA (1992). Gating and Habituation of the Startle Reflex in Schizophrenic Patients. *Arch. Gen. Psychiatry*, 49(3): 206–215.

Braff DL, Swerdlow NR, Geyer MA (1999). Symptom correlates of prepulse inhibition deficits in male schizophrenic patients. *Am. J. Psychiatry*, 156(4): 596–602.

Brown AS, Cohen P, Harkavy-Friedman J, Babulas V, Malaspina D, Gorman JM, Susser ES (2001). A.E. Bennett Research Award: prenatal rubella, premorbid abnormalities, and adult schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 49(6): 473–486.

Brown AS, Schaefer CA, Wyatt RJ, Goetz R, Begg MD, Gorman JM, Susser ES (2000). Maternal exposure to respiratory infections and adult schizophrenia spectrum disorders: a prospective birth cohort study. *Schizophr. Bulletin*, 26(2): 287–295.

Brown AS, Susser ES (2002). In utero infection and adult schizophrenia. *Develop. Dis. Res. Reviews*, 8(1): 51–57.

Brown R, Colter N, Corsellis JA, Crow TJ, Frith CD, Jagoe R, Johnstone EC, Marsh L (1986). Postmortem evidence of structural brain changes in schizophrenia. Differences in brain weight, temporal horn area, and parahippocampal gyrus compared with affective disorder. *Arch. Gen. Psychiatry*, 43(1): 36–42.

Browning MD, Dudek EM, Rapier JL, Leonard S, Freedman R (1993). Significant reductions in synapsin but not synaptophysin specific activity in the brains of some schizophrenics. *Biol. Psychiatry*, 34(8): 529–535.

Brunelin J, Fecteau S, Suaud-Chagny MF (2013). Abnormal striatal dopamine transmission in schizophrenia. *Curr. Med. Chemistry*, 20(3): 397–404.

Brunoni AR, Moffa AH, Sampaio-Junior B, Borrione L, Moreno ML, Fernandes RA, Veronezi BP, Nogueira BS, Aparicio LVM, Razza LB, Chamorro R, Tort LC, Fraguas R, Lotufo PA, Gattaz WF, Fregni F, Benseñor IM; ELECT-TDCS Investigators (2017). Trial of electrical direct-current therapy versus escitalopram for depression. *N. Engl. J. Medicine*, 376(26): 2523–2533.

Brunoni AR, Valiengo L, Baccaro A, Zanão TA, de Oliveira JF, Goulart A, Boggio PS, Lotufo PA, Benseñor IM, Fregni F (2013). The sertraline vs electrical current therapy for treating depression clinical study: results from a factorial, randomized, controlled trial. *JAMA Psychiatry*, 70(4): 383–391.

Bruton CJ, Crow TJ, Frith CD, Johnstone EC, Owens DGC, Roberts GW (1990). Schizophrenia and the brain: a prospective clinico-neuropathological study. *Psychol. Medicine*, 20(2): 285–304.

Buchsbaum MS, Someya T, Teng CY, Abel L, Chin S, Najafi A Haier RJ, Wu J, Bunney WE Jr (1996). PET and MRI of the thalamus in never-medicated patients with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 153(2): 191–199.

Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ (1996). 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 15(5): 442–455.

Cassella SN, Hemmerle AM, Lundgren KH, Kyser TL, Ahlbrand R, Bronson SL, Richtand NM, Seroogy KB (2016). Maternal immune activation alters glutamic acid decarboxylase–67 expression in the brains of adult rat offspring. *Schizophrenia Research*, 171(1): 195–199.

Celio MR (1986). Parvalbumin in most gaminobutyric acid–containingneurons of the rat cerebral cortex. *Science*, 231(4741): 995–997.

Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A (1999). Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Medicine*, 189(5): 821–829.

Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S (2010). Prenatal stress and brain development. *Brain Res. Review*, 65(1): 56–79.

Chen R, Classen J, Gerloff C, Celnik P, Wassermann EM, Hallett M, Cohen LG (1997). Depression of motor cortex excitability by low-frequency transcranial magnetic stimulation. *Neurology*, 48(5): 1398–1403.

Chiu PW, Lui SSY, Hung KSY, Chan RCK, Chan Q, Sham PC, Cheung EFC, Mak HKF (2018). In vivo gamma-aminobutyric acid and glutamate levels in people with first-episode schizophrenia: A proton magnetic resonance spectroscopy study. *Schizophr. Research*, 193: 295–303.

Classen J, Witte OW, Schlaug G, Seitz RJ, Holthausen H, Benecke R (1995). Epileptic seizures triggered directly by focal transcranial magnetic stimulation. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiology*, 94(1): 19–25.

Collinge J, Curtis D (1991). Decreased hippocampal expression of a glutamate receptor gene in schizophrenia. *Br. J. Psychiatry*, 159: 857–859.

Conca A, König P, Hausmann A (2000). Transcranial magnetic stimulation induces 'pseudoabsence seizure'. *Acta. Psychiatr. Scandinavica*, 101(3): 246–249.

Conrad AJ, Abebe T, Austin R, Forsythe S, Scheibel AB (1991). Hippocampal pyramidal cell disarray in schizophrenia as a bilateral phenomenon. *Arch. Gen. Psychiatry*, 48(5): 413–417.

Cunningham C, Champion S, Teeling J, Felton L, Perry VH (2007). The sickness behaviour and CNS inflammatory mediator profile induced by systemic challenge of mice with synthetic double-stranded RNA (poly I:C). *Brain Behav. Immunology*, 21(4): 490–502.

Cushing H (1909). A Note upon the Faradic Stimulation of the Postcentral Gyrus in Conscious Patients. *Brain: J. Neurology*, 32: 44–53.

d'Alfonso AA, Aleman A, Kessels RP, Schouten EA, Postma A, van Der Linden JA, Cahn W, Greene Y, de Haan EH, Kahn RS (2002). Transcranial magnetic stimulation of left auditory cortex in patients with schizophrenia: effects on hallucinations and neurocognition. *J. Neuropsych. Clin. Neuroscience*, 14(1): 77–79.

d'Arsonval A (1896). Dispositifs pour la mesure des courants alternatifs de toutes fréquences. *C. R. Soc. Biology*, 3: 450–457.

da Silveira VT, Medeiros DC, Ropke J, Guidine PA, Rezende GH, Moraes MF, Mendes EM, Macedo D, Moreira FA, de Oliveira AC (2017). Effects of early or late prenatal immune activation in mice on behavioral and neuroanatomical abnormalities relevant to schizophrenia in the adulthood. *Int. J. Develop. Neuroscience: Off. J. Int. Soc. Develop. Neuroscience*, 58: 1–8.

Daniel DG, Goldberg TE, Gibbons RD, Weinberger DR (1992). Lack of bimodal distribution of ventricular size in schizophrenia: a Gaussian mixture analysis of 1056 cases and controls. *Biol. Psychiatry*, 30(9): 887–903.

Daviss SR, Lewis DA (1995). Local circuit neurons of the prefrontal cortex in schizophrenia: selective increase in the density of calbindin-immunoreactive neurons. *Psych. Research*, 59(1–2): 81–96.

Deakin JF, Slater P, Simpson MD, Gilchrist AC, Skan WJ, Royston MC, Reynolds GP, Cross AJ (1989). Frontal cortical and left temporal glutamatergic dysfunction in schizophrenia. *J. Neurochemistry*, 52(6): 1781–1786.

Dean B (2003). The cortical serotonin2a receptor and the pathology of schizophrenia: a likely accomplice. *J. Neurochemistry*, 85(1): 1–13.

DeLisi LE (1997). Is schizophrenia a lifetime disorder of brain plasticity, growth and aging?. *Schizophr. Research*, 23(2): 119–129.

Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Nervenheilkunde (2015). S3-Leitlinie und Nationale Versorgungs-Leitlinie (NVL) Unipolare Depression, 2. Auflage.

Dickerson DD, Wolff AR, Bilkey DK (2010). Abnormal long-range neural synchrony in a maternal immune activation animal model of schizophrenia. *J. Neuroscience*, 30(37): 12424–12431.

Durany N, Michel T, Zochling R, Boissl KW, Cruz-Sanchez FF, Riederer P, Thome J (2001). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 in schizophrenic psychoses. *Schizophr. Research*, 52(1–2): 79–86.

Eastwood SL, Burnet PW, Harrison PJ (1997a). GluR2 glutamate receptor subunit flip and flop isoforms are decreased in the hippocampal formation in schizophrenia: a reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) study. *Brain Res. Mol. Brain Research*, 44(1): 92–98.

Eastwood SL, Harrison PJ (1995). Decreased synaptophysin in the medial temporal lobe in schizophrenia demonstrated using immunautoradiography. *Neuroscience*, 69(2): 339–343.

Eastwood SL, Harrison PJ (1998). Hippocampal and cortical growth-associated protein-43 messenger RNA in schizophrenia. *Neuroscience*, 86(2): 437–448.

Eastwood SL, Kerwin RW, Harrison PJ (1997b). Immunautoradiographic evidence for a loss of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate-preferring non-N-methyl-D-aspartate glutamate receptors within the medial temporal lobe in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 41(6): 636–643.

Eastwood SL, McDonald B, Burnet PW, Beckwith JP, Kerwin RW, Harrison PJ (1995). Decreased expression of mRNAs encoding non-NMDA glutamate receptors GluR1 and GluR2 in medial temporal lobe neurons in schizophrenia. *Brain Res. Mol. Brain Research*, 29(2): 211–223.

Edemann-Callesen H, Voget M, Empl L, Vogel M, Wieske F, Rummel J, Heinz A, Mathé AA, Hadar R, Winter C (2015). Medial Forebrain Bundle Deep Brain Stimulation has Symptom-specific Anti-depressant Effects in Rats and as Opposed to Ventromedial Prefrontal Cortex Stimulation Interacts With the Reward System. *Brain Stimulation*, 8(4): 714–723.

Edgley SA, Eyre JA, Lemon RN, Miller S (1990). Excitation of the corticospinal tract by electromagnetic and electrical stimulation of the scalp in the macaque monkey. *J. Physiology*, 425: 301–320.

Entrican G (2002). Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *J. Comp. Pathology*, 126(2–3): 79–94.

Falkai P, Bogerts B (1986). Cell loss in the hippocampus of schizophrenics. *Eur. Arch. Psych. Neurol. Science*, 236(3): 154–161.

Fanselow MS, Dong HW (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1): 7–19.

Fatemi SH, Earle JA, McMenomy T (2000). Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Mol. Psychiatry*, 5(6): 654–663.

Fatemi SH, Emamian ES, Sidwell RW, Kist DA, Stary JM, Earle JA, Thuras P (2002). Human influenza viral infection in utero alters glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the developing brains of neonatal mice. *Mol. Psychiatry*, 7(6): 633–640.

Fatemi SH, Stary JM, Earle JA, Araghi-Niknam M, Eagan E (2005). GABAergic dysfunction in schizophrenia and mood disorders as reflected by decreased levels of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa and Reelin proteins in cerebellum. *Schizophr. Research*, 72(2–3): 109–122.

Feng SF, Shi TY, Fan Yang, Wang WN, Chen YC, Tan QR (2012). Long-lasting effects of chronic rTMS to treat chronic rodent model of depression. *Behav. Brain Research*, 232(1): 245–251.

Fitzgerald PB, Benitez J, Daskalakis JZ, Brown TL, Marston NA, De Castella A, Kulkarni J (2005). A double-blind sham-controlled trial of repetitive transcranial magnetic stimulation in the treatment of refractory auditory hallucinations. *J. Clin. Psychopharmacology*, 25(4): 358–362.

Forrest CM, Khalil OS, Pizar M, Smith RA, Darlington LG, Stone TW (2012). Prenatal activation of toll-like receptors-3 by administration of the viral mimetic poly(I:C) changes synaptic proteins, N-methyl-D-aspartate receptors and neurogenesis markers in offspring. *Mol. Brain*, 5: 22.

Fortier ME, Luheshi GN, Boksa P (2007). Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. *Behav. Brain Research*, 181(2): 270–277.

Freed WJ, Dillon-Carter O, Kleinman JE (1993). Properties of [3H]AMPA binding in postmortem human brain from psychotic subjects and controls: increases in caudate nucleus associated with suicide. *Exp. Neurology*, 121(1): 48–56.

Fritsch G, Hitzig E (1870). Über die elektrische Erregbarkeit des Grosshirns. *Arch. Anat. Physiol. Wissen*, 37(2): 300–332.

Fumagalli F, Molteni R, Racagni G, Riva MA (2007). Stress during development: impact on neuroplasticity and relevance to psychopathology. *Prog. Neurobiology*, 81(4): 197–217.

Fung SJ, Webster MJ, Sivagnanasundaram S, Duncan C, Elashoff M, Weickert CS (2010). Expression of interneuron markers in the dorsolateral prefrontal cortex of the developing human and in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 167(12): 1479–1488.

Funk A, Rumbaugh G, Harotunian V, McCullumsmith R, Meador-Woodruff J (2009). Decreased expression of NMDA receptor-associated proteins in frontal cortex of elderly patients with schizophrenia. *Neuroreport*, 20(11): 1019–1022.

Garey LJ, Ong WY, Patel TS, Kanani M, Davis A, Mortimer AM, Barnes TR, Hirsch SR (1998). Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 65(4): 446–453.

George MS, Lisanby SH, Sackeim HA (1999). Transcranial magnetic stimulation - Applications in neuropsychiatry. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 56(4): 300–311.

George MS, Wassermann EM, Williams WA, Callahan A, Ketter TA, Basser, P (1995). Daily repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) improves mood in depression. *Neuroreport*, 6(14): 1853–1856.

Gibney SM, McGuinness B, Prendergast C, Harkin A, Connor TJ (2013). Poly I:C-induced activation of the immune response is accompanied by depression and anxiety-like behaviours, kynurenine pathway activation and reduced BDNF expression. *Brain Behav. Immunology*, 28: 170–181.

Gilmore JH, Fredrik Jarskog L, Vadlamudi S, Lauder JM (2004). Prenatal infection and risk for schizophrenia: IL-1beta, IL-6, and TNFalpha inhibit cortical neuron dendrite development. *Neuropsychopharmacology*, 29(7): 1221–1229.

Gilmore JH, Jarskog LF, Vadlamudi S (2005). Maternal poly I:C exposure during pregnancy regulates TNF alpha, BDNF, and NGF expression in neonatal brain and the maternal-fetal unit of the rat. *J. Neuroimmunology*, 159(1–2): 106–112.

Glantz LA, Lewis DA (1997). Reduction of synaptophysin immunoreactivity in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. Regional and diagnostic specificity. *Arch. Gen. Psychiatry*, 54(7): 660–669.

Golden R, Gaynes B, Ekstrom R, Hamer R, Jacobsen F, Suppes T, Nemeroff C (2005). The efficacy of light therapy in the treatment of mood disorders: A review and meta-analysis of the evidence. *Am. J. Psychiatry*, 162(4): 656–662.

Gorski JA, Balogh SA, Wehner JM, Jones KR (2003). Learning deficits in forebrain restricted brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Neuroscience*, 121(2): 341–354.

Goto N, Yoshimura R, Moriya J, Kakeda S, Ueda N, Ikenouchi-Sugita A, Umene-Nakano W, Hayashi K, Oonari N, Korogi Y, Nakamura J (2009). Reduction of brain  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) concentrations in early-stage schizophreniapatients: 3T Proton MRS study. *Schizophr. Research*, 112(1–3): 192–193.

Gottesmann II, Erlenmeyer-Kimling L (2001). Family and twin strategies as a head start in defining prodromes and endophenotypes for hypothetical early-interventions in schizophrenia. *Schizophr. Research*, 51(1): 93–102.

Gualtierotti T, Paterson AS (1954). Electrical stimulation of the unexposed cerebral cortex. *J. Physiology*, 125(2): 278–291.

- Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E (2000). Decrease in Reelin and Glutamic Acid Decarboxylase67 (GAD67) Expression in Schizophrenia and Bipolar Disorder: A Postmortem Brain Study. *Arch. Gen. Psychiatry*, 57(11): 1061–1069.
- Hadar R, Edemann-Callesen H, Reinel C, Wieske F, Voget M, Popova E, Sohr R, Avchalumov Y, Priller J, van Riesen C, Puls I, Bader M, Winter C (2016). Rats overexpressing the dopamine transporter display behavioral and neurobiological abnormalities with relevance to repetitive disorders. *Sci. Reports*, 6: 39145.
- Häfner H (1993). What is schizophrenia? *Neurology, Psychiatry and Brain Research*, 2: 36–52.
- Häfner H (1995). Was ist Schizophrenie? In: Häfner H (Hrsg.) Was ist Schizophrenie? Gustav Fischer, Stuttgart Jena New York, 1–56.
- Häfner H (2003). Gender differences in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*. 28: 17–54.
- Halbreich U, Kahn LS (2003). Hormonal aspects of schizophrenias: an overview. *Psychoneuroendocrinology*, 28: 1–16.
- Han JY, Kim JK, Sun HJ, Yun HS, Choi IS, Lee SG (2013). Does rTMS Affect Angiogenesis as Well as Neurogenesis in the Rat Brain? *Phys. Med. & Rehabilitation*, 5(9): 137-138.
- Han M, Zhang JC, Huang XF, Hashimoto K (2017). Intake of 7,8-dihydroxyflavone from pregnancy to weaning prevents cognitive deficits in adult offspring after maternal immune activation. *Eur. Arch. Psych. Clin. Neuroscience*, 267(5): 479–483.
- Han X, Li N, Meng Q, Shao Q, Wang W (2011). Maternal Immune Activation Impairs Reversal Learning and Increases Serum Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Offspring. *Neuropsychobiology*, 64(1): 9–14.
- Harris EP, Abel JM, Tejada LD, Rissman EF (2016). Calbindin knockout alters sex-specific regulation of behavior and gene expression in amygdala and prefrontal cortex. *Endocrinology*, 157(5): 1967–1979.
- Harrison PJ, Weinberger DR (2005). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol. Psychiatry*, 10(1): 40–68.
- Harvey L, Boksa P (2012). A stereological comparison of GAD67 and reelin expression in the hippocampal stratum oriens of offspring from two mouse models of maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology*, 62(4): 1767–1776.
- Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM, Mirnics K, Pierri JN, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA (2003). Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J. Neuroscience*, 23(15): 6315–6326.
- Healy DJ, Haroutunian V, Powchik P, Davidson M, Davis KL, Watson SJ, Meador-Woodruff JH (1998). AMPA receptor binding and subunit mRNA expression in prefrontal cortex and striatum of elderly schizophrenics. *Neuropsychopharmacology*, 19(4): 278–286.

Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci. Biobehav. Reviews*, 27(6): 555–579.

Hemmerle AM, Ahlbrand R, Bronson SL, Lundgren KH, Richtand NM, Seroogy KB (2015). Modulation of schizophrenia-related genes in the forebrain of adolescent and adult rats exposed to maternal immune activation. *Schizophr. Research*, 168(1–2): 411–420.

Herrmann LL, Ebmeier KP (2006). Factors modifying the efficacy of transcranial magnetic stimulation in the treatment of depression: a review. *J. Clin. Psychiatry*, 67(12): 1870–1876.

Hirjak D, Wolf RC, Stieltjes B, Hauser T, Seidl U, Schröder J, Thomann PA (2014). Cortical signature of neurological soft signs in recent onset schizophrenia. *Brain Topography*, 27(2): 296–306.

Hoenig K, Hochrein A, Quednow BB, Maier W, Wagner M (2005). Impaired prepulse inhibition of acoustic startle in obsessive-compulsive disorder. *Biol. Psychiatry*, 57(10): 1153 – 1158.

Höflich G, Kasper S, Hufnagel A, Ruhrmann S, Moller HJ (1993). Application of transcranial magnetic stimulation in treatment of drug-resistant major depression: a report of two cases. *Hum. Psychopharmacology*, 8: 361–365.

Hömberg V, Netz J (1989). Generalised seizures induced by transcranial magnetic stimulation of motor cortex. *Lancet*, 2(8673): 1223.

Hoppenrath K, Funke K (2013). Time-course of changes in neuronal activity markers following iTBS-TMS of the rat neocortex. *Neurosci. Letters*, 536: 19–23.

Hoppenrath K, Härtig W, Funke K (2016). Intermittent Theta-Burst Transcranial Magnetic Stimulation Alters Electrical Properties of Fast-Spiking Neocortical Interneurons in an Age-Dependent Fashion. *Fron. Neu. Circuits*, 10: 22.

Howland JG, Cazakoff BN, Zhang Y (2012). Altered object-in-place recognition memory, prepulse inhibition, and locomotor activity in the offspring of rats exposed to a viral mimetic during pregnancy. *Neuroscience*, 201: 184–198.

Hu S, Peterson PK, Chao CC (1997). Cytokine-mediated neuronal apoptosis. *Neurochem. International*, 30(4-5): 427–431.

Huang, YZ, Edwards MJ, Rounis E, Bhatia KP, Rothwell JC (2005). Theta burst stimulation of the human motor cortex. *Neuron*, 45(2): 201–206.

Humphries C, Mortimer A, Hirsch S, de Belleruche J (1996). NMDA receptor mRNA correlation with antemortem cognitive impairment in schizophrenia. *Neuroreport*, 7(12): 2051–2055.

Hurlemann R, Boy C, Meyer PT, Scherk H, Wagner M, Herzog H, Coenen HH, Vogeley K, Falkai P, Zilles K, Maier W, Bauer A (2005). Decreased prefrontal 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding in subjects at enhanced risk for schizophrenia. *Anat. Embryology*, 210(5–6): 519–523.



Ibi D, Nagai T, Kitahara Y, Mizoguchi H, Koike H, Shiraki A, Takuma K, Kamei H, Noda Y, Nitta A, Nabeshima T, Yoneda Y, Yamada K (2009). Neonatal polyI:C treatment in mice results in schizophrenia-like behavioral and neurochemical abnormalities in adulthood. *Neurosci. Research*, 64(3): 297–330.

Ibi D, Nagai T, Koike H, Kitahara Y, Mizoguchi H, Niwa M, Jaaro-Peled H, Nitta A, Yoneda Y, Nabeshima T, Sawa A, Yamada K (2010). Combined effect of neonatal immune activation and mutant DISC1 on phenotypic changes in adulthood. *Behav. Brain Research*, 206(1): 32–37.

Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, Uzunov DP, Smalheiser NR, Davis JM, Pandey GN, Pappas GD, Tueting P, Sharma RP, Costa E (1998). A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(26): 15718–15723.

Ito HT, Smith SE, Hsiao E, Patterson PH (2010). Maternal immune activation alters nonspatial information processing in the hippocampus of the adult offspring. *Brain Behav. Immunology*, 24(6): 930–941.

Jarskog LF, Xiao H, Wilkie MB, Lauder JM, Gilmore JH (1997). Cytokine regulation of embryonic rat dopamine and serotonin neuronal survival in vitro. *Int. J. Dev. Neuroscience*, 15(6): 711–716.

Jazmati D, Neubacher U, Funke K (2018). Neuropeptide Y as a possible homeostatic element for changes in cortical excitability induced by repetitive transcranial magnetic stimulation. *Brain Stimulation*, 11(49): 797–805.

Jentsch JD, Roth RH (1999). The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 20(3): 201–225.

Jeste DV, Lohr JB (1989). Hippocampal pathologic findings in schizophrenia. A morphometric study. *Arch. Gen. Psychiatry*, 46(11): 1019–1024.

Johnstone EC, Crow TJ, Frith CD, Husband J, Kreel L (1976). Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet*, 308(7992): 924–926.

Jönsson SA, Luts A, Guldborg-Kjaer N, Brun A (1997). Hippocampal pyramidal cell disarray correlates negatively to cell number: implications for the pathogenesis of schizophrenia. *Eur. Arch. Psych. Clin. Neuroscience*, 247(3): 120–127.

Kammer T, Thielscher A (2003). Physikalische und physiologische Grundlagen der transkraniellen Magnetstimulation. *Nervenheilkunde: Zeitschrift für interdisziplinäre Fortbildung*, 22(4): 168–176.

Kapur S, Remington G (1996). Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 153(4): 466–476.

Katz R (1982). Animal model of depression: Pharmacological sensitivity of a hedonic deficit. *Pharmacol. Biochem. Behavior*, 16(6): 965–968.

Kawaguchi Y, Katsumaru H, Kosaka T, Heizmann CW, Hama K (1987). Fast spiking cells in rat hippocampus (CA1 region) contain the calcium-binding protein parvalbumin. *Brain Research*, 416(2): 369–374.

- Keck ME, Welt T, Post A, Müller MB, Toschi N, Wigger A, Landgraf R, Holsboer F, Engelmann M (2001). Neuroendocrine and behavioral effects of repetitive transcranial magnetic stimulation in a psychopathological animal model are suggestive of antidepressant-like effects. *Neuropsychopharmacology*, 24(4): 337–349.
- Kendler KS, Gruenberg AM, Kinney D (1994). Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish adoption study of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 51(6): 456–468.
- Kerwin R, Patel S, Meldrum B (1990). Quantitative autoradiographic analysis of glutamate binding sites in the hippocampal formation in normal and schizophrenic brain post mortem. *Neuroscience*, 39(1): 25–32.
- Keshavan MS, Bagwell WW, Haas GL, Sweeney JA, Schooler NR, Pettegrew JW (1994). Changes in caudate volume with neuroleptic treatment. *Lancet*, 344(8934): 1434.
- Keshavan MS, Hogarty GE (1999). Brain maturational processes and delayed onset in schizophrenia. *Dev. Psychopathology*, 11(3): 525–543.
- Kety SS, Wender PH, Jacobsen B, Ingraham LJ, Jansson L, Faber B, Kinney DK (1994). Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Replication of the Copenhagen Study in the rest of Denmark. *Arch. Gen. Psychiatry*, 51(6): 442–455.
- Khan D, Fernando P, Cicvaric A, Berger A, Pollak A, Monje FJ, Pollak DD (2014). Long-term effects of maternal immune activation on depression-like behavior in the mouse. *Transl. Psychiatry*, 4: 363.
- Kim SY, Lee DW, Kim H, Bang E, Chae JH, Choe BY (2014). Chronic repetitive transcranial magnetic stimulation enhances GABAergic and cholinergic metabolism in chronic unpredictable mild stress rat model: <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy study at 11.7T. *Neurosci. Letter*, 572: 32–37.
- Koenig JI, Elmer GI, Shepard PD, Lee PR, Mayo C, Joy B, Hercher E, Brady DL (2005). Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav. Brain Research*, 156(2): 251–261.
- Koenig JI, Kirkpatrick B, Lee P (2002). Glucocorticoid hormones and early brain development in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 27(2): 309–318.
- Korte M, Griesbeck O, Gravel C, Carroll P, Staiger V, Thoenen H, Bonhoeffer T (1996). Virus-mediated gene transfer into hippocampal CA1 region restores long-term potentiation in brain-derived neurotrophic factor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(22): 12547–12552.
- Kovelman JA, Scheibel AB (1984). A neurohistological correlate of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 19(12): 1601–1621.
- Kumari V, Soni W, Sharma T (1999). Normalization of information processing deficits in schizophrenia with clozapine. *Am. J. Psychiatry*, 156(7): 1046–1105.
- Labedi A, Benali A, Mix A, Neubacher U, Funke K (2014). Modulation of inhibitory activity markers by intermittent theta-burst stimulation in rat cortex is NMDA-receptor dependent. *Brain Stimulation*, 7(3): 394–400.

- Labouesse MA, Dong E, Grayson DR, Guidotti A, Meyer U (2015). Maternal immune activation induces GAD1 and GAD2 promoter remodeling in the offspring prefrontal cortex. *Epigenetics*, 10(12): 1143–1155.
- Lam RW, Levitt AJ (2002). Evidence-Based Management of Seasonal Affective Disorder (SAD) - Clinician Resource Package.
- Lawrie SM, Abukmeil SS (1998). Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br. J. Psychiatry*, 172(2): 110–120.
- Lewis R, Kapur S, Jones C, DaSilva J, Brown GM, Wilson AA, Houle S, Zipursky RB (1999). Serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptors in schizophrenia: a PET study using [<sup>18</sup>F]setoperone in neuroleptic-naïve patients and normal subjects. *Am. J. Psychiatry*, 156(1): 72–78.
- Li Q, Cheung C, Wei R, Hui ES, Feldon J, Meyer U (2009). Prenatal immune challenge is an environmental risk factor for brain and behavior change relevant to schizophrenia: evidence from MRI in a mouse model. *Pub. Lib. Sci. ONE*, 4(7): 6354.
- Li WY, Chang YC, Lee LJ, Lee LJ (2014). Prenatal infection affects the neuronal architecture and cognitive function in adult mice. *Dev. Neuroscience*, 36(5): 359–370.
- Light GA, Swerdlow NR (2014). Neurophysiological biomarkers informing the clinical neuroscience of schizophrenia: mismatch negativity and prepulse inhibition of startle. *Curr. Top. Behav. Neuroscience*, 21: 293–314.
- Loo CK, Alonzo A, Martin D, Mitchell PB, Galvez V, Sachdev P (2012). Transcranial direct current stimulation for depression: 3-week, randomised, sham-controlled trial. *Br. J. Psychiatry*, 200(1): 52–59.
- Lopez-Figueroa AL, Norton CS, Lopez-Figueroa MO, Armellini-Dodel D, Burke S, Akil H, Lopez JF, Watson SJ (2004). Serotonin 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 55(3): 225–233.
- Mackay AV, Doble A, Bird ED, Spokes EG, Quik M, Iversen LL (1978). 3H-Spiperone binding in normal and schizophrenic post-mortem human brain. *Life Science*, 23(5): 527–532.
- Madsen TM, Treschow A, Bengzon J, Bolwig TG, Lindvall O, Tingström A (2000). Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol. Psychiatry*, 47(12): 1043–1049.
- Makinodan M, Tatsumi K, Manabe T, Yamauchi T, Makinodan E, Matsuyoshi H, Shimoda S, Noriyama Y, Kishimoto T, Wanaka A (2008). Maternal immune activation in mice delays myelination and axonal development in the hippocampus of the offspring. *J. Neurosci. Research*, 86(10): 2190–2200.
- Marcusson JO, Morgan DG, Winblad B, Finch CE (1984). Serotonin-2 binding sites in human frontal cortex and hippocampus. Selective loss of S-2A sites with age. *Brain Research*, 311(1): 51–56.
- Marsh L, Suddath RL, Higgins N, Weinberger DR (1994). Medial temporal lobe structures in schizophrenia: relationship of size to duration of illness. *Schizophr. Research*, 11(3): 225–238.

Marsman A, Mandl RC, Klomp DW, Bohlken MM, Boer VO, Andreychenko A, Cahn C, Kahn RS, Luijten PR, Hulshoff Pol HE (2014). GABA and glutamate in schizophrenia: a 7 T <sup>1</sup>H-MRS study. *Neuroimage Clinical*, 6: 398–407.

Mason GF, Martin DL, Martin SB, Manor D, Sibson NR, Patel A, Rothman DL, Behar KL (2001). Decrease in GABA synthesis rate in rat cortex following GABA-transaminase inhibition correlates with the decrease in GAD67 protein. *Brain Research*, 914(1–2): 81–91.

Matsumoto I, Inoue Y, Iwazaki T, Pavey G, Dean B (2005). 5-HT<sub>2A</sub> and muscarinic receptors in schizophrenia: a postmortem study. *Neuroscience Letter*, 379(3): 164–168.

Mattei, D, A Ivanov, C Ferrai, P Jordan, D Guneykaya, A Buonfiglioli, W Schaafsma, Przanowski P, Deuther-Conrad W, Brust P, Hesse S, Patt M, Sabri, Ross TL, Eggen BJL, Boddeke EWGM, Kaminska B, Beule D, Pombo A, Kettenmann H, Wolf SA (2017). Maternal immune activation results in complex microglial transcriptome signature in the adult offspring that is reversed by minocycline treatment. *Transl. Psychiatry*, 7(5): 1120.

McIntosh AM, Semple D, Tasker K, Harrison LK, Owens DG, Johnstone EC, Ebmeier KP (2004). Transcranial magnetic stimulation for auditory hallucinations in schizophrenia. *Psych. Research*, 127(1–2): 9–17.

Mednick SA, Machon RA, Huttunen MO, Bonett D (1988). Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic. *Arch. Gen. Psychiatry*, 45(2): 189–192.

Merton P, Morton H (1980). Stimulation of the cerebral cortex in the intact human subject. *Nature*, 285: 227.

Meyer U, Engler A, Weber L, Schedlowski M, Feldon J (2008a). Preliminary evidence for a modulation of fetal dopaminergic development by maternal immune activation during pregnancy. *Neuroscience*, 154(2): 701–709.

Meyer U, Feldon J (2012). To poly(I:C) or not to poly(I:C): Advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. *Neuropharmacology*, 62(3): 1308–1321.

Meyer U, Feldon J, Fatemi SH (2009a). In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosc. & Biobeh. Reviews*, 33(7): 1061–1107.

Meyer U, Feldon J, Schedlowski M, Yee BK (2005). Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neurosci. Biobehav. Reviews*, 29(6): 913–947.

Meyer U, Feldon J, Yee BK (2009b). A review of the fetal brain cytokine imbalance hypothesis of schizophrenia. *Schizophr. Bulletin*, 35(5): 959–972.

Meyer U, Murray PJ, Urwyler A, Yee BK, Schedlowski M, Feldon J (2008b). Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling. *Mol. Psychiatry*, 13(2): 208–221.

Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, Yee BK, Feldon J (2006a). The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *J. Neuroscience*, 26(18): 4752–4762.

- Meyer U, Nyffeler M, Yee BK, Knuesel I, Feldon J (2008c). Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain Behav. Immunology*, 22(4): 469–486.
- Meyer U, Schwendener S, Feldon J, Yee BK (2006b). Prenatal and postnatal maternal contributions in the infection model of schizophrenia. *Exp. Brain. Research*, 173(2): 243–257.
- Mitchell D, Olive C (2010). Regulation of Toll-like receptor-induced chemokine production in murine dendritic cells by mitogen-activated protein kinases. *Mol. Immunology*, 47(1–2): 2065–2073.
- Mix A, Benali A, Eysel UT, Funke K (2010). Continuous and intermittent transcranial magnetic theta burst stimulation modify tactile learning performance and cortical protein expression in the rat differently. *Eur. J. Neuroscience*, 32(9): 1575–1586.
- Mix A, Benali A, Funke K (2014). Strain differences in the effect of rTMS on cortical expression of calcium-binding proteins in rats. *Exper. Brain Research*, 232(2): 435–442.
- Mix A, Hoppenrath K, Funke K (2015). Reduction in cortical parvalbumin expression due to intermittent theta-burst stimulation correlates with maturation of the perineuronal nets in young rats. *Dev. Neurobiology*, 75(1): 1–11.
- Morris R (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11(1): 47–60.
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 116(1): 201–211.
- Müller BR, Bale TL (2007). Early prenatal stress impact on coping strategies and learning performance is sex dependent. *Physiol. Behavior*, 91(1): 55–65.
- Müller BR, Bale TL (2008). Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *J. Neuroscience*, 28(36): 9055–9065.
- Müller MB, Toschi N, Kresse AE, Post A, Keck ME (2000). Long-term repetitive transcranial magnetic stimulation increases the expression of brain-derived neurotrophic factor and cholecystokinin mRNA, but not neuropeptide tyrosine mRNA in specific areas of rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 23(2): 205–215.
- Nair TR, Christensen JD, Kingsbury SJ, Kumar NG, Terry WM, Garver DL (1997). Progression of cerebroventricular enlargement and the subtyping of schizophrenia. *Psych. Research*, 74(3): 141–150.
- Nelson MD, Saykin AJ, Flashman LA, Riordan HJ (1998). Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study. *Arch. Gen. Psychiatry*, 55(5): 433–440.
- Ngan ET, Yatham LN, Ruth TJ, Liddle PF (2000). Decreased serotonin 2A receptor densities in neuroleptic-naive patients with schizophrenia: A PET study using [(18)F]setoperone. *Am. J. Psychiatry*, 157(6): 1016–1018.
- Nishikawa T, Takashima M, Toru M (1983). Increased [<sup>3</sup>H] kainic acid binding in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Neuroscience Letter*, 40(3): 245–250.

Noga JT, Hyde TM, Herman MM, Spurney CF, Bigelow LB, Weinberger DR, Kleinman JE (1997). Glutamate receptors in the postmortem striatum of schizophrenic, suicide, and control brains. *Synapse*, 27(3): 168–176.

Oh-Nishi A, Obayashi S, Sugihara I, Minamimoto T, Suhara T (2010). Maternal immune activation by polyribonucleosinic-polyribocytidilic acid injection produces synaptic dysfunction but not neuronal loss in the hippocampus of juvenile rat offspring. *Brain Research*, 1363: 170–179.

Ojeda SR, Skinner MK (2006). Puberty in the rat. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 2: 2061–2126.

Ozawa K, Hashimoto K, Kishimoto T, Shimizu E, Ishikura H, Iyo M (2006). Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 59(6): 546–554.

Pakkenberg B (1987). Post-mortem study of chronic schizophrenic brains. *Br. J. Psychiatry*, 151: 744–752.

Pakkenberg B (1993). Total nerve cell number in neocortex in chronic schizophrenics and controls estimated using optical disectors. *Biol. Psychiatry*, 34(11): 768–772.

Parwani A, Duncan E, Bartlett E, Madonick S, Efferen TR, Rajan R, Sanfilippo M, Chappell PB, Chakravorty S, Gonzenbach S, Ko GN, Rotrosen JP (2000). Impaired prepulse inhibition of acoustic startle in schizophrenics. *Biol. Psychiatry*, 47(7): 662–669.

Pascual-Leone A, Valls-Solé J, Brasil-Neto J, Cohen LG, Hallett M (1992). Seizure induction and transcranial magnetic stimulation. *Lancet*, 339(8799): 997.

Paxinos G, Watson C (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier.

Penfield W, Boldrey E (1937). Somatic motor and sensory representation in the cerebral cortex of man as studied by electrical stimulation. *Brain J. Neurology*, 60(4): 389–443.

Peng ZW, Xue F, Zhou CH, Zhang RG, Wang Y, Liu L, Sang HF, Wang HN, Tan QR (2018). Repetitive transcranial magnetic stimulation inhibits Sirt1/MAO-A signaling in the prefrontal cortex in a rat model of depression and cortex-derived astrocytes. *Mol. Cell. Biochemistry*, 442(1–2): 59–72.

Perrone-Bizzozero NI, Sower AC, Bird ED, Benowitz LI, Ivins KJ, Neve RL (1996). Levels of the growth-associated protein GAP-43 are selectively increased in association cortices in schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(24): 14182–14187.

Perry TL, Kish SJ, Buchanan J, Hansen S (1979). Gamma-aminobutyric-acid deficiency in brain of schizophrenic patients. *Lancet*, 313(8110): 237–239.

Perry W, Minassian A, Feifel D, Braff DL (2001). Sensorimotor gating deficits in bipolar disorder. *Biol. Psychiatry*, 50(6): 418–424.

Piontkewitz Y, Arad M, Weiner I (2012). Tracing the development of psychosis and its prevention: what can be learned from animal models. *Neuropharmacology*, 62(3): 1273–1289.

Piontkewitz Y, Assaf Y, Weiner I (2009). Clozapine administration in adolescence prevents postpubertal emergence of brain structural pathology in an animal model of schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 66(11): 1038–1046.

Poo M (2001). Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat. Rev. Neuroscience*, 2(1): 24–32.

Post A, Müller MB, Engelmann M, Keck ME (1999). Repetitive transcranial magnetic stimulation in rats: evidence for a neuroprotective effect in vitro and in vivo. *Eur. J. Neuroscience*, 11(9): 3247–3254.

Poulet E, Brunelin J, Bediou B, Bation R, Forgeard L, Dalery J, d'Amato T, Saoud M (2005). Slow transcranial magnetic stimulation can rapidly reduce resistant auditory hallucinations in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*, 57(2): 188–191.

Rajkowska G, Selemon LD, Goldman-Rakic PS (1998). Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a postmortem morphometric study of schizophrenia and Huntington disease. *Arch. Gen. Psychiatry*, 55(3): 215–224.

Rapoport JL, Giedd JN, Gogtay N (2012). Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. *Mol. Psychiatry*, 17(12): 1228–1238.

Rao LR, Kolsch H (2003). Effects of estrogen on brain development and neuroprotection – implications for negative symptoms in schizophrenia. *Psychoneuroendocrinology*, 28: 83–96.

Ratnayake U, Quinn T, LaRosa DA, Dickinson H, Walker DW (2014). Prenatal Exposure to the Viral Mimetic Poly I:C Alters Fetal Brain Cytokine Expression and Postnatal Behaviour. *Dev. Neuroscience*, 36(2): 83–94.

Ratnayake U, Quinn TA, Castillo-Melendez M, Dickinson H, Walker DW (2012). Behaviour and hippocampus-specific changes in spiny mouse neonates after treatment of the mother with the viral-mimetic Poly I: C at mid-pregnancy. *Brain Behav. Immunology*, 26(8): 1288–1299.

Raz S, Raz N (1990). Structural brain abnormalities in the major psychoses: A quantitative review of the evidence from computerized imaging. *Psychol. Bulletin*, 108(1): 93–108.

Rea E, Rummel J, Schmidt TT, Hadar R, Heinz S, Mathé AA, Winter C (2014). Anti-anhedonic effect of deep brain stimulation of the prefrontal cortex and the dopaminergic reward system in a genetic rat model of depression: an intracranial self-stimulation paradigm study. *Brain Stimulation*, 7(1): 21–28.

Reid PD, Daniels B, Rybak M, Turnier-Shea Y, Pridmore S (2002). Cortical excitability of psychiatric disorders: reduced post-exercise facilitation in depression compared to schizophrenia and controls. *Aust. N. Z. J. Psychiatry*, 36(5): 669-673.

Reisinger SN, Kong E, Khan D, Schulz S, Ronovsky M, Berger S, Horvath O, Cabatic M, Berger A, Pollak DD (2016). Maternal immune activation epigenetically regulates hippocampal serotonin transporter levels. *Neurobiol. Stress*, 4: 34–43.

Reynolds GP, Abdul-Manim Z, Neill JC, Zhang, ZJ (2004). Calcium binding protein markers of GABA deficits in schizophrenia- postmortem studies and animal models. *Neurotoxicol. Research*, 6(1): 57–61.

Reynolds GP, Beasley CL (2001). GABAergic neuronal subtypes in the human frontal cortex-developments and deficits in schizophrenia. *J. Chem. Neuroanatomy*, 22(1–2): 95–100.

Reynolds GP, Beasley CL, Zhang ZJ (2002). Understanding the neuropathology of schizophrenia: selective deficits of subtypes of cortical GABAergic neurons. *J. Neural Transmission*, 109(5–6): 881–889.

Reynolds GP, Rossor MN, Iversen LL (1983). Preliminary studies of human cortical 5-HT<sub>2</sub> receptors and their involvement in schizophrenia and neuroleptic drug action. *J. Neural Transmission*, 18: 273–277.

Richtand NM, Ahlbrand R, Horn PS, Chambers B, Davis J, Benoit S (2012). Effects of prenatal immune activation and peri-adolescent stress on amphetamine-induced conditioned place preference in the rat. *Psychopharmacology*, 222: 313.

Robert Koch-Institut (2010). Schizophrenie. Gesundheitsberichtserstattung des Bundes, Heft 50.

Robertson GS, Matsumura H, Fibiger HC (1994). Induction patterns of Fos-like immunoreactivity in the forebrain as predictors of atypical antipsychotic activity. *J. Pharmacol. Exp. Therapy*, 271(2): 1058–1066.

Roenker NL, Gudelsky G, Ahlbrand R, Bronson SL, Kern JR, Waterman H, Richtand NM (2011). Effect of paliperidone and risperidone on extracellular glutamate in the prefrontal cortex of rats exposed to prenatal immune activation or MK-801. *Neurosci. Letter*, 500(39): 167–171.

Ronovsky M, Berger S, Zambon A, Reisinger SN, Horvath O, Pollak A, Lindtner C, Berger A, Pollak DD (2017). Maternal immune activation transgenerationally modulates maternal care and offspring depression-like behavior. *Brain Behav. Immunology*, 63: 127–136.

Rösler KM, Hess CW, Heckmann R, Ludin HP (1989). Significance of shape and size of the stimulating coil in magnetic stimulation of the human motor cortex. *Neurosci. Letter*, 100(1–3): 347–352.

Sakai T, Oshima A, Nozaki Y, Ida I, Haga C, Akiyama H, Nakazato Y, Mikuni M (2008). Changes in density of calcium-binding-protein-immunoreactive GABAergic neurons in prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropathology*, 28(2): 143–150.

Samii A, Wassermann EM, Ikoma K, Mercuri B, George MS, O'Fallon A, Dale JK, Straus SE, Hallett M (1996). Decreased postexercise facilitation of motor evoked potentials in patients with chronic fatigue syndrome or depression. *Neurology*, 47(6): 1410–1414.

Savanthrapadian S, Wolff AR, Logan BJ, Eckert MJ, Bilkey K, Abraham WC (2013). Enhanced hippocampal neuronal excitability and LTP persistence associated with reduced behavioral flexibility in the maternal immune activation model of schizophrenia. *Hippocampus*, 23(12): 1395–1410.

Schäfer BW, Heizmann CW (1996). The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: Functions and pathology. *Trends Biochem. Science*, 21(4): 134–140.

Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*, 511(7510): 421–427.



Schlaug G, Armstrong E, Schleicher A, Zilles K (1993). Layer V pyramidal cells in the adult human cingulate cortex. A quantitative Golgi-study. *Anat. Embryology*, 187(6): 515–522.

Schneider M, Heise V, Spanagel R (2010). Differential involvement of the opioid receptor antagonist naloxone in motivational and hedonic aspects of reward. *Behav. Brain Research*, 208(2): 466–472.

Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS (1995). Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch. Gen. Psychiatry*, 52(10): 805–818.

Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS (1998). Elevated neuronal density in prefrontal area 46 in brains from schizophrenic patients: application of a three-dimensional, stereologic counting method. *J. Comp. Neurology*, 392(3): 402–412.

Shajahan PM, Glabus MF, Gooding PA, Shah PJ, Ebmeier KP (1999). Reduced cortical excitability in depression: Impaired post-exercise motor facilitation with transcranial magnetic stimulation. *Br. J. Psychiatry*, 174: 449–454.

Shang Y, Wang X, Shang X, Zhang H, Liu Z, Yin T, Zhang H (2016). Repetitive transcranial magnetic stimulation effectively facilitates spatial cognition and synaptic plasticity associated with increasing the levels of BDNF and synaptic proteins in Wistar rats. *Neurobiol. Learn. Memory*, 34: 369–378.

Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH (2003). Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J. Neuroscience*, 23(1): 297–302.

Siebner HR, Ziemann U (2007). *Das TMS-Buch. Handbuch der transkraniellen Magnetstimulation*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S. 500.

Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH (2007). Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J. Neuroscience*, 27(40): 10695–10702.

Sokolov BP (1998). Expression of NMDAR1, GluR1, GluR7, and KA1 glutamate receptor mRNAs is decreased in frontal cortex of "neuroleptic-free" schizophrenics: evidence on reversible up-regulation by typical neuroleptics. *J. Neurochemistry*, 71(6): 2454–2464.

Spear LP (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Review*, 24(4): 417–463.

Takahashi H, Iwase M, Ishii R, Ohi K, Fukumoto M, Azechi M, Ikezawa K, Kurimoto R, Canuet L, Nakahachi T, Iike N, Tagami S, Morihara T, Okochi M, Tanaka T, Kazui H, Yoshida T, Tanimukai H, Yasuda Y, Kudo T, Hashimoto R, Takeda M (2008). Impaired prepulse inhibition and habituation of acoustic startle response in Japanese patients with schizophrenia. *Neurosci. Research*, 62(3): 187–194.

Takahashi M, Shirakawa O, Toyooka K, Kitamura N, Hashimoto T, Maeda K, Koizumi S, Wakabayashi K, Takahashi H, Someya T, Nawa H (2000). Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. *Mol. Psychiatry*, 5(3): 293–300.

Takeuchi O, Akira S (2007). Recognition of viruses by innate immunity. *Immunol. Reviews*, 220: 214–224.

Tallerico T, Novak G, Liu ISC, Ulpian C, Seeman P (2001). Schizophrenia: elevated mRNA for dopamine D<sub>2</sub>Longer receptors in frontal cortex. *Brain Res. Mol. Brain Research*, 87(2): 160–165.

Tan T, Xie J, Liu T, Chen X, Zheng X, Tong Z, Tian Z (2013). Low-frequency (1 Hz) repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) reverses A $\beta$ 1-42-mediated memory deficits in rats. *Exp. Gerontology*, 48(8): 786–794.

Thakkar KN, Rösler L, Wijnen JP, Boer VO, Klomp DW, Cahn W, Kahn RS, Neggers SF (2017). 7 T Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Gamma-Aminobutyric Acid, Glutamate, and Glutamine Reveals Altered Concentrations in Patients With Schizophrenia and Healthy Siblings. *Biol. Psychiatry*, 81(6): 525–535.

Thimm A, Funke K (2015). Multiple blocks of intermittent and continuous theta-burst stimulation applied via transcranial magnetic stimulation differently affect sensory responses in rat barrel cortex. *J. Physiology*, 593: 967–985.

Tooney PA, Chahl LA (2004). Neurons expressing calcium-binding proteins in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 28(2): 273–278.

Toru M (1992). Excitatory amino acidergic neurones in chronic schizophrenic brain. *Mol. Neuropharmacology*, 2: 241–243.

Toyooka K, Asama K, Watanabe Y, Muratake T, Takahashi M, Someya T, Nawa H (2002). Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients. *Psych. Research*, 110(3): 249–257.

Trichard C, Paillère-Martinot ML, Attar-Levy D, Blin J, Feline A, Martinot JL (1998). No serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor density abnormality in the cortex of schizophrenic patients studied with PET. *Schizophr. Research*, 31(1): 13–17.

Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain Research*, 146(1-2): 3–17.

Uylings HB, Van Eden CG (1990). Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Prog. Brain Research*, 85: 31–62.

Van Horn JD, McManus IC (1992). Ventricular enlargement in schizophrenia. A meta-analysis of studies of the ventricle: brain ratio (VBR). *Br. J. Psychiatry*, 160: 687–697.

Veldic M, Caruncho HJ, Liu WS, Davis J, Satta R, Grayson DR, Guidotti A, Costa E (2004). DNA-methyltransferase 1 mRNA is selectively overexpressed in telencephalic GABAergic interneurons of schizophrenia brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(1): 348–353.

Vicario-Abejón C, Owens D, McKay R, Segal M (2002). Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. *Nat. Rev. Neuroscience*, 3(12): 965–974.

Volz LJ, Benali A, Mix A, Neubacher U, Funke K (2013). Dose-dependence of changes in cortical protein expression induced with repeated transcranial magnetic theta-burst stimulation in the rat. *Brain Stimulation*, 6(4): 598–606.

- Vorhees CV, Graham DL, Braun AA, Schaefer TL, Skelton MR, Richtand NM, Williams MT (2015). Prenatal immune challenge in rats: Effects of polyinosinic-polycytidylic acid on spatial learning, prepulse inhibition, conditioned fear, and responses to MK-801 and amphetamine. *Neurotox. & Teratology*, 47: 54–65.
- Vuillermot S, Weber L, Feldon J, Meyer U (2010). A longitudinal examination of the neurodevelopmental impact of prenatal immune activation in mice reveals primary defects in dopaminergic development relevant to schizophrenia. *J. Neuroscience*, 30(4): 1270–1287.
- Wang F, Geng X, Tao HY (2010). The Restoration After Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation Treatment on Cognitive Ability of Vascular Dementia Rats and Its Impacts on Synaptic Plasticity in Hippocampal CA1 Area. *J. Mol. Neuroscience*, 41(1): 145.
- Wang H, Wang L, Zhang RG, Chen Y, Liu L, Gao F, Nie H, Hou W, Peng ZW, Tan QR (2014). Antidepressive mechanism of repetitive transcranial magnetic stimulation in rat: The role of the endocannabinoid system. *J. Psych. Research*, 51: 79–87.
- Wang H, Wang X, Wetzel W, Scheich H (2006). Rapid-rate transcranial magnetic stimulation of animal auditory cortex impairs short-term but not long-term memory formation. *Eur. J. Neuroscience*, 23(8): 2176–2184.
- Wang HN, Bai YH, Chen YC, Zhang RG, Wang HH, Zhang YH, Gan JL, Peng ZW, Tan QR (2015). Repetitive transcranial magnetic stimulation ameliorates anxiety-like behavior and impaired sensorimotor gating in a rat model of post-traumatic stress disorder. *Plos One*, 10(2): 0117189.
- Wang HY, Crupi D, Liu J, Stucky A, Cruciata G, Di Rocco A, Friedman E, Quartarone A, Ghilardi MFR (2011). Repetitive transcranial magnetic stimulation enhances BDNF-TrkB signaling in both brain and lymphocyte. *J. Neuroscience*, 31: 11044–11054.
- Wassermann EM (1998). Risk and safety of repetitive transcranial magnetic stimulation: report and suggested guidelines from the International Workshop on the Safety of Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation. *Electroenceph. Clin. Neurophysiology*, 108(1): 1–16.
- Weickert CS, Hyde TM, Lipska BK, Herman MM, Weinberger DR, Kleinman JE (2003). Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Mol. Psychiatry*, 8(6): 592–610.
- Weinberger DR, Torrey EF, Neophytides AN, Wyatt RJ (1979). Lateral cerebral ventricular enlargement in chronic schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 36(7): 735–739.
- Weissman JD, Epstein CM, Davey KR (1992). Magnetic brain stimulation and brain size: relevance to animal studies. *Electroenceph. Clin. Neurophys. Evok. Potentials*, 85(3): 215–219.
- Whitaker PM, Crow TJ, Ferrier IN (1981). Tritiated LSD binding in frontal cortex in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 38(3): 278–280.
- Winter C, Djodari-Irani A, Sohr R, Morgenstern R, Feldon J, Juckel G, Meyer U (2009). Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacology*, 12(4): 513–524.

Wolff AR, Bilkey DK (2008). Immune activation during mid-gestation disrupts sensorimotor gating in rat offspring. *Behav. Brain Research*, 190(1): 156–159.

Wolff AR, Bilkey DK (2010). The maternal immune activation (MIA) model of schizophrenia produces pre-pulse inhibition (PPI) deficits in both juvenile and adult rats but these effects are not associated with maternal weight loss. *Behav. Brain Research*, 213(2): 323–327.

Wolff AR, Cheyne KR, Bilkey DK (2011). Behavioural deficits associated with maternal immune activation in the rat model of schizophrenia. *Behav. Brain Research*, 225(1): 382–387.

Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET (2000). Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 157(1): 16–25.

Wright P, Takei N, Rifkin L, Murray RM (1995). Maternal influenza, obstetric complications, and schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*. 152(12): 1714–1720.

Yamasaki H, LaBar KS, McCarthy G (2002). Dissociable prefrontal brain systems for attention and emotion. *Proc. Nat. Acad. Sciences*, 99(17): 11447–11451.

Yee N, Ribic A, de Roo CC, Fuchs E (2011). Differential effects of maternal immune activation and juvenile stress on anxiety-like behaviour and physiology in adult rats: no evidence for the double-hit hypothesis. *Behav. Brain Research*, 224(1): 180–188.

Young CE, Arima K, Xie J, Hu L, Beach TG, Falkai P, Honer WG (1998). SNAP–25 deficit and hippocampal connectivity in schizophrenia. *Cereb. Cortex*, 8(3): 261–268.

Yukimasa T, Yoshimura R, Tamagawa A, Uozumi T, Shinkai K, Ueda N, Tsuji S, Nakamura J (2006). High-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation improves refractory depression by influencing catecholamine and brain-derived neurotrophic factors. *Pharmacopsychiatry*, 39(2): 52–59.

Zanardini R, Gazzoli A, Ventriglia M, Perez J, Bignotti S, Rossini PM, Gennarelli M, Bocchio-Chiavetto L (2006). Effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on serum brain derived neurotrophic factor in drug resistant depressed patients. *J. Affect. Disorders*, 91(1): 83–86.

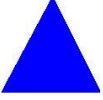


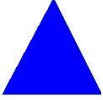
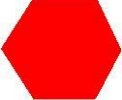

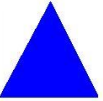
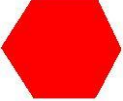


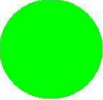



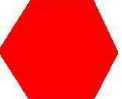

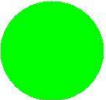

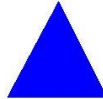
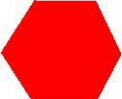

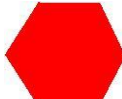

Zhang X, Mei Y, Liu C, Yu S (2007). Effect of transcranial magnetic stimulation on the expression of c-Fos and brain-derived neurotrophic factor of the cerebral cortex in rats with cerebral infarct. *J. Huazhong Univ. Sc. Technology*, 27(4): 415–418.

Zuckerman L, Rehavi M, Nachman R, Weiner I (2003). Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: A novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 28(2003): 1778–1789.

Zuckerman L, Weiner I (2003). Post-pubertal emergence of disrupted latent inhibition following prenatal immune activation. *Psychopharmacology*, 169(3–4): 308–313.

Zuckerman L, Weiner I (2005). Maternal immune activation leads to behavioral and pharmacological changes in the adult offspring. *J. Psychiatr. Research*, 39(3): 311–23.

## 8. Anhang

Tier-Nr.	Durchgang 1		Durchgang 2		Durchgang 3	
	Tür	Wand	Tür	Wand	Tür	Wand
Ratte #1						
Ratte #2						
Ratte #3						
Ratte #4						
Ratte #5						
Ratte #6						
Ratte #7						
Ratte #8						

Tab. 1 verwendete Objekte je Ratte im NOB

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
ABC Blocking Kit	Vector Labs
DAB	Sigma-Aldrich
Depex	Sigma-Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ )	Internes Chemikalienlager
Ethanol	Internes Chemikalienlager
Isopropanol	Internes Chemikalienlager
Kresylviolett	Merck
NaCl	Internes Chemikalienlager
Natriumhydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4$ )	Internes Chemikalienlager
Natriumhydroxid (NaOH)	Internes Chemikalienlager
Nickelammoniumsulfat	Sigma-Aldrich
PFA	Merck
Saccharose D (+)	Internes Chemikalienlager
Thimerosal	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
Tris -Base	Sigma-Aldrich
TritonX100	Sigma-Aldrich
$H_2O_2$	Internes Chemikalienlager
Xylol	Internes Chemikalienlager

**Tab. 2** verwendete Chemikalien und deren Hersteller

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Phosphatpuffer (PBS) pH=7.4	14.03 g NaCl 2.76 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Wasser (H <sub>2</sub> O) 10.88 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.04 g Thimerosal  mit Aqua dest. auffüllen auf 2000 ml
Tris-Puffer pH=8	6.06g Tris-HCl 1.39g Tris-Base 9.00g NaCl  mit Aqua dest. auffüllen auf 1000 ml

**Tab. 3** verwendete Puffer und deren Zusammensetzung

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
30 %ige Saccharose-Lösung	150 g Saccharose D (+) 500 ml PBS pH 7.4
4 %ige PFA-Lösung	80 g PFA 400 ml Aqua dest. Erhitzen auf 60 °C mit 5 N NaOH aufklären Abkühlen  100 ml Stammlösung A (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O) 400 ml Stammlösung B (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)  A und B mischen auf pH 7.4 einstellen  16 g NaCl  mit Aqua dest. auffüllen auf 2000 ml

**Tab. 4** verwendete Lösungen und deren Zusammensetzung

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
NeuN monoklonal (mk) mouse	1:1000	Millipore
GAD 67 mk mouse	1:2000	Millipore
PV mk mouse	1:1000	Swant
CB mk mouse	1:1000	Swant
cFos polyklonal (pk) rabbit (rb)	1:5000	SySy
BDNF pk rb	1:250	Alomone

**Tab. 5** verwendete Primärantikörper und deren Verdünnung und Hersteller

	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Normales Pferdeserum	Blockierung 10 %ig Primärantikörper 1 %ig	Vector Labs
Normales Ziegenserum	Blockierung 10 %ig Primärantikörper 1 %ig	Vector Labs
Biotinylated Horse Anti-Mouse (b-HAM)	1:500	Vector Labs
Biotinylated Goat Anti-Rabbit (b-GAR)	1:500	Vector Labs
ABC Blocking Kit	1:1000	Vector Labs

**Tab. 6** verwendete Seren, Sekundärantikörper und Detektionssysteme und deren Verdünnung und Hersteller



## **Publikationen**

**Rittweger N**, Schindler N, Ishorst T, Neubacher U, Lippmann B, Barmashenko G, Aliane V, Winter C, Funke K (Publikation in Vorbereitung)

Schizophrenia-like phenotype in a rat model of maternal immune activation is modified by interplay of non-invasive brain stimulation and concomitant experience

**Rittweger N**; Konferenz und Vortrag vom 24.09.2018 bis 25.09.2018 des German Center for Brain Stimulation (GCBS) in Dortmund

Effects of pre-adolescent transcranial magnetic stimulation on the behavioural and neuronal phenotype of rats of a maternal immune stimulation model

## **Danksagung**

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person, deshalb ist es jetzt an der Zeit, mich bei allen Menschen zu bedanken, die mir die Erstellung meiner Dissertation ermöglicht haben.

An erster Stelle möchte ich Frau Professorin Christa Thöne-Reineke für Ihr großes Interesse an meinem Dissertationsthema und Ihre Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Klaus Funke, der mir durch die Überlassung des Themas diese Dissertation überhaupt erst ermöglichte und mir auch in stressigen Phasen jederzeit mit fachlicher und methodischer Hilfestellung zur Seite stand.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch den Mitarbeitern der Abteilung Neurophysiologie der medizinischen Fakultät der Ruhr-Universität Bochum. Ein besonderer Dank geht an Frau Tanja Ishorst und Frau Ute Neubacher. Ohne euch wären die Durchführung der Verhaltensversuche und die Anfertigung der Immunhistochemie nicht möglich gewesen.

Besonders danken möchte ich an dieser Stelle auch meiner Familie. Mama und Papa, danke für eure Liebe, eurer offenes Ohr und eure Unterstützung bei all meinen Vorhaben. Mirko, danke, dass du immer hinter mir stehst und mir auch an schlechten Tagen immer ein Lächeln ins Gesicht zauberst. Ohne euch wäre ich heute nicht da wo ich jetzt bin!

Nicht zuletzt möchte ich meinen Freunden für ihre Zeit und Mühe beim Korrekturlesen sowie ihre motivierenden und aufbauenden Worte danken.

## **Finanzierungsquellen**

Die Arbeit wurde finanziell unterstützt durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung und die Studienstiftung des deutschen Volkes.

## **Interessenkonflikt**

Es besteht kein Interessenkonflikt durch finanzielle Unterstützungen der Arbeit.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität als Prüfungsleistung eingereicht.

Berlin, den 11.07.2019

Nadine Rittweger









9 783863 879945  
**mbv**berlin | mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-994-5