

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Tilo Kircher  
des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Hohes paternales Alter als Risikofaktor für  
Autismus-Spektrum-Störungen des Nachwuchses:  
Effekte auf Lern-/Umlernverhalten und Hippocampusmorphologie  
im Tiermodell der Ratte**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Julius Caspar Eggebrecht**

aus Göttingen

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
17.08.2017.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. A. Krug

1. Korreferent: Frau Prof. Dr. K. Becker

# Zusammenfassung

Die Prävalenz von Autismus-Spektrum-Störungen (ASS) zeigt eine steigende Tendenz. Während im Jahr 2000 in den USA bei einem von 150 achtjährigen Kindern eine ASS diagnostiziert wurde, lag diese Rate im Jahr 2012 bereits bei einem von 68 Kindern. Einhergehend mit dieser Zunahme an Diagnosen lässt sich im Zusammenhang mit einer alternden Bevölkerung ein Trend zugunsten später Vaterschaft finden. Das hohe paternale Alter (HPA) stellt einen unabhängigen Risikofaktor für das Auftreten von ASS beim Nachwuchs dar. Das Verstehen der diesem Risikofaktor zugrundeliegenden Pathomechanismen ist somit aus mehreren Gründen von Interesse.

Auf der einen Seite dient das Erforschen dieser Mechanismen einem besseren Verständnis der krankheitsspezifischen Pathogenese von ASS. Auf der anderen Seite tangiert es, bei Fortsetzung beschriebener Trends, auch volkswirtschaftliche Belange und wirft die Frage nach der Notwendigkeit präventionsmedizinischer Maßnahmen auf. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde im Tiermodell durch einen Lern-/Umlernversuch im radialen Acht-Arm-Labyrinth der Einfluss des hohen paternalen Alters auf perseverierendes Verhalten, einem Kernsymptom von ASS, untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss des HPA auf eine mit ASS assoziierte verminderte Gedächtnisleistung geprüft. In Anbetracht der Tatsache, dass Krug *et. al.* (2014) in einer Humanstudie einen Einfluss des väterlichen Alters auf die Hippocampusgröße zeigen konnten, erfolgte eine morphologische Untersuchung dieser Hirnregion unter Zuhilfenahme histologischer Methoden. Die Untersuchung dieser Hirnregion ist zudem von Interesse, da in früheren Studien eine veränderte Hippocampusmorphologie mit ASS assoziiert wurde.

Darüber hinaus wurden die Rattengehirne in der vorliegenden Arbeit bei der Hälfte der Versuchstiere vor und bei der anderen Hälfte nach dem Lern-/Umlernversuch entnommen. Durch den Vergleich der Gehirne beider Entnahmezeitpunkte konnte ein potentieller Einfluss des Lern-/Umlernversuchs auf die Hippocampusmorphologie untersucht werden.

In der vorliegenden Studie führte hohes paternales Alter zu milden kognitiven Defiziten im Sinne einer dezenten Einschränkung des Referenzgedächtnisses während der Umlernphase. Ein perseverierendes Verhalten konnte, ebenso wie weitere Gedächtnisstörungen, nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu

konnte ähnlich den Befunden von Krug *et al.* (2014) gezeigt werden, dass hohes paternales Alter auch im Tiermodell zu morphologischen Veränderungen hippocampaler Subregionen führt. Interessanterweise zeigte sich bei den Männchen eine Größenreduktion der Subregion CA3 in beiden Hippocampi bei Hirnentnahme vor dem Lern-/Umlernversuch. Im Gegensatz dazu war bei den Weibchen lediglich bei Hirnentnahme im Anschluss an den Lern-/Umlernversuch eine Größenreduktion der Subregionen CA3, CA1\_mol und der Gesamtfläche des rechten Hippocampus zu finden. Dieser Befund legt den Schluss nahe, dass sich der Lern-/Umlernversuch möglicherweise im Sinne eines Stressors andersartig auf die Tiere der HPA-Gruppe ausgewirkt haben könnte. Darüber hinaus zeigt sich eine Hemisphären- und geschlechterspezifische Wirkung.

Zusammengenommen kommt die vorliegende Studie zu dem Ergebnis, dass hohes paternales Alter zu einer veränderten Hippocampusmorphologie und milden kognitiven Defiziten führt. Da ASS ein sehr heterogenes Krankheitsbild darstellen, welches im Rahmen dieser Studie nur in Teilaspekten untersucht werden konnte, muss in weiterführenden Studien untersucht werden, inwiefern das hohe paternale Alter weitere dem Autismusspektrum zuzuordnende Verhaltensweisen bedingen würde.

## Summary

The prevalence of autism spectrum disorder (ASD) is increasing. While there was one out of 150 8-year old US-children diagnosed with ASD in 2000, this number has risen to one out of 68 in 2012. Furthermore, there is an ageing society, which is going along with a worldwide trend that fathers are getting older at the time of procreation. High paternal age (HPA) is considered a risk factor for the development of ASD in the offspring. According to that fact, the understanding of underlying causality is of different interest. On the one hand it is supposed to be helpful in the progress of understanding the pathophysiology that leads to ASD, on the other hand it might be of particular interest for prospective Public Health policies. Moreover, it raises the question of whether there is a need for new concepts in Preventive Medicine. Since experimental evidence in humans is not feasible, the development of animal models is needed, allowing for environmental confounders to be controlled. Therefore, a rat model was developed to compare offspring from young and old fathers in learning and reversal learning behaviour using an eight-arm-radial maze. This design also allows testing for perseverative behaviour as a core symptom of ASD. Moreover, it provides the opportunity to look for implicit memory functions that are associated with ASD. Due to the fact that Krug *et al.* (2014) showed an association between HPA and the volume of the hippocampus in humans, the size of this brain region was investigated using histological methods in the rat model. In addition, the hippocampus is of high interest since altered hippocampal morphology is implicated in ASD. Furthermore, one half of the rat brains were extracted before and the other half shortly after testing the rodents in the radial maze. This design allowed for the analysis of whether experimental training had a potential influence on brain morphology.

In this study, it could be shown that HPA leads to mild cognitive impairments in terms of slightly decreased implicit reference memory function during the reversal learning phase. However, there was no evidence of perseveration and further memory dysfunction e.g. working memory errors. In contrast to the minor effect on behaviour and memory, HPA causes morphological alterations of the hippocampus. Interestingly, the influence differed with respect to sex and hemisphere. More precisely, male rats showed a decrease of subregion CA3 in both hippocampi when brains were extracted before the experiment was started.

In contrast to these findings, subregion CA1\_mol, CA3 and the overall area of the right hippocampus of female rats were reduced in size when brains were extracted shortly after the experiment. These findings suggest that the experiment had a differential impact as a stressor on hippocampal morphology in both groups.

Taken together, one can conclude that HPA causes alterations of hippocampal morphology and leads to slight cognitive deficits. However, taking into account the fact that ASD is a very heterogeneous disorder with only a small subset of its symptoms were analysed, further studies need to be conducted to assess whether HPA might cause additional ASD related symptoms.

# INHALT

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>II</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>IV</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>VI</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Autismus-Spektrum-Störungen</b>	<b>1</b>
1.1.1 Häufigkeit	1
1.1.2 Krankheitsbild und Klassifikation	1
1.1.3 Erklärungsansätze und mögliche Entstehungsursachen	3
<b>1.2 Das hohe paternale Alter</b>	<b>4</b>
1.2.1 Demografische Entwicklung	4
1.2.2 Auswirkungen des hohen paternalen Alters	5
1.2.3 Erklärungsansätze für den Einfluss des hohen paternalen Alters	7
<b>1.3 Der Hippocampus</b>	<b>9</b>
1.3.1 Anatomischer Aufbau	9
1.3.2 Funktionelle Aufgaben	11
1.3.3 Regionenspezifische Funktionen des <i>Cornu Ammonis</i>	12
1.3.4 Prozesslateralisierung	13
<b>1.4 Validität von Tiermodellen</b>	<b>14</b>
1.4.1 Tiermodelle für HPA	15
1.4.2 Detektion Autismus-spezifischer Störungen der Hippocampusfunktion in einem Lern-/Umlernversuch im radialen Acht-Arm-Labyrinth im Tiermodell	16
<b>2. FRAGESTELLUNG UND HYPOTHESEN</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIALIEN UND METHODIK</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Materialien</b>	<b>18</b>
3.1.1 Chemikalien	18
3.1.2 Puffer und Lösungen	19
3.1.3 Laborgeräte und -materialien	20
3.1.4 Tierhaltung und Tierversuchsmaterialien	20

3.1.5	Software	21
<b>3.2</b>	<b>Methodik</b>	<b>22</b>
3.2.1	Tiere und zeitlicher Ablauf	22
3.2.2	Haltung	23
3.2.3	Handling	24
3.2.4	Verhaltensversuch	24
3.2.4.1	Das radiale Acht-Arm-Labyrinth	24
3.2.4.2	Versuchsablauf	25
3.2.4.3	Probe Trial	27
3.2.4.4	Datenerhebung und Fehlertypen	28
3.2.5	Histologische Analyse	29
3.2.5.1	Perfusion und Fixation der Hirne	29
3.2.5.2	Gelatinieren der Objektträger	29
3.2.5.3	Anfertigung der Hirnschnitte	30
3.2.5.4	Färbung der Hirnschnitte	30
3.2.5.5	Analyse der Hirnschnitte	30
3.2.6	Statistische Auswertung	31
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Lern-/Umlernversuch</b>	<b>33</b>
4.1.1	Dauer eines Versuchsdurchgangs und Armeintritte	33
4.1.1.1	Durchschnittliche Dauer eines Versuchsdurchgangs	33
4.1.1.2	Armeintritte	33
4.1.2	Fehlertypen	34
4.1.2.1	Fehler des Arbeitsgedächtnisses	34
4.1.2.2	Referenzfehler	34
4.1.2.3	Mischfehler	35
4.1.2.4	Gesamtfehlerzahl	35
4.1.3	Der Probe Trial	37
4.1.3.1	Aufenthaltsdauer in belohnten Armen	37
4.1.3.2	Armeintritte in belohnte Arme	37
4.1.3.3	Auswertung nach Belohnungsstärke – Aufenthaltsdauer	38
4.1.3.4	Auswertung nach Belohnungsstärke – Armeintritte	39
4.1.4	Das Umlernverhalten	41



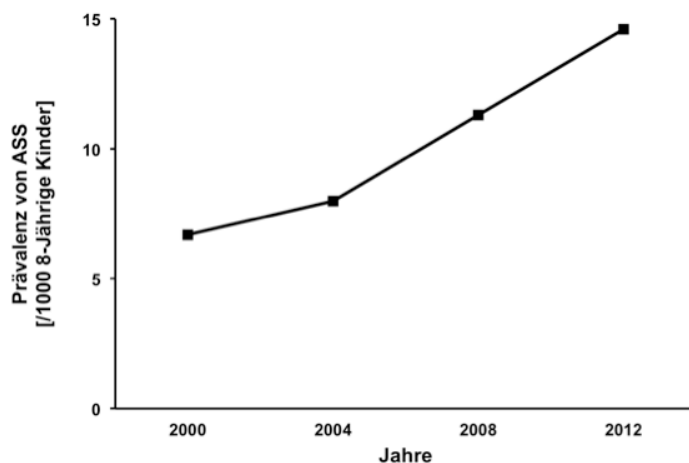
<b>4.2 Morphologische Auswertung</b>	<b>43</b>
4.2.1 Vergleich der Hirngröße zwischen den Zeitpunkten der Hirnentnahme	43
4.2.2 Größe der hippocampalen Subregionen bei Hirnentnahme an PND 39	43
4.2.3 Größe der hippocampalen Subregionen bei Hirnentnahme im Anschluss an die Teilnahme am Lern-/Umlernversuch	44
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>47</b>
<b>5.1 Effekte auf Lern- und Umlernverhalten</b>	<b>47</b>
<b>5.2 Effekte auf die Hippocampusmorphologie</b>	<b>49</b>
<b>5.3 Konklusion aus den Ergebnissen zu Lernverhalten und Hippocampusmorphologie</b>	<b>51</b>
<b>5.4 Allgemeine Aspekte und Ausblick</b>	<b>57</b>
<b>6. ANHANG</b>	<b>59</b>
<b>6.1 Literaturverzeichnis</b>	<b>59</b>
<b>6.2 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>78</b>
<b>6.3 Tabellenverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>6.4 Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>80</b>
<b>6.5 Lebenslauf</b>	<b>81</b>
<b>6.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	<b>83</b>
<b>6.7 Danksagung</b>	<b>85</b>
<b>6.8 Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>86</b>
<b>6.9 Wissenschaftliches Poster</b>	<b>88</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Autismus-Spektrum-Störungen

### 1.1.1 Häufigkeit

Die Prävalenzrate von Autismus-Spektrum-Störungen (ASS) war in der Vergangenheit mit 4,5 Betroffenen auf 10.000 im Jahre 1960 im Verhältnis zu aktuelleren Zahlen relativ gering (Lotter, 1966). Neuere Untersuchungen zeigen eine erhöhte und sogar weiter ansteigende Prävalenzrate (Abbildung 1). Waren in den USA im Jahr 2000 noch 6,7 von 1000 achtjährigen Kindern betroffenen, waren es im Jahr 2006 bereits 9 und im Jahr 2012 14,6 Betroffene (Christensen *et al.*, 2016). Andere Erhebungen kommen zu dem Ergebnis, dass in den USA im Jahr 2007 eins von 90 Kindern (11,1 von 1000) an ASS erkrankt war (Kogan *et al.*, 2009). Jungen sind (23,6 von 1000) etwa 4,45mal häufiger als Mädchen (5,3 von 1000) betroffen (Christensen *et al.*, 2016).



**Abbildung 1: Prävalenzrate von ASS auf 1000 achtjährige Kinder in den USA von den Jahren 2000 bis 2012**

Gezeigt ist die Entwicklung der Prävalenzrate von ASS auf 1000 achtjährige Kinder in den USA in den Jahren 2000, 2004, 2008, 2012 (nach: Christensen *et al.*, 2016).

### 1.1.2 Krankheitsbild und Klassifikation

Das Wort Autismus entstammt dem griechischen Wort autós (αὐτός) und bedeutet „selbst“. Zum ersten Mal wurde der Begriff Autismus von Eugen Bleuler im Jahre 1911 in seiner Definition der Schizophrenie benutzt. Er beschrieb damit ein Abkapseln von der Außenwelt ohne auf die Gefühle, Meinungen und Bedürfnisse anderer zu achten. Die Grundsteine für das

heutige Verständnis von Autismus gehen jedoch auf Hans Asperger (1944) und Leo Kanner (1943) zurück, welche den Begriff unabhängig voneinander aufnahmen, ihn von Bleulers Schizophreniedefinition abgrenzten und um neue Aspekte erweiterten. Durch ihre Vorarbeit trugen sie dazu bei, dass die ICD 10 (*International Classification of Diseases* der Weltgesundheitsorganisation, 1992) Autismus heute unter der Rubrik tiefgreifende Entwicklungsstörungen (F84.-) führt und drei Formen des Autismus unterscheidet. Der frühkindliche Autismus (syn.: Kanner Syndrom, F84.0) beruht zum Teil auf Kanners Definitionen und beschreibt eine schwerwiegende Störung, die sich in der frühen Kindheit vor dem dritten Lebensjahr manifestiert und meist mit geistiger Behinderung, einer starken Entwicklungsverzögerung und fehlender Sprachentwicklung einhergeht. Das Asperger-Syndrom (F84.5) geht größtenteils auf die Beschreibungen Aspergers zurück. Es handelt sich um eine leichtere Form mit etwas späterem Beginn und zeichnet sich durch eine mittlere bis gute Intelligenz, selten mit Inselbegabung, eine verhältnismäßig gute Sprachentwicklung mit Kommunikationsstörung, ein eingeschränktes soziales Kontaktverhalten und komplexe, repetitive Bewegungsmuster aus. Der atypische Autismus (F84.1) ist zu diagnostizieren, wenn vornehmlich Symptome des Kanner-Syndroms auftreten, der Krankheitsbeginn jedoch erst nach dem dritten Lebensjahr erfolgt. Das im englischsprachigen Raum verbreitete DSM-5 (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, der *American Psychiatric Association*, 2013) fasst diese drei Störungsbilder unter dem Begriff der Autismus-Spektrum-Störungen zusammen. Die auftretenden Symptome müssen bereits in der frühen Kindheit vorliegen und den normalen Alltag beeinträchtigen und einengen. Als Hauptmerkmale von ASS gelten hier anhaltende Defizite in der sozialen Kommunikation und sozialen Interaktion in unterschiedlichen Kontexten, die nicht für eine allgemeine Entwicklungsverzögerung sprechen. Weiter zählen eingeschränkte, sich wiederholende, perseverierende Verhaltensmuster, Interessen oder Aktivitäten dazu. Ein perseverierendes Verhalten bezeichnet ein rigides Beharren auf, bzw. die Unfähigkeit des Ablassens von, alten Routinen, Tätigkeiten oder Verhaltensweisen, auch wenn diese im Kontext erkennbar unangebracht und nicht zielführend sind. Perseveration lässt sich beim Menschen mit Hilfe des Wisconsin Card Sorting Test (WCST) nachweisen (Heaton, 1981). Hierbei

muss der Proband nach intuitiv zu erfassenden und wechselnden Regeln anhand von Merkmalen (verschiedene Symbole unterschiedlicher Farbe und Anzahl) einzelne Spielkarten anderen Spielkarten der Reihe nach zuordnen. Im Laufe des Tests verändern sich die zuvor gelernten Regeln unangekündigt und der Proband muss eine neue Sortierregel erlernen. Zeigt sich dabei ein starres Festhalten an alten Regeln, ist dies ein Anzeichen für perseverierendes Verhalten.

### **1.1.3 Erklärungsansätze und mögliche Entstehungsursachen**

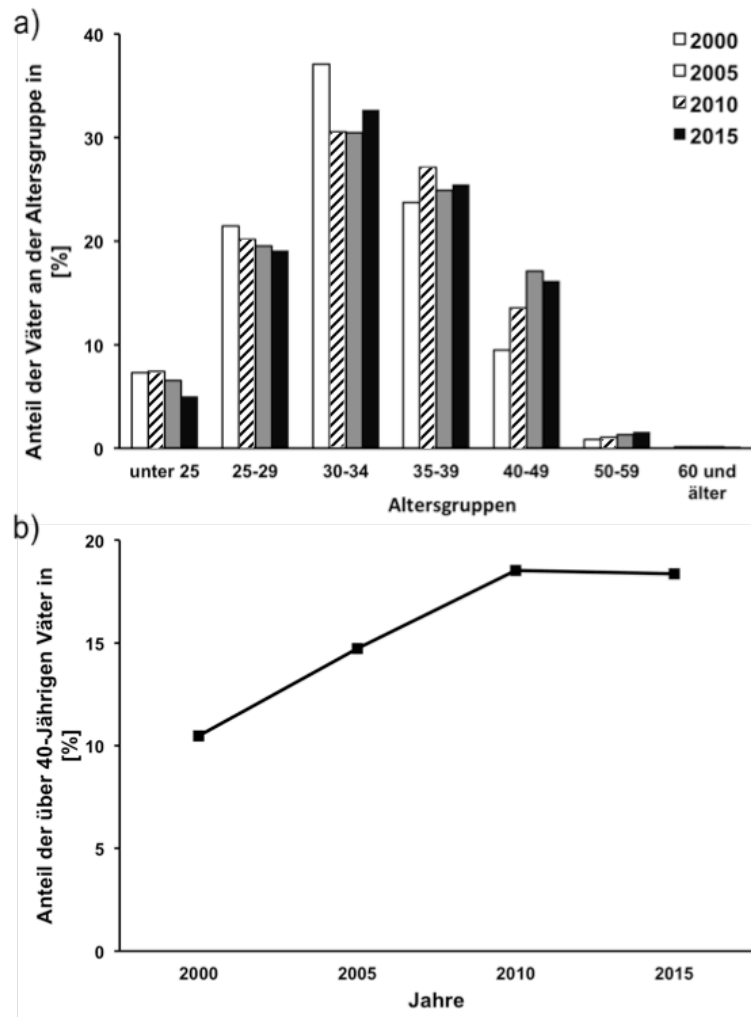
Aufgrund der hohen Konkordanzrate von ASS bei eineiigen Zwillingen ist eine genetische Ursache wahrscheinlich (Bailey *et al.*, 1995). Auch die erhöhte Rate von Autismus-typischen Einschränkungen, wie sozialer Beeinträchtigung und stereotyper Verhaltensweisen oder auch abnormaler Distanziertheit und Impulsivität bei Familienmitgliedern und Verwandten von an ASS Erkrankten, spricht für das Vorliegen eines genetischen Risikoprofils (Bolton *et al.*, 1994; Piven *et al.*, 1994). Diese subklinischen Verhaltensweisen werden auch als breiter oder erweiterter Phänotyp bezeichnet (Klauck *et al.*, 2011). Hierzu passend zeigten Gaugler *et al.* (2014), dass Autismus eine Heritabilität von 52,4% besitzt und identifizierten zudem verschiedene Risikogene, welche in unterschiedlichem Umfang das Erkrankungsrisiko erhöhen. In einer Zwillingsstudie zeigte sich sogar eine deutlich höhere Erblichkeit von bis zu 80% (Lichtenstein *et al.*, 2010). In weiteren Studien konnten zusätzliche Suszeptibilitätsgene identifiziert und somit die genetische Komponente unterstrichen werden (Clarke *et al.*, 2016; Gauthier *et al.*, 2009; Risch *et al.*, 1999). Da die Konkordanzrate monozygoter Zwillinge nicht vollständig ist, scheinen weitere Faktoren einen Einfluss auf die Entstehung der Krankheit zu nehmen. Hierzu zählen unter anderem das hohe paternale Alter (HPA) (Reichenberg *et al.*, 2006), verschiedene Umweltfaktoren wie z.B. Migration der Mutter (Chaste und Leboyer, 2012), Immunschwäche (Gupta *et al.*, 1998) und die Epigenetik (Nguyen *et al.*, 2010). Einhergehend mit der hohen phänotypischen Variabilität, scheint letztendlich ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren der Erkrankung zu Grunde zu liegen. Auf der Suche nach neuroanatomischen Korrelaten zeigten sich unter anderem

Veränderungen des Hippocampus (Aylward *et al.*, 1999; Saitoh *et al.*, 2001) der Amygdala (Schumann *et al.*, 2004) und des Cerebellums (Sparks *et al.*, 2002).

## **1.2 Das hohe paternale Alter**

### **1.2.1 Demografische Entwicklung**

Die deutsche Gesellschaft altert. Lag das Durchschnittsalter im Jahr 1995 noch bei 40 Jahren, betrug es 2014 bereits 44,3 Jahre. Im Jahr 2014 war zudem jeder vierte Deutsche über 60 Jahre alt (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2016a). Gründe hierfür liegen unter anderem in der seit Jahren niedrigen Geburtenziffer (2015: 1,56 Kinder pro Frau) und der steigenden Lebenserwartung (2015: 83 Jahre für Frauen und 78 Jahre für Männer) (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2016a). Auch die Tatsache, dass die „Baby-Boomer“, geburtenstarke Jahrgänge der 1960er Jahre, weiter altern, trägt maßgeblich hierzu bei. Einhergehend mit diesem gesellschaftlichen Alterungsprozess ist auch der Anteil älterer Väter angestiegen (Abbildung 2). Seit 2000 wird in Deutschland das väterliche Alter erhoben. In diesem Zeitraum ist der Anteil der über 40-jährigen Väter bereits von 9,5% im Jahr 2000 auf 16,7% im Jahr 2015 angestiegen (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2016b). Die Ursachen für diese Entwicklung sind vielschichtig und hängen vermutlich zumindest teilweise mit den sich ändernden Anforderungen durch den Beruf, der wirtschaftlichen Gesamtsituation, einem erhöhtem Bildungsniveau, der gestiegenen Alterserwartung, Fortschritten der Reproduktionsmedizin und der zunehmenden Rate an berufstätigen Frauen zusammen.



**Abbildung 2:** a) Vergleichende Übersicht der Altersentwicklung der Väter in Deutschland von den Jahren 2000 bis 2015 b) Vergleichende Übersicht des Anteils der Väter über 40 Jahre in Deutschland von den Jahren 2000 bis 2015

Gezeigt ist der nach Altersgruppen sortierte Anteil der Väter an der Altersgruppe aller Väter in den Jahren 2000, 2005, 2010 und 2015 (nach: Statistisches Bundesamt Deutschland, 2016b). Weiter aufgeführt ist der prozentuale Anteil der über 40-jährigen Väter in Bezug auf alle Väter in der Bundesrepublik Deutschland in den Jahren 2000, 2005, 2010, 2015 (nach: Statistisches Bundesamt Deutschland, 2016b)

## 1.2.2 Auswirkungen des hohen paternalen Alters

Seit langem ist bekannt, dass ein erhöhtes mütterliches Alter einen Risikofaktor für die Ausprägung unterschiedlicher Krankheitsbilder des Nachwuchses darstellt. Die Frage inwiefern das hohe paternale Alter einen Einfluss auf die Gesundheit des Kindes nimmt, ist hingegen erst in letzter Zeit vermehrt in den Fokus der Forschung gerückt.

Das steigende maternale Alter führt vor allem zu Chromosomenabberationen, wie der Trisomie 18, 21 und 27 (Hook, 1981), erhöht das Risiko des intrauterinen Fruchttods (Fretts, 2005), für Frühgeburten (Astolfi und Zonta, 1999) sowie für intrauterine Risiken wie Placenta praevia (Karl und Lack, 2009). Das paternale Alter scheint hingegen, neben seltenen Erkrankungen wie dem Marfan Syndrom, dem Apert Syndrom und Achondroplasie (Risch *et al.*, 1987), vor allem das Risiko für neuropsychiatrische Erkrankungen zu erhöhen. Eine großangelegte epidemiologische Studie in Schweden zur Inzidenz neuropsychiatrischer Erkrankungen in Abhängigkeit von erhöhtem paternalem Alter zeigte hierzu passend ein vermehrtes Auftreten von ASS, Psychosen, bipolaren Störungen, Substanzabusus und auch schulischen Problemen beim Nachwuchs (D'Onofrio *et al.*, 2014). Weitere Studien können die beschriebene Assoziation zwischen hohem väterlichen Alter und vermehrten Auftreten von ASS durch epidemiologische Untersuchungen sowohl in westlichen Industrienationen (Frans *et al.*, 2013; Hultman *et al.*, 2011; Lundstrom *et al.*, 2010; Puleo *et al.*, 2012; Reichenberg *et al.*, 2006) als auch in anderen Kulturkreisen (van Balkom *et al.*, 2012) stützen. In tierexperimentellen Studien konnte zudem Autismus-ähnliches Verhalten bei Nachkommen alter Väter gefunden werden (Sampino *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2009). Auch für eine Assoziation zwischen HPA und erhöhter Schizophrenieprävalenz liegt vermehrte Evidenz vor (Brown *et al.*, 2002; Frans *et al.*, 2011; Lehrer *et al.*, 2016; Malaspina *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2011; Sipos *et al.*, 2004). ASS und Schizophrenie sind somit die am stärksten mit dem HPA assoziierten Erkrankungen. Überdies können für beide Erkrankungen in Bezug auf HPA höchstwahrscheinlich ähnliche kausale Pathomechanismen angenommen werden. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass Teile des genetischen Risikoprofils der beiden Störungsbildern übereinstimmen (McCarthy *et al.*, 2014). Des Weiteren bestehen Überschneidungen von klinischen Symptomen und Verhaltensweisen (Hommer und Swedo, 2015). Daher werden im Rahmen dieser Arbeit einige Zusammenhänge zwischen Schizophrenie und HPA auf Zusammenhänge zwischen HPA und ASS übertragen.

Darüber hinaus konnten Krug *et al.* (2014) in einer breit angelegten Humanstudie einen linearen Zusammenhang zwischen paternalem Alter, schizotypen Verhalten, Neurotizismus und Hippocampusvolumen nachweisen.

### 1.2.3 Erklärungsansätze für den Einfluss des hohen paternalen Alters

Die für den Einfluss des HPA verantwortlichen Mechanismen sind gegenwärtig nicht hinreichend verstanden und erklärbar und somit Gegenstand aktueller Forschung. Derzeitige Hypothesen sehen mögliche Ursachen in: Neumutationen, einer Dysregulation der Epigenetik, einer verspäteten ersten Vaterschaft, sowie dem Einfluss psychosozialer Faktoren oder Umweltfaktoren. Eine mögliche Antwort liefern Kong et al. (2012), die eine Hauptursache in der Zunahme von *de novo* Mutationen, Neumutationen, der spermatoiden DNA bei steigendem väterlichen Alter sehen. Hier ist anzuführen, dass weibliche Keimzellen, Eizellen, vor der Geburt etwa 22 mitotische Zellteilungen durchlaufen und zwei weitere während der Meiose und die Zahl der Zellteilungen somit unabhängig vom Alter ist. Demgegenüber werden männliche Keimzellen, Spermien, im Rahmen der Spermatogenese lebenslang kontinuierlich produziert. So konnte berechnet werden, dass ein Spermium bei einem 20-jährigen Mann 150, bei einem 30-jährigen Mann 380, bei einem 40-jährigen Mann 610 und im Alter von 50 Jahren bereits 810 Zellteilungen durchlaufen hat (Crow, 2000). Der Prozess der Zellteilung, bei dem die DNA exakt repliziert werden muss, ist trotz vorhandener Reparaturmechanismen fehleranfällig und eine Ursache für Neumutationen der DNA. Untersuchungen im Mausmodell bekräftigten die Neumutationshypothese, indem sie bei Nachkommen älterer Väter zum einen generell mehr Neumutationen fanden und zum anderen gehäuft spezifische Neumutationen auftraten, die mit ASS in Verbindung stehen (Flatscher-Bader *et al.*, 2011). Zusätzlich scheinen mit steigendem Alter die Anzahl der DNA Kontroll- und Reparaturenzyme sowie die Antioxidantien im Seminalplasma zurückzugehen (Tarín *et al.*, 1998).

Weiter führt ein erhöhtes Alter des Vaters zu einer Dysregulation der Epigenetik. Die Epigenetik beschreibt eine Informationsspeicherung im Erbgut, die ohne eine Veränderung der DNA-Sequenz, also der Basenabfolge, stattfindet. Diese Veränderungen machen sich demzufolge nicht im Genotyp jedoch im Phänotyp bemerkbar. Integraler Bestandteil dieser Art der Informationsspeicherung ist die Methylierung der DNA, die Histonacetylierung und auch die genomische Prägung. HPA ist mit einer abnormalen Ausführung dieser Prozesse im männlichen Erbgut, den Spermien, assoziiert was sich schädlich auf die



Nachkommen auswirken könnte (Fraga *et al.*, 2005; Perrin *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2013). Im Einklang mit diesem Befund scheinen eine fehlerhafte genomische Prägung und auch eine fehlerhafte Methylierung das Erkrankungsrisiko für ASS zu erhöhen (Badcock, 2011; Feinberg *et al.*, 2015). Für den Einfluss genetischer Ursachen spricht zudem, dass Adoptivkinder alter Väter kein erhöhtes Risiko für die Entwicklung neuropsychiatrischer Erkrankungen zeigen (Ek *et al.*, 2012).

Weitere Erklärungsansätze in anderen epidemiologischen Studien zeigen, dass für die Entstehung einer neuropsychiatrischen Erkrankung des Nachwuchses der Zeitpunkt der ersten Vaterschaft und nicht das väterliche Alter per se entscheidend ist (Pedersen *et al.*, 2014; Petersen *et al.*, 2011). Das Erkrankungsrisiko für den Nachwuchs ist bei einem Mann, der in einem hohen Alter zum ersten Mal Vater wird, somit deutlich höher als bei einem Mann, der in höherem Alter zum wiederholten Male Vater wird. Interessanterweise scheint darüber hinaus das Risiko an ASS zu erkranken vor allem für Erstgeborene erhöht zu sein (de Kluiver *et al.*, 2016). Auch dieser Befund widerspricht der Dominanz genetischer Ursachen, welche einhergehend mit Neumutationen und einer epigenetischen Dysregulation einen nahezu linearen Anstieg der Erkrankungsrate in Abhängigkeit vom steigenden väterlichen Alter und damit einhergehend der Geburtenfolge annehmen ließen.

Darüber hinaus ist im Rahmen der psychosozialen Hypothese auch eine familiäre Prädisposition denkbar. Väter mit einer genetischen Vulnerabilität für eine Erkrankung wie ASS könnten bereits von einer milden Form einer neuropsychiatrischen Krankheit betroffen sein und demzufolge z.B. Einschränkungen sozialer Fähigkeiten zeigen. Diese Einschränkungen könnten eine späte Vaterschaft bedingen. Gleichzeitig gäben die Väter in diesem Falle ihre genetische Vulnerabilität an ihre Nachkommen weiter. Hierzu passend zeigen nicht von ASS betroffene Familienmitglieder Autismus-typische Merkmale, wie Verslossenheit und Distanziertheit, ohne das volle Krankheitsbild einer ASS zu entwickeln (Piven *et al.*, 1994). Zudem weisen Männer, die in fortgeschrittenen Alter zum ersten Mal Vater werden, im Gegensatz zu jungen Vätern, vermehrt Schlafprobleme, depressive Symptome und verminderte soziale Kontakte auf (Nilsen *et al.*, 2013). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Frauen, die unter einer Psychose leiden, häufiger

ältere Partner haben, die dementsprechend in höherem Alter Vater werden. Fraglich ist in diesem Falle, ob das Risiko zur Entwicklung einer neuropsychiatrischen Erkrankung der Nachkommen durch das hohe paternale Alter oder das maternale Risikoprofil bedingt ist (Miller *et al.*, 2011). Gegen einen rein genetischen Erklärungsansatz spricht zudem der Befund, dass auch die Nachkommen besonders junger Väter vermehrt neuropsychiatrische Erkrankungen wie Schizophrenie entwickeln (Lundstrom *et al.*, 2010; McGrath *et al.*, 2014). Hier könnten psychosoziale Risikofaktoren, wie ein niedriger sozioökonomischer Status junger Eltern, eine Rolle spielen. Dazu passend geht ein niedriger sozioökonomischer Status mit einem gesteigerten Erkrankungsrisiko für Schizophrenie einher (Corcoran *et al.*, 2009). Demgegenüber ist HPA mit einem höheren Einkommen und finanzieller Sicherheit assoziiert (Bray und Gunnell, 2006). Kontrovers ist, dass HPA somit eine protektive Wirkung haben müsste. Vermutlich spielen bei jungen Vätern also weitere Faktoren, wie z.B. vermehrte pränatale Exposition durch Alkohol oder auch Zigarettenrauchen eine Rolle (McGrath *et al.*, 2014). In diesem Sinne sollte auch eine in Abhängigkeit vom paternalen Alter ungleiche Verteilung von Umweltfaktoren in Betracht gezogen werden. Hier könnten allgemeine Risikofaktoren, wie der sozioökonomische Status, eine andersartige Erziehung, vermehrte Exposition durch Umweltgifte und auch der vermehrte Einsatz assistierter Reproduktionsmedizin von Bedeutung sein. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die aufgeführten Erklärungsansätze nicht zwingend untereinander ausschließen. Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass sie in Teilen sogar synergetisch wirken.

## **1.3 Der Hippocampus**

### **1.3.1 Anatomischer Aufbau**

Die Erstbeschreibung des Hippocampus als bihemisphärielle, am Unterrand der Seitenventrikel im medialen Temporallappen liegende, geschwungene Struktur erfolgte durch den italienischen Anatom Julius Caesar Aranzi. Bereits im Jahre 1587 bezeichnete er diese anatomische Struktur und verglich sie aufgrund der gewundenen Form mit einem Seepferdchen (lat.: Hippocampus). In der nachfolgenden Zeit erfolgten zahlreiche neue Einteilungen, Benennungen und Erweiterungen dieser Struktur. Da der Begriff Hippocampus somit historischen

Veränderungen unterlag ist, ist seine Definition uneinheitlich. Der Hippocampus *proprius* besteht ausschließlich aus den Subregionen des Ammonshorns (lat.: *Cornu ammonis* = CA; de Garengot und Osmont, 1742) CA1, CA2 und CA3 welche dieses nach zytoarchitektonischen Gesichtspunkten unterteilen (de Nó, 1934). Meist ist mit der Bezeichnung Hippocampus jedoch nicht nur das Ammonshorn, sondern die Hippocampusformation gemeint, welche das *Subiculum*, das *Presubiculum*, das *Parasubiculum*, den *Gyrus dentatus* sowie den *enthorinalen Cortex* als nebeneinander liegende anatomische Strukturen miteinbezieht (Andersen, 2007). Da die Verwendung des Begriffs Hippocampus anstelle von Hippocampusformation auch in der Wissenschaft geläufig ist, wird im Rahmen dieser Dissertation der Begriff Hippocampus synonym zum Begriff Hippocampusformation benutzt. Der Hippocampus liegt im medialen Teil des *Telencephalons* und bildet den Hauptteil des *Archicortex*. Histologisch sind zwei gegeneinander liegende C- oder U-förmige Strukturen zu erkennen, die durch die Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* und das Pyramidenzellband des *Cornu Ammonis* gebildet werden. Während sich das *Cornu Ammonis* als sechsschichtige Struktur bestehend aus *Stratum oriens*, *Stratum pyramidale*, *Stratum lucidum*, *Stratum radiatum*, *Stratum lacunosum* und *Stratum moleculare* darstellt, werden die drei Schichten des *Gyrus dentatus* durch Molekularschicht (*Stratum moleculare*), Körnerzellband (*Stratum granulosum*) und eine polymorphe Schicht (*Stratum multiforme*) gebildet.

Der Hippocampus ist eine gut vernetzte Struktur. Intern ist die trisynaptische Verschaltung über den *entorhinalen Cortex* auf den *Gyrus dentatus* (Synapse 1), von dort über Moosfasern in die Subregion CA3 (Synapse 2) und über die Schaffer Kollaterale weiter zur Subregion CA1 (Synapse 3), als Ort des Outputs von besonderer Bedeutung (Andersen *et al.*, 1971). Der *entorhinale Cortex* dient hierbei als Hauptschnittstelle zum Neocortex und liefert zahlreichen Input verschiedener sensorischer Assoziationsareale, wie akustischer und optischer Sinneseindrücke. Das *Subiculum* erhält Afferenzen der Subregion CA1, während Efferenzen in subcorticale Bereiche führen (Andersen, 2007). Des Weiteren hält der Hippocampus eine Sonderstellung, da er als eine von zwei Strukturen im Säugerhirn, neben der Subventrikularzone der Lateralventrikel, die besondere Fähigkeit der adulten Neurogenese im Bereich des *Gyrus dentatus* besitzt (Eriksson *et al.*, 1998; Kempermann *et al.*, 1997).

### 1.3.2 Funktionelle Aufgaben

Der Hippocampus ist für die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten zuständig und dient als räumliches Navigationssystem des Gehirns. Zudem kommt ihm als Teilstruktur des limbischen Systems eine Beteiligung an der Verarbeitung emotionaler Inhalte zu.

Spätestens seit dem Fallbericht über den Amnesiepatienten H.M. ist ein Zusammenhang zwischen dem Hippocampus und der Konsolidierung deklarativer Gedächtnisinhalte evident. Zur Linderung seiner nicht beherrschbaren epileptischen Anfälle erfolgte bei diesem Patienten 1953 die Resektion der medialen Temporallappen, inklusive Hippocampi. Dies führte dazu, dass H.M. eine anterograde Amnesie entwickelte und somit unfähig war neue Gedächtnisinhalte zu speichern, während alte Erinnerungen erhalten blieben (Penfield und Milner, 1958; Scoville und Milner, 1957). Im Anschluss konnte nachgewiesen werden, dass Schädigungen des Hippocampus ursächlich für diese Art von Beeinträchtigung sind (Zola-Morgan *et al.*, 1986). Folglich ist der Hippocampus entscheidend am Prozess der Abspeicherung deklarativer transienter Gedächtnisinhalte aus dem Arbeitsgedächtnis in das Langzeitgedächtnis beteiligt (Eichenbaum, 2000; Nadel und Moscovitch, 1997). Das Arbeitsgedächtnis dient der kurzfristigen Speicherung, Verarbeitung und Organisation von Gedächtnisinhalten.

Das Referenz- oder Langzeitgedächtnis lässt sich in deklaratives und nicht-deklaratives Gedächtnis aufteilen. Das deklarative Gedächtnis (explizites Gedächtnis) ist unterteilt in das für Faktenwissen zuständige semantische Gedächtnis und das episodische Gedächtnis, welches für erlebte Ereignisse zuständig ist (Squire, 2004). Deklarative Gedächtnisinhalte werden im Neocortex (Nadel und Moscovitch, 1997) abgespeichert. Demgegenüber steht das vermutlich unabhängig vom Hippocampus arbeitende, nicht deklarative Gedächtnis (implizites Gedächtnis). Passend hierzu blieb dieses beim oben erwähnten Patienten H.M. intakt. Das nicht-deklarative Gedächtnis kann in weitere Untergruppen eingeteilt werden. Es ist vor allem für nicht bewusste motorische und sensorische Fertigkeiten (prozedurales Gedächtnis), wie z.B. Schwimmen oder Fahrradfahren, verantwortlich und dient weiter dem Priming (Bahnungsprozesse bei der Reizverarbeitung), dem nicht-assoziativen Lernen und ist im Rahmen der Konditionierung aktiv (Squire, 2004). Vereinfachend

ließe sich die Funktion des impliziten Gedächtnisses durch die Aussage beschreiben, dass eine Person vertraut aussieht, ohne dass man sich erinnern kann sie schon einmal getroffen zu haben. Das Erinnern einer Einkaufsliste würde hingegen beispielhaft für das explizite Gedächtnis stehen (Renner *et al.*, 2000). Die Bedeutsamkeit des Hippocampus im Rahmen der Gedächtnisleistung zeigt sich ebenfalls bereits in frühen Stadien der Alzheimer Demenz, bei denen eine beginnende Hippocampusatrophie gefunden wurde (Henneman *et al.*, 2009).

Eine besondere Rolle kommt dem Hippocampus in der Verarbeitung räumlicher Informationen zu. In der Theorie der „Cognitive maps“ (O'Keefe und Nadel, 1978) basiert die räumliche Orientierung auf einer inneren kognitiven Landkarte, welche durch den Input äußerer Reize, z.B. akustisch oder visuell, erstellt wird. Hierbei dient der Hippocampus als zentrale Schaltstelle in der Verarbeitung vornehmlich über den *entorhinalen Cortex* ankommender Informationen unterschiedlichster Hirnregionen. Wichtiger Bestandteil dieses Prozesses sind im Ammonshorn gelegene Platzzellen. Unterschiedliche Cluster dieser Zellen werden abhängig von Ort und Lokalisation eines Individuums in seiner Umgebung, dem sogenannten Platzfeld, ortsspezifisch aktiviert (O'Keefe, 1976; O'Keefe und Dostrovsky, 1971). Demgegenüber sieht Olton die kurzfristige Informationsspeicherung durch das Arbeitsgedächtnis als zentrale Hippocampusfunktion. Laut dieser Theorie spielt das Arbeitsgedächtnis sowohl bei räumlichen als auch nicht räumlichen Lernprozessen eine entscheidende Rolle (Olton und Paras, 1979).

### **1.3.3 Regionenspezifische Funktionen des *Cornu Ammonis***

Den unterschiedlichen Subregionen des CA werden verschiedene Funktionen zugeschrieben. Die Subregion CA3 scheint wichtig für die Enkodierung und die transiente Bereitstellung von Veränderungen in der Umgebung zu sein und hierdurch eine Konsolidierung dieser Informationen im räumlichen Gedächtnis zu ermöglichen. Diese Subregion ermöglicht sowohl die Einbettung neuer räumlicher Komponenten in ein bestehendes System als auch, bei schwerwiegenden Veränderungen, die Konstruktion eines neues Systems zur räumlichen Orientierung (Kesner, 2013). In diesem Kontext befähigt es durch Autoassoziationen, früher gespeicherte Erinnerungen aus unvollständigen oder

abgeschwächten Formen wiederherzustellen. Die Pyramidenzellen der Subregion CA3 tragen somit zur Vervollständigung von räumlichen Mustern der Umgebung bei (Guzman *et al.*, 2016). So sind Ratten mit Läsion der Subregion CA3, im Gegensatz zu Ratten ohne Läsion, in einer neuen Umgebung (oder nach Entfernen von wenigen Hinweisreizen) nicht mehr in der Lage, eine zuvor fehlerfreie Aufgabe auszuführen oder die Lokalisation neuer Plattformen im *Morris Water Maze* zu lernen (Lee und Kesner, 2003; Nakazawa *et al.*, 2002; 2003). Im *Morris Water Maze* besteht die Aufgabe für die Versuchstiere darin, anhand von visuellen Hinweisreizen die räumliche Position einer unter der Wasseroberfläche verborgenen Plattform in einem mit getrübbten Wasser gefüllten Becken zu erlernen. Auch bidirektionale Assoziationen, also die Fähigkeit von einem Objekt auf die Umgebung zu schließen und andersherum, werden in dieser Subregion verortet (Rolls *et al.*, 1998). Läsionen der Subregionen CA1 oder DG führen jedoch zu keinen Einschränkungen dieser Funktionen (Lee und Kesner, 2003). Folglich scheint in der Verarbeitung von Assoziationen, welche mit der räumlichen Orientierung verknüpft sind, vor allem die Subregion CA3 wichtig zu sein (Gilbert und Kesner, 2003; Hunsaker *et al.*, 2006). Bestehen hingegen Assoziationen mit temporal vermittelten Stimuli ohne eine räumliche Komponente, scheint die Subregion CA1 von Bedeutung zu sein (Hunsaker *et al.*, 2006; Kesner *et al.*, 2005). Einen weiteren Unterschied zwischen beiden Subregionen zeigten klassische Labyrinthversuche im *Hebbs-Williams Maze*, in denen Ratten mit Läsion der CA3-Region Beeinträchtigungen im Enkodieren bzw. im täglichen Lernen aufwiesen, während CA1-lädierte Ratten Versuchstags-übergreifende Einschränkungen im Abrufen der gespeicherten Informationen zeigten (Jerman *et al.*, 2006; Vago *et al.*, 2007). Wenig ist hingegen über die CA2-Region bekannt, welche im Verhältnis zu den Subregionen CA1 und CA3 deutlich kleiner ist. Es gibt Hinweise, dass sie bei Mäusen eine Rolle im sozialen Gedächtnis, also dem Wiedererkennen von Artgenossen, spielt (Hitti und Siegelbaum, 2014).

### **1.3.4 Prozesslateralisierung**

Da der Hippocampus als bilaterale Struktur vorliegt, stellt sich die Frage nach funktionsspezifischer Prozesslateralisierung, wie sie im Neocortex zu finden ist. So zeigte sich in der zerebralen Bildgebung eine verstärkte Aktivierung des rechten Hippocampus von Taxifahrern, wenn diese mit räumlichen

Denkaufgaben konfrontiert wurden (Maguire *et al.*, 1997). Diese Annahme unterstützend, scheint der rechte Hippocampus dominant bei der Verarbeitung räumlicher Informationen zu sein (Abrahams *et al.*, 1997; Aradillas *et al.*, 2011; Bohbot *et al.*, 1998; Motley und Kirwan, 2012), während die Verarbeitung semantischer Informationen vorrangig den linken Hippocampus zu aktivieren scheint (Frisk und Milner, 1990; Motley und Kirwan, 2012). Läsionsstudien führten jedoch zu keinem einheitlichen Ergebnis (Gerlai *et al.*, 2002; Goto *et al.*, 2010; Li *et al.*, 1999; Shipton *et al.*, 2014). Daher lässt sich annehmen, dass vermutlich keine strenge Prozesslateralisierung vorliegt, sondern seiten- und aufgabenspezifische Präferenzen bestehen und die Hippocampusleistung auf einer integrativen Funktion beider Hippocampi beruht. Zudem scheint es bei unilateralen Ausfällen Kompensationsmechanismen zu geben (Finke *et al.*, 2013).

## 1.4 Validität von Tiermodellen

Im Rahmen translationaler Erforschung der Kausalität psychiatrischer Erkrankungen sind Tiermodelle ein etablierter Ansatz um gezielt den Einfluss einzelner Faktoren auf Krankheitspathogenese und -verlauf zu untersuchen. Da jeder menschliche Proband als Individuum mit einer eigenen Vergangenheit und Zukunft in einer individuellen Umwelt lebt, ist die gezielte Ursachensuche unter Ausschaltung von Störfaktoren, wie z.B. Umwelteinflüssen, in Humanstudien in dieser Form nicht möglich. Gerade dies ist jedoch aufgrund der Multikausalität psychiatrischer Erkrankungen von zentralem Interesse. Gleichzeitig sind psychiatrische Prozesse im Tiermodell schwierig zu erfassen und zu objektivieren, da sie sich meist nicht nur im Verhalten sondern vor allem in veränderten kognitiven Prozessen äußern. Folglich kann anhand spezifischer Tests im Tiermodell mitunter nur indirekt auf Symptome, Ausprägungen und Einschränkungen geschlossen werden. Dementsprechend ist es wichtig, die Validität eines Tiermodelles anhand verschiedener Gültigkeitskriterien zu prüfen. Zu diesen Kriterien zählen die Augenscheinvalidität, die Konstruktvalidität und die Vorhersagevalidität (van der Staay *et al.*, 2009; Willner, 1984). Die Augenscheinvalidität dient der Prüfung der Analogie zwischen klinischem Erscheinungsbild beim Menschen und der Symptomatik im Tiermodell. Die Konstruktvalidität bezieht sich auf die Ursache und ist gegeben, wenn Symptome durch gleichartige biologische Korrelate und Mechanismen beim

Menschen und im Tiermodell hervorgerufen werden. Die Vorhersagevalidität ist im Rahmen der Erforschung von neuen Therapeutika entscheidend. Sie gilt in beide Richtungen und trifft sowohl zu, wenn wirksame Substanzen aus Humanstudien im Tiermodell die bekannte Wirkung zeigen, als auch wenn sich im Tiermodell gefunden Therapeutika in der klinischen Erprobung am Menschen erwartungsgemäß auswirken. Trotz der Prüfung eines Tiermodells anhand der Gültigkeitskriterien, kann ein Tiermodell nie eins zu eins auf den Menschen übertragen werden. Besonders im Rahmen komplexer psychiatrischer Krankheitsbilder, welche multikausal sind und meist mehrere verschiedene Symptome zeigen, hat sich die Entwicklung symptomspezifischer Tiermodelle zu Erforschung von Teilaspekten etabliert. Tiermodelle sind vor allem in der Grundlagenforschung von Bedeutung, denn sie ermöglichen durch einzigartige Designs Rückschlüsse auf den Menschen und liefern zudem wichtige Hinweise für die Erforschung zugrundeliegender Pathomechanismen.

#### **1.4.1 Tiermodelle für HPA**

In großen epidemiologischen Studien ließ sich der Einfluss des HPA auf das vermehrte Auftreten neuropsychiatrischer Erkrankungen darstellen (beispielhaft: D'Onofrio *et al.*, 2014; Malaspina *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2011; Reichenberg *et al.*, 2006). Genetische Studien lieferten weitere Hinweise zum Verständnis zugrunde liegender Mechanismen (Kong *et al.*, 2012). Auf das väterliche Alter bezogene Tiermodelle sind im Gegensatz zu zahlreichen Humanstudien jedoch nur in kleiner Anzahl vorhanden (Auroux, 1983; Foldi *et al.*, 2011; Garcia-Palomares *et al.*, 2009; Janecka *et al.*, 2015; Sampino *et al.*, 2014; Smith *et al.*, 2009). Tiermodelle bieten hier allerdings gegenüber Humanstudien mehrere Vorteile. So lässt sich zum einen das väterliche Alter beliebig und einheitlich variieren, zum anderen lassen sich die Umwelteinflüsse für alle Tiere in gleichem Maße kontrollieren und modulieren. Außerdem haben die Tiere im Gegensatz zu Probanden in Humanstudien einen sehr ähnlichen genetischen Hintergrund. Folglich lässt sich der Einfluss von Störvariablen auf ein Minimum reduzieren. Tiermodelle bieten somit die Möglichkeit durch gezielte Veränderung eines einzelnen Faktors, in diesem Falle des väterlichen Alters, hervorgerufene Verhaltensweisen oder auch morphologische Unterschiede zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Effekt des



väterlichen Alters auf Lern- und Umlernverhalten sowie auf die Hippocampusmorphologie am Tiermodell der Ratte untersucht.

#### **1.4.2 Detektion Autismus-spezifischer Störungen der Hippocampusfunktion in einem Lern-/Umlernversuch im radialen Acht-Arm-Labyrinth im Tiermodell**

Ein Lern-/Umlernversuch im radialen Acht-Arm-Labyrinth bietet die Möglichkeit, einige Elemente von ASS im Tiermodell zu untersuchen. Während der Lernphase lernen die Tiere, in welchen Armen des Labyrinths sich Futter befindet und welche Arme unbelohnt sind. In der darauffolgenden Umlernphase ändert sich das Belohnungsschema. Zum einen lässt sich durch diesen Versuch die Funktionalität des Arbeitsgedächtnisses überprüfen, welches die Tiere einsetzen, um in einem Durchgang aufgesuchte Arme nicht erneut zu besuchen (Olton und Paras, 1979). ASS gehen mit Beeinträchtigungen des Arbeitsgedächtnisses einher (Corbett *et al.*, 2008; Luna *et al.*, 2007). Zudem ist das Arbeitsgedächtnis mit dem Hippocampus assoziiert (Axmacher *et al.*, 2007; Ranganath und D'Esposito, 2001). Zum anderen zeigt sich, ob gewonnene Informationen die Versuchsdurchgänge übergreifend bereitgestellt werden und somit eine Übertragung in das Referenzgedächtnis stattfindet (Olton *et al.*, 1980). Außerdem kann untersucht werden, ob die Tiere lernen sich anhand von visuellen Hinweisreizen zu orientieren und durch diese Lernprozesse ein räumliches Gedächtnis geschaffen wird (Yan *et al.*, 2004). Bei dem Aufbau und der Bereitstellung eines räumlichen Gedächtnisses handelt es sich um eine weitere, eng mit einem funktionierenden Arbeitsgedächtnis verbundene hippocampusspezifische Funktion (Olton und Paras, 1979). Verschiedene Studien berichten über Einschränkungen des räumlichen Gedächtnisses im Rahmen von ASS (Kouser *et al.*, 2013; Steele *et al.*, 2007). Darüber hinaus kann in der zweiten Phase des Labyrinthversuchs, in Analogie zum Wisconsin Card Sorting Test (Ozonoff, 1995), auf ein perseverierendes Verhalten, während der Umlernphase getestet werden (Moy *et al.*, 2008). Perseverierendes Verhalten bezeichnet das rigide Festhalten an einer Strategie zum Lösen einer Aufgabe. Es ist ein Kernsymptom von ASS und ließ sich im Tierversuch durch Hippocampusläsionen evozieren (Ellen und Wilson, 1963).

## 2. Fragestellung und Hypothesen

Hohes väterliches Alter ist ein Risikofaktor für die Entstehung neuronaler Entwicklungsstörungen, wie Autismus-Spektrum-Störungen. Die neurobiologischen Mechanismen, die zu diesem erhöhten Risiko beitragen, sind bisher allerdings kaum erforscht.

Der Hippocampus ist aufgrund seiner integrativen Funktion, der Beteiligung an Gedächtnisleistung, limbischem System und Exekutivfunktionen auf der Suche nach neuroanatomischen Krankheitskorrelaten speziell im Rahmen von ASS von Bedeutung. So zeigen Patienten mit ASS unter anderem ein Festhalten an bestimmten Routinen und Tätigkeiten (Perseverierendes Verhalten), sowie Beeinträchtigungen von Gedächtnisprozessen mit eingeschränktem räumlichen Gedächtnis und Arbeitsgedächtnis, welche mit einer gestörten Hippocampusfunktion assoziiert sind. Auf der Suche nach neuroanatomischen Korrelaten von ASS ließen sich zudem Veränderungen der Hippocampusmorphologie finden. Krug *et al.* (2014) konnten zudem eine Assoziation zwischen HPA und Hippocampusvolumen bei gesunden menschlichen Probanden zeigen.

Die Hypothesen dieser Dissertation lauten wie folgt:

1. Hohes väterliches Alter führt bei den Nachkommen zu kognitiven Beeinträchtigungen, die sich in einer verschlechterten Gedächtnisleistung während der Lernphase zeigen sollten.
2. Hohes väterliches Alter führt bei den Nachkommen zu perseverierendem Verhalten, was sich in Defiziten während der Umlernphase äußern sollte.
3. Hohes väterliches Alter hat bei den Nachkommen einen Einfluss auf die Neuroanatomie, welcher sich in einer veränderten Hippocampusmorphologie zeigen sollte.

### 3. Materialien und Methodik

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Chemikalien

Chromalaun (Chrom(III)-Kaliumsulfat-Dodecahydrat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
di-Natrium Hydrogen Phosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kresylviolett (Acetat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natrium di-Hydrogen Phosphat Monohydrat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Release (Pentobarbital-Natrium)	WDT, Garbsen, Deutschland
Roti-Histokitt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Histol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sucrose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek, Torrance, USA

**Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien**

### 3.1.2 Puffer und Lösungen

#### Acetatpuffer (pH: 6,0):

- 16,4g/l Natriumacetat in
- Aqua dest. lösen und
- mit 99%-Essigsäure pH-Wert einstellen

#### Kresylviolett (pH: 3,8 – 4,0):

- 1,5g Kresylviolett in
- 300ml Acetatpuffer lösen und
- mit 99%-Essigsäure pH-Wert einstellen

#### Gelatinelösung

- 2,5g Gelatine und
- 0,25g Chrom(III)-kaliumsulfat-Dodecahydrat in
- 500ml dH<sub>2</sub>O lösen

#### Saline (0,9 % NaCl):

- 2000 ml dH<sub>2</sub>O
- 18 g NaCl

#### Perfusionslösung (4% PFA - Saline):

- 900 ml dH<sub>2</sub>O
- 9 g NaCl
- 4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O (Natrium di-Hydrogen Phosphat Monohydrat, \* H<sub>2</sub>O; PM=137,99)
- 8,25 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (di-Natrium Hydrogen Phosphat, wasserfrei; PM=141,96)
- 100 ml Formalin (Formaldehyd) 37% (entspricht 4 % in finaler Lösung)

#### Fixationslösung (4% PFA - 30% Sucrose [Saccharose]):

- 225 ml dH<sub>2</sub>O
- 1 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O (Natrium di-Hydrogen Phosphat wasserfrei; PM=141,96)
- 2,06 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (di-Natrium Hydrogen Phosphat \* H<sub>2</sub>O; PM=137,99)
- 75g Sucrose
- 25 ml Formalin

### 3.1.3 Laborgeräte und -materialien

Kryostat	Leica, CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany
Deckgläschen	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Feinwaage	Kern abt 120-5dm, KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland
Filterpapier	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Magnet-Mixer mit Heizblock	MR Hei-Standard, Heidolph, Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Axio Imager.M2, Zeiss, Göttingen
Multimedia Festplatte	ScreenPlay Pro HD, Iomega, San Diego, USA
Objektträger	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schlauchpumpe	2-Ch Var-Speed Peristaltic Pump, Ismatec ISM 795 REGLO Analog, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
Rasierklinge	Apollo-Herkenrath GmbH & Co. KG, Solingen, Deutschland
Videokamera	Panasonic WV-BP 330/GE, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Laborgeräte und Materialien**

### 3.1.4 Tierhaltung und Tierversuchsmaterialien

Acht-Arm-Labyrinth	Eigenbau der Feinmechanischen Werkstatt der Philipps-Universität Marburg für die Arbeitsgruppe Verhaltensneurowissenschaft von Prof. Dr. R. Schwarting
--------------------	--

Belohnungspellets	<i>dustless precision pellets</i> , 45mg pro Pellet, Bioserve, Bilaney Consultants Deutschland
Laborfutter	Altromin, Lage, Deutschland
Macrolon Typ III Käfig (Größe: LxBxH, 425x265x150mm, mit hoher Edelstahlabdeckung)	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
Macrolon Typ IV Käfig (Größe: LxBxH, 590x380x200mm, mit hoher Edelstahlabdeckung)	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
Tapvei Espenholzstreu	Indulab AG, Garms, Schweiz
Tätowierpaste	Ketchum <i>permanent tattoo inks green paste</i> , Ketchum Manufacturing inc., Brockville, ON , Kanada

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Materialien für Tierhaltung und Versuche**

### 3.1.5 Software

Excel für Mac 2011	Microsoft, Redmond, USA
PowerPoint für Mac 2011	Microsoft, Redmond, USA
SPSS Version 22	IBM, Armonk, USA
Stereo Investigator	MicroBrightField, Williston, VT, USA
Word für Mac 2011	Microsoft, Redmond, USA

**Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Software**

## 3.2 Methodik

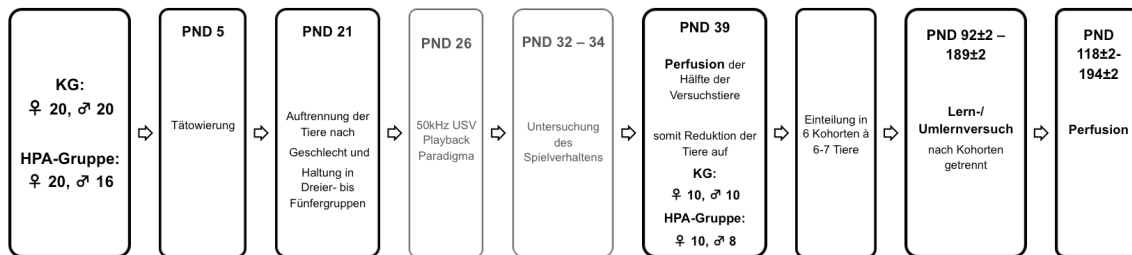
### 3.2.1 Tiere und zeitlicher Ablauf

Die Versuchstiere in der Studie waren 40 weibliche und 36 männliche Wistarratten (RccHan:WIST, Harlan, Venray, Niederlande). Zur Generierung dieser Versuchstiere wurden zehn Zuchttriplets, bestehend aus einem Männchen und zwei Weibchen gebildet. Jeweils fünf Männchen wurden zur Züchtung der Kontrollgruppe (KG) und der Experimentalgruppe (HPA=Hohes paternales Alter) verwendet. Die Weibchen waren bei der Verpaarung 2 Monate alt. Die männlichen Tiere zur Züchtung der Kontrollgruppe waren 2 Monate und die Männchen der Experimentalgruppe 23 Monate alt. Laborratten sind mit 2 Monaten am Ende der Adoleszenz-Phase und mit 3 Monaten gelten sie bereits als junge Erwachsene (Schneider, 2013). Eine 23 Monate alte Ratte befände sich somit bei einer Lebenserwartung von etwa 2-3 Jahren bereits im hohen Erwachsenenalter (Sengupta, 2013).

Die Triplets wurden für zwei Wochen gemeinsam gehalten und anschließend getrennt. Die Weibchen erhielten nun zusätzlich Papiertücher zum Nestbau in ihre Käfige. Bei der Züchtung entstanden sieben Würfe in der Kontrollgruppe, von denen fünf verwendet wurden, und fünf in der Experimentalgruppe. Die Würfe wurden am Tag der Geburt auf jeweils acht Tiere (vier Weibchen und vier Männchen) reduziert, soweit dies möglich gewesen ist. Dadurch ergaben sich für die Kontrollgruppe 20 Weibchen und 20 Männchen, bei der HPA-Gruppe, aufgrund von unausgeglichenen Würfen, 20 Weibchen und 16 Männchen (Abbildung 3). Zur Identifikation wurden die Rattenbabies am 5. Lebenstag (PND 5, engl. post-natal day) mit einem nicht toxischen Tattoo versehen. Die Tätowierpaste wurde subkutan mit einer Nadel in der Mitte der Pfote injiziert. Bis zum 21. Lebenstag wurden die Versuchstiere zusammen mit ihren Müttern gehalten, anschließend abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt in Dreier- bis Fünfergruppen eines Wurfes gehalten.

An PND 26 nahmen die Tiere an einem Verhaltensexperiment teil, bei welchem ihnen Rufe von Artgenossen vorgespielt wurden (50-kHz USV Playback Paradigma, vgl. (Seffer *et al.*, 2014). Des Weiteren wurden die Tiere von PND 32 bis 34 hinsichtlich ihres Spielverhaltens (vgl. Vanderschuren *et al.*, 1995) untersucht. Der Versuch zum Spielverhalten und auch das 50-kHz USV Playback Paradigma wurden nicht vom Ersteller dieser Arbeit durchgeführt und

ausgewertet. An PND 39 erfolgte bei der Hälfte der Versuchstiere die intrakardiale Perfusion mit anschließender Hirnentnahme. Die übrigen Versuchstiere (KG: 10 Weibchen und 10 Männchen; HPA: 10 Weibchen und 8 Männchen) wurden in 6 Kohorten mit jeweils 6-7 Ratten eingeteilt und, nach einwöchiger Futterdeprivation, nacheinander für zwei Wochen in einem Lern-/Umlernexperiment getestet. Diese Versuche erfolgten zwischen PND 92±2 bis 189±2. Im Anschluss fand 5 Tage nach dem letzten Versuchstag die Perfusion und Entnahme der Gehirne der entsprechenden Kohorte statt. Durch den Vergleich dieser Hirne mit jenen, die an PND 39 entnommen wurden, sollte festgestellt werden, ob der Lernversuch einen morphologischen Einfluss auf die Hippocampusgröße hatte.



**Abbildung 3: Übersicht zum zeitlichen Ablauf des Versuchs**

### 3.2.2 Haltung

Die Haltung der Tiere erfolgte während der Verpaarung und Aufzucht in Gruppenhaltung in Macrolon Typ IV Käfigen. Während dieser Zeit erhielten die Tiere Standardlaborfutter ad libitum. Zur Zeit des Lern-/Umlernversuchs wurden die Versuchstiere in Macrolon Typ III Käfigen in Einzelhaltung gehalten und erhielten nach einem Restriktionsplan täglich 10-12g Futter. Zu jedem Zeitpunkt hatten die Tiere unbegrenzten Zugang zu Leitungswasser, das mit schwach konzentrierter Salzsäure versetzt war (0,0004% Salzsäure Lösung), um es keimarm zu machen. Als Käfigeinstreu wurde Tapvei Espenholzstreu verwendet. Im Haltungsraum herrschte ein 12:12 Stunden Hell/Dunkel-Zyklus, Lichtphase zwischen 8:00 und 20:00 Uhr, bei einer Umgebungstemperatur von 20-25°C. Sämtliche experimentellen Vorgänge wurden von der Ethikkommission des Regierungspräsidiums Gießen genehmigt (Aktenzeichen MR 20/35 Nr.33/2012) und gemäß den gesetzlichen Tierschutzbestimmungen und den Auflagen der zuständigen Behörden durchgeführt.



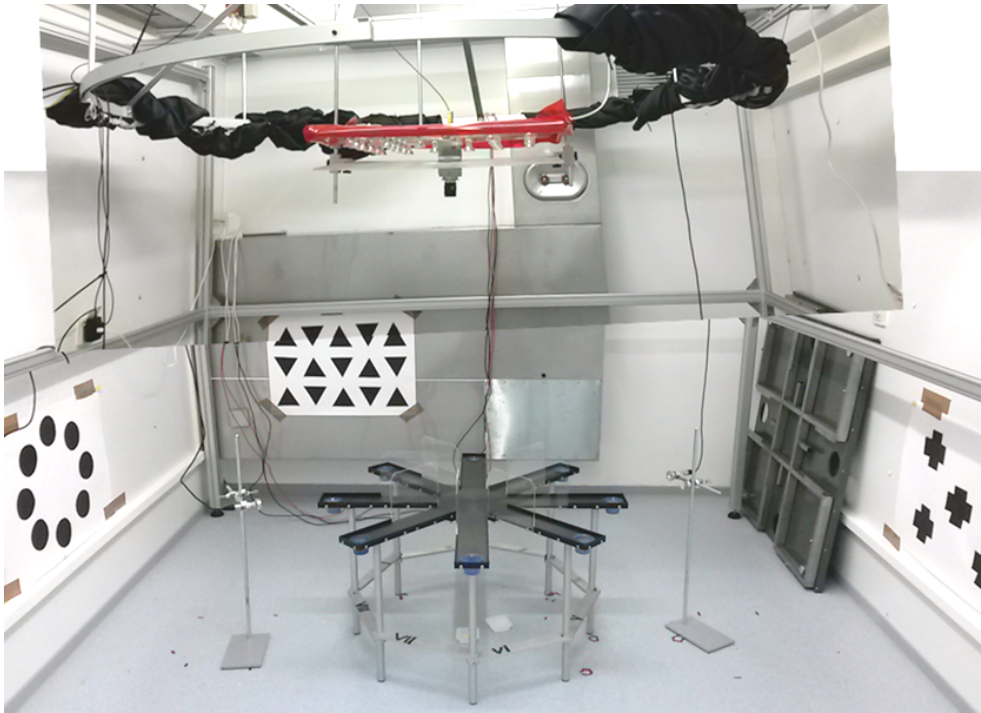
### **3.2.3 Handling**

Das Handling dient der Gewöhnung der Versuchstiere an den Untersucher. Intendiert ist die Stressreduktion der Tiere während der Interaktion mit dem Untersucher während der Experimentalphase. Das Handling erfolgte ab dem zweiten Tag der Futterdeprivation (PND 93±2) an drei aufeinander folgenden Tagen. Während des Handlings wurden die Tiere einzeln für 5 Minuten auf den Schoß des Untersuchers gesetzt. Am ersten Tag durften die Ratten 2,5 Minuten lang explorieren und schnüffeln und wurden die restliche Zeit gekraut. Am zweiten und dritten Tag blieb den Ratten auf dem Schoß des Untersuchers eine Minute Zeit für die Exploration. Im Anschluss wurden sie innerhalb von 4 Minuten viermal am Nacken gegriffen und hochgehalten bis sie aufhörten zu strampeln oder sich zu wehren. In der Zwischenzeit wurden sie gekraut.

### **3.2.4 Verhaltensversuch**

#### **3.2.4.1 Das radiale Acht-Arm-Labyrinth**

Das radiale achtarmige Labyrinth bestand aus schwarzem Plastik und befand sich 52cm über dem Boden. Von einer mittigen Plattform (Durchmesser: 24cm) gingen strahlenförmig acht im gleichen Abstand voneinander versetzte Arme (9,8cm x 40,5cm) ab. Am Ende dieser Arme befand sich ein in den Boden des jeweiligen Armes eingelassenes Glasschälchen in welches die Futterpillen platziert wurden. Die einzelnen Arme wurden zusätzlich durch 20cm x 16cm große durchsichtige Plexiglasscheiben voneinander getrennt (Abbildung 4). Während der Testung wurden außerdem vier Futterschalen mit den Belohnungspellets unterhalb des Zentrums platziert. So sollte eine Orientierung zu den belohnten Armen durch olfaktorische Hinweisreize unterbunden werden. Um den Versuchstieren durch optische Hinweise die Orientierung im Labyrinth zu erleichtern, gab es an jeder Wand 42cm x 59,4cm große schwarze Hinweisreize. Die Beleuchtung des Versuchsraumes wurde täglich auf eine Stärke von 30 Lux justiert und erfolgte durch dimmbares Weißlicht. Zusätzlich befand sich mittig an der Decke des Versuchsraumes eine Kamera, welche das Videobild über eine Multimedia Festplatte in den Vorraum auf einen Monitor übertrug. Um für jedes Tier gleiche Startbedingungen zu schaffen, wurde das Labyrinth nach jedem Tier zwischen den Durchläufen gesäubert und mit 0,1%iger Essigsäure geputzt.

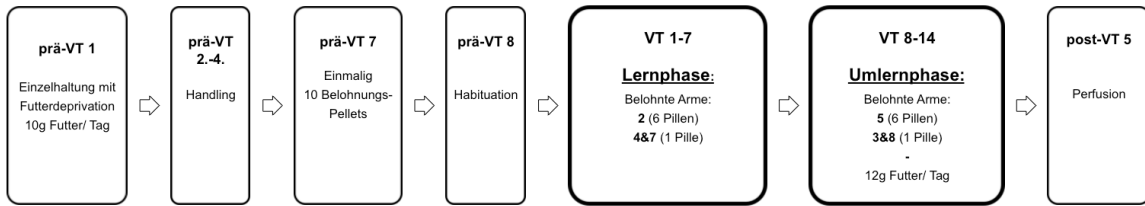


**Abbildung 4: Das radiale Acht-Arm-Labyrinth, Versuchsaufbau**

*In der Mitte des Versuchsraumes ist das erhöhte radiale Acht-Arm-Labyrinth zu erkennen. An der Decke befinden sich die dimmbaren Weißlichtleuchten sowie zentral eine Kamera. Seitlich des radialen Acht-Arm-Labyrinths stehen zwei Mikrofone zur Aufnahme potentiell emittierter Ultraschallvokalisationen der Versuchstiere. An den Wänden sind 3 von 4 verwendeten optischen Hinweisreizen zu erkennen, welche der Orientierung im Labyrinth dienen. Bei der gezeigten Abbildung handelt es sich um eine Kombination aus zwei Einzelbildern.*

### **3.2.4.2 Versuchsablauf**

Der Verhaltensversuch im Radiallabyrinth diente der Erfassung des räumlichen Lernvermögens der Versuchsgruppen mit Betrachtung des Arbeits- und Referenzgedächtnisses (vgl. Olton und Paras, 1979) sowie der Testung auf perseverierendes Verhalten während der Umlernphase. Dieser Versuch fand von PND  $92 \pm 2$  bis  $189 \pm 2$  für die einzelnen Kohorten versetzt statt. Der Versuchsdurchlauf dauerte für jede Kohorte 14 Tage. Diese setzten sich wie folgt zusammen (Abbildung 5):



### Abbildung 5: Übersicht zum zeitlichen Ablauf des Lern-/Umlernversuchs

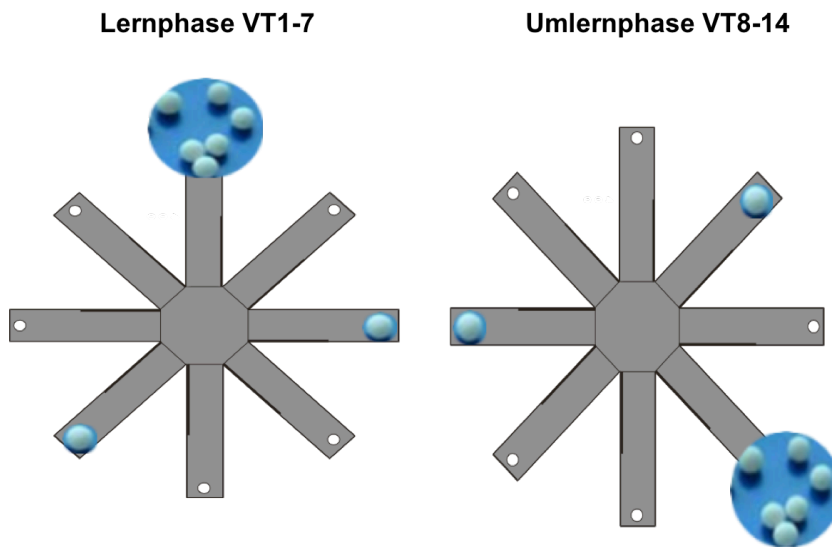
Die 8 Tage vor dem Lern-/Umlernversuch werden als prä-VT und die 5 Tage nach diesem Versuch als post-VT bezeichnet.

Eine Woche vor Versuchsbeginn erfolgte die Einzelhaltung der Ratten mit Futterdeprivation, um die Motivation zur Futtersuche im Labyrinth zu erhöhen. Hierzu bekamen die Tiere 10g Standardfutter. Das Körpergewicht der Ratten wurde durch tägliches Wiegen vor der Futtergabe kontrolliert und sollte 85% des Ausgangsgewichtes des Tieres nicht unterschreiten. Da sich das Gewicht der Tiere beider Versuchsgruppen konstant verringerte wurde die Futtermenge ab VT8 für alle Ratten gleichermaßen auf 12g Futter pro Tag erhöht. Somit wurde erreicht, dass das Durchschnittsgewicht der Ratten der Kontrollgruppe über den Versuchszeitraum hinweg bei 89% (Standardfehler, engl.: *standard error of the mean*, SEM: 0,51) und das der HPA Gruppe bei 90,25% (SEM: 0,41) vom Ausgangswert lag. Um eine Assoziation zwischen dem Labyrinthversuch und der anschließender Fütterung zu unterbinden, erfolgte die Fütterung der Ratten stets mindestens eine Stunde nach Versuchsende. Zur Gewöhnung der Ratten an die speziellen Futterpillen, welche im Labyrinth als Belohnung dienten, bekam jedes Tier zwei Tage vor Versuchsbeginn zehn dieser Pillen zusätzlich zum Standardlaborfutter.

Einen Tag vor Versuchsbeginn erfolgte zur Gewöhnung an das Labyrinth ein Habituationsdurchgang. Hierzu wurde in die Mitte sowie an das Ende eines jeden Armes des Labyrinths eine Futterpille platziert. Die Ratte wurde in die Mitte des Labyrinths gesetzt und der Durchgang beendet, sobald entweder alle Futterpillen gefressen wurden oder nach einem Abbruchkriterium von 30 Minuten.

Am nächsten Tag begann die Testung. Hierzu wurden an VT1-7 (Lernphase) in die Arme 4 und 7 jeweils eine Futterpille (schwach belohnt) und in den Arm 2 sechs Futterpillen (stark belohnt) platziert. Nach sieben Tagen wechselte das

Schema (VT8-14; Umlernphase) und es wurden die Arme 3 und 8 mit einer Futterpilke und der Arm 5 mit sechs Futterpillen belohnt (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Verteilung der Belohnungspellets in der Lern- und Umlernphase**

*Während der Lernphase (VT1-7) befanden sich in Arm 4 und 7 jeweils ein Belohnungspellet und in Arm 2 sechs Pellets. In der Umlernphase (VT8-14) befanden sich in Arm 3 und 8 jeweils ein Belohnungspellet und in Arm 5 sechs Pellets.*

Pro Tier fanden täglich 4 Versuchsdurchläufe statt, wobei zunächst alle Versuchstiere einer Kohorte den ersten Durchgang absolvierten, bevor mit dem zweiten begonnen wurde. Folglich hatte jede Ratte zwischen den einzelnen Durchläufen eine Pause, während der die anderen Tiere der selbigen Kohorte getestet wurden. Ein Durchlauf endete, sobald ein Tier alle Futterpillen gefressen hatte oder nach einem Abbruchkriterium von 5 Minuten. Die Reihenfolge der Versuchstiere war pseudorandomisiert und wurde von Versuchstag zu Versuchstag so variiert, dass jedes Tier einmal zu jedem Zeitpunkt innerhalb dieser Reihenfolge getestet wurde. Zusätzlich erfolgte eine Randomisierung der Startausrichtung der Ratte im Labyrinth, so dass die Tiere jeden Durchgang in eine andere Richtung schauend begannen.

### 3.2.4.3 Probe Trial

Als besonderes Maß zur Überprüfung des Lernverhaltens wurden Probe Trials durchgeführt (Moy *et al.*, 2007). An VT7 und VT14, also jeweils nach 7 Versuchstagen mit der Belohnung in den gleichen Armen, fand im Anschluss an die 4 Durchläufe ein fünfter Durchlauf statt. Dieser so genannten Probe Trial,

bei dem keine Futterpillen im Labyrinth platziert wurden, dauerte 5 Minuten und diente zur Überprüfung, ob sich die Versuchstiere häufiger und länger in vormals belohnten Armen aufhielten. Zudem wurde analysiert, ob stärker belohnte Arme häufiger als weniger stark belohnte und zu keiner Zeit belohnte Arme besucht wurden.

#### **3.2.4.4 Datenerhebung und Fehlertypen**

Um das Lernverhalten der Ratten im Labyrinth zu erfassen, wurden pro Durchlauf sowohl die Armeintritte der Ratte als auch die Durchgangsdauer erfasst. Als Armeintritt galt es, wenn sich die Hinterpfoten der Ratte in einem Arm befanden. Im Probe Trial, an VT7 und VT14, wurde zusätzlich die Aufenthaltszeit in den unterschiedlichen Armen erhoben. Zur genaueren Analyse wurden im Anschluss die nicht belohnten Armeintritte eines jeden VT in drei verschiedene Fehlertypen eingeteilt. Als Fehler des Arbeitsgedächtnisses galt es, wenn eine Ratte einen belohnten Arm zum wiederholten Mal betrat. Betrat eine Ratte zum ersten Mal einen nicht belohnten Arm so wurde dies als Fehler des Referenzgedächtnisses gewertet. Ein Mischfehler war definiert als ein Wiedereintritt in einen unbelohnten Arm. Dieser Fehlertyp wurde als Mischfehler bezeichnet, da er in zweierlei Hinsicht falsch war. Zum einen, da der Arm nicht belohnt war und zu anderen, da das Tier den Arm bereits besucht hatte.

Als Ausgangspunkt der statistischen Auswertung dienten die Mittelwerte der Fehlertypen aus den vier Durchläufen pro Tag. Um den Lernprozess der Tiere abzubilden, wurden Fehlerkurven erstellt. Die Fehlerkurven der unterschiedlichen Fehlertypen wurden aus absoluten Werten und auch aus relativen Fehlern in Bezug auf die Gesamtzahl der Armeintritte gebildet und in Prozentwerte umgerechnet.

Zur Auswertung des Probe Trials wurde eine „Score-Variable“ für die Eintritte und die verbrachte Zeit in belohnten und unbelohnten Armen erhoben. Hier wurde sowohl die Gesamtzahl der Armeintritte eines Tieres als auch der Fakt, dass es mehr unbelohnte als belohnte Arme gab, berücksichtigt. Zur Bildung dieser Variablen wurden die Armeintritte in belohnte oder unbelohnte Arme durch die Gesamtzahl der Armeintritte dividiert. Der daraus resultierende Wert wurde für die belohnten Arme durch 3 bzw. für die unbelohnten durch 5 dividiert. Die Score Variable wurde anschließend in Prozentwerte umgerechnet

und zeigt somit die Eintritte bzw. die Verweildauer in belohnten und unbelohnten Armen in Prozent an.

Des Weiteren erfolgte im Probe Trial eine Auswertung hinsichtlich der Belohnungsstärke der verschiedenen Arme. Hierzu wurden die Eintritte bzw. die Aufenthaltsdauer zwischen den mit einem Pellet belohnten Armen, dem mit 6 Pellets belohnten Arm und den unbelohnten Armen verglichen. Diese Werte wurden sowohl bezüglich der Gesamtarmeintritte als auch der Häufigkeit belohnter und unbelohnter Arme analog zur Score-Variable angepasst.

Um das Umlernverhalten der Ratten an VT8 (erster Tag der Umlernphase) auszuwerten, erfolgte ein Vergleich der Häufigkeit der Armeintritte in aktuell belohnte, zuvor belohnte (während der Lernphase) und nie belohnte Arme. Auch hier wurde für die Anzahl der Armeintritte und die Häufigkeit der Arme adjustiert und im Anschluss in Prozentwerte umgerechnet.

### **3.2.5 Histologische Analyse**

#### **3.2.5.1 Perfusion und Fixation der Hirne**

Die Perfusion der Ratten wurde aus versuchstierrechtlichen Gründen von einem ausgebildeten Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Versuchstiere wurden mit einem Pentobarbital-Natrium (Release; 0,2ml / 100g Körpergewicht) anästhesiert und nach ventraler Eröffnung des Brustkorbs mit 0,9%iger Kochsalzlösung und 4% Paraformaldehyd in 0,1molaren Phosphatpuffer (PFA; pH 7,4) transkardial perfundiert. Anschließend wurden die Hirne entnommen und in Fixationslösung (4%PFA / 30% Sucrose) aufbewahrt. Mit dem Schneiden der Hirne wurde so lange gewartet, bis diese auf den Boden des Gefäßes abgesunken waren.

#### **3.2.5.2 Gelatinieren der Objektträger**

Das Gelatinieren sorgt für die spätere Haftung der Hirnschnitte am Objektträger und verhindert ein Ablösen während der Färbung. Dafür wurden die Objektträger zunächst für einige Sekunden in Ethanol (100%) gereinigt und anschließend in zwei Stufen für jeweils 5 Minuten in destilliertem Wasser gesäubert. Daraufhin wurden sie für eine Minute in eine Gelatinelösung getaucht und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Am nächsten Tag wurden die Objektträger erneut für eine Minute in die Gelatinelösung getaucht und bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet.

### 3.2.5.3 Anfertigung der Hirnschnitte

Der posteriore Teil des Gehirns wurde in der Mitte des Cerebellums mit einem Skalpell abgetrennt. Im Anschluss wurde das Gehirn mit Hilfe von einem Einbettmedium an einem zuvor mit heißem Wasser gereinigten Stempel fixiert und für 30-45min im Kryostat bei -19°C heruntergekühlt. Mit dem Mikrotom wurden 40µm dicke koronare Hirnschnitte angefertigt und mit einem, mit destilliertem Wasser leicht angefeuchteten, Pinsel auf einen gelatinierten Objektträger aufgetragen und luftgetrocknet.

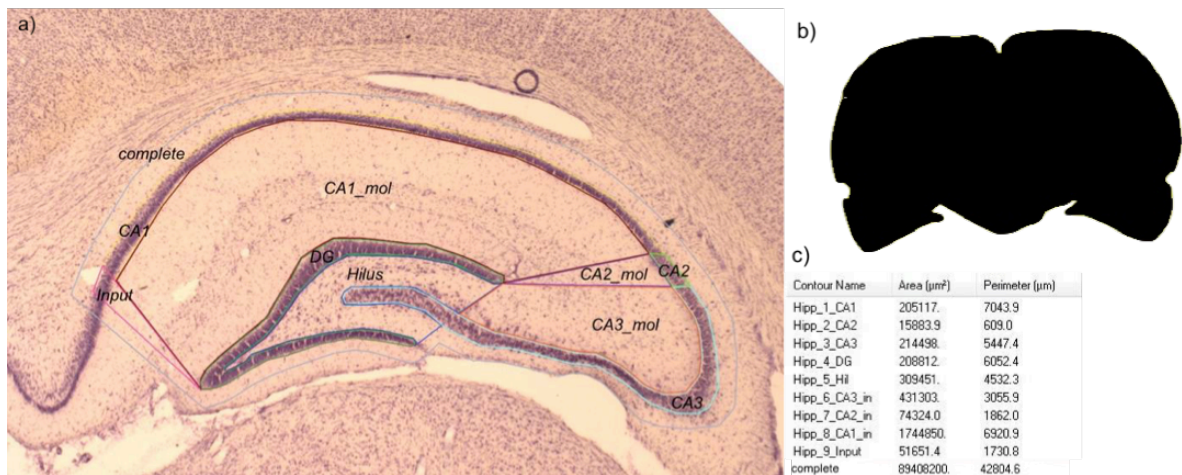
### 3.2.5.4 Färbung der Hirnschnitte

Die Nissl- oder auch Kresylviolett-Färbung erfolgte mit Hilfe einer Färbestraße. Um die Hirnschnitte zu rehydrieren, wurden die Objektträger mit dem getrockneten Schnittpräparat zunächst für jeweils 3 Minuten in Ethanollösungen mit absteigender Konzentration (96%ig, 93%ig, 90%ig) gewässert. Danach erfolgte die Färbung in der Kresylviolettlösung für 3 Minuten. Der Objektträger wurde anschließend fünfmal in destilliertes Wasser getaucht, um die überschüssige Farblösung zu entfernen. Dann wurde dem Präparat durch eine aufsteigende Alkoholreihe für jeweils 3 Minuten in 70%igem, 90%igem und 96%igem Ethanol Wasser entzogen. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte durch Isopropanol und Roti<sup>®</sup>-Histol fixiert. Hiernach erfolgte das Eindecken der Objektträger mit Roti<sup>®</sup>-Histokitt sowie der Trockenvorgang bei Raumtemperatur.

### 3.2.5.5 Analyse der Hirnschnitte

Die mikroskopische Auswertung der Hirnschnitte konzentrierte sich auf den Hippocampus. Die bildliche Auswertung der Hirnschnitte erfolgte mit einem digitalen Mikroskop bei 25facher Vergrößerung mit dem Programm Stereo Investigator. Zunächst wurde die entsprechende Schnittebene des Hippocampus (anterio-posterior von *Bregma* -4,08 mm) mit Hilfe des Paxinus & Watson-Hirnatlas eingestellt. Dann wurde der Hippocampus unter Zuhilfenahme des Hirnatlas in neun Subregionen aufgeteilt und ihre Fläche bestimmt (Abbildung 7a). Als Subregion wurde zunächst das *Cornu Ammonis* (=CA) des Hippocampus in die Subregionen CA1, CA2 und CA3 mit ihren entsprechenden Schichten dem *Stratum radiatum* und *Stratum moleculare* (=CA1\_mol, CA2\_mol, CA3\_mol) unterteilt. Des Weiteren wurde die Fläche des *Gyrus dentatus* (engl.: dentate gyrus =DG), des *Hilus* und der Inputregion (Input)

gemessen. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Gesamtfläche des Hippocampus (=complete, Abbildung 7c). Diese Untersuchungen wurden für die linke und die rechte Hemisphäre getrennt durchgeführt. Um eine potentielle Schrumpfung der Gehirne sowie divergierende Hirngrößen zu berücksichtigen, wurde die gesamte Fläche des Hirnschnittes bestimmt (Abbildung 7b). Die ausgemessenen Subareale wurden in relativen Bezug zu dieser gesetzt. Folglich zeigen die in den Diagrammen benutzten Werte den Anteil der Subregion in Prozent von der Gesamtschnittfläche des Hirnpräparates an.



**Abbildung 7:** a) Darstellung des linken Hippocampus einer Ratte mit Beschriftung und farblicher Markierung der untersuchten Regionen b) Gesamtfläche eines Hirnschnittes c) beispielhafte Messwerttabelle

### 3.2.6 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS Statistics, die Abbildungen wurden mit Excel und PowerPoint erstellt. Ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant erachtet. Deskriptive Werte stellten Mittelwerte (MW) und Standardfehler des MW (SEM) als Streuungsmaß dar. Für den Fall, dass mehr als zwei Variablen verglichen wurden, erfolgte zunächst eine Untersuchung auf das Vorliegen von Haupteffekten (HE) der Faktoren väterliches Alters und Versuchstag (VT), sowie einer Wechselwirkungen beider Faktoren mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) mit Messwiederholung. Um die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Ordnung zu minimieren, erfolgte zunächst der Mauchly-Test. War in diesem keine Sphärizität gegeben ( $p < 0,05$ ), wurde in der ANOVA die Greenhouse-Geisser Korrektur mit entsprechend nach



unten korrigierten Freiheitsgraden betrachtet. Zeigte sich in der ANOVA ein Haupteffekt, wurden t-Tests für die Einzelvergleiche durchgeführt. Für den Vergleich des Faktors väterliches Alter (KG vs. HPA) wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Beim Vergleich der Armeintritte und Aufenthaltsdauer während des Probe Trials, der Belohnungsstärke und des Umlernverhaltens, wurde der t-Test für verbundene Stichproben eingesetzt. Um herauszufinden, ob sich die Ratten im Probe Trial zielgerichtet und nicht nach dem Zufallsprinzip bewegt haben, wurde der t-Test bei einer Stichprobe gegen den Wert 0,5 (50%) verwendet. Der t-Test wurde durchgeführt, da er sich auch im Falle einer nicht normalverteilten Stichprobengruppe sehr robust zeigt, stets ein vergleichbarer Stichprobenumfang vorlag und die Varianzhomogenität beachtet wurde. Potentielle Interaktionen des Faktors Geschlecht mit dem Faktor väterliches Alter wurden im Rahmen des Lern-/Umlernversuchs mit Hilfe der Varianzanalyse geprüft. Bei der Analyse der morphologischen Daten erfolgte zunächst eine Übersichtsauswertung, in welcher anhand von t-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft wurde. Signifikant veränderte Regionen wurden im Anschluss auf Geschlechtseffekte untersucht.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Lern-/Umlernversuch

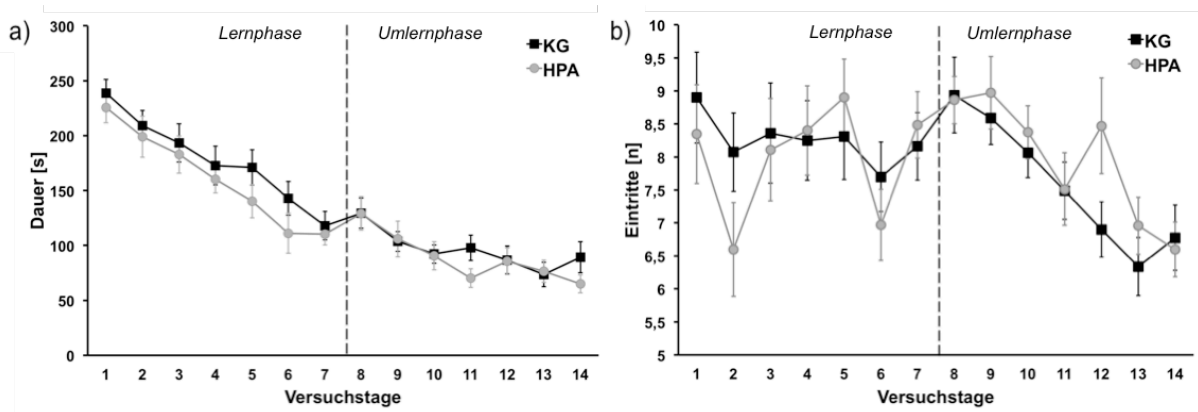
#### 4.1.1 Dauer eines Versuchsdurchgangs und Armeintritte

##### 4.1.1.1 Durchschnittliche Dauer eines Versuchsdurchgangs

Sowohl bei den Kontroll- als auch den HPA-Tieren zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der Zeit, die für das erfolgreiche Beenden eines Versuchsdurchgangs benötigt wurde ( $F_{1,7,795}=48,012$ ;  $p<0,001$ ; Abbildung 8a). So verbrachten die Kontrolltiere an Versuchstag 1 (VT1)  $238,65s \pm 12,53$  (MW  $\pm$  SEM) und die Tiere der HPA-Gruppe  $225,65s \pm 14$  im Labyrinth, während sie an VT7 nur noch  $117,91s \pm 13,02$  (KG), beziehungsweise  $110,22s \pm 9,89$  (HPA) benötigten, um die Belohnungspellets zu finden bzw. bis das Abbruchkriterium von 5 Minuten erfüllt war. An VT8 änderte sich das Belohnungsschema und die Aufenthaltsdauer stieg leicht auf  $129,44s \pm 13,73$  in der Kontrollgruppe bzw. auf  $129,11s \pm 15,28$  in der HPA-Gruppe an. Von VT8 bis VT14 sank die Dauer dann weiter auf  $89,34s \pm 14,23$  bzw.  $64,97s \pm 8,08$ . Bei den Männchen benötigten die HPA-Tiere im Durchschnitt mehr Zeit für einen Durchgang, während bei den Weibchen die Kontrolltiere etwas langsamer waren (nach Geschlecht getrennte Daten nicht gezeigt; Geschlecht x väterliches Alter:  $p=0,045$ ).

##### 4.1.1.2 Armeintritte

Die Anzahl der Armeintritte sank über die gesamte Versuchsdauer ( $F_{1,5,66}=4,576$ ;  $p<0,001$ ). Die Tiere der KG zeigten an VT1 über alle vier Durchläufe gemittelt  $8,9 \pm 0,69$  Armeintritte, die Tiere der HPA-Gruppe  $8,34 \pm 0,75$  (Abbildung 8b). Rein deskriptiv waren die Schwankungen der Armeintritte zwischen den einzelnen VT in der HPA-Gruppe etwas stärker ausgeprägt. In der KG zeigte sich eine leichte Reduktion der Armeintritte an VT7 auf  $8,16 \pm 0,51$ . Die Häufigkeit der Armeintritte der HPA-Gruppe zeigte sich hier mit  $8,46 \pm 0,50$  im Vergleich zu VT1 konstant. An VT8 änderte sich die Positionierung der Belohnung in den Armen. Die Anzahl der Armeintritte stieg an diesem Tag in der KG auf  $8,94 \pm 0,57$  bzw. in der HPA-Gruppe auf  $8,86 \pm 0,35$  Eintritte an. Im zeitlichen Verlauf war in beiden Gruppen eine nahezu kontinuierliche Verringerung der Armeintritte von VT8 bis zum letzten Versuchstag, VT14, auf  $6,78 \pm 0,49$  in der KG bzw.  $6,59 \pm 0,41$  in der HPA-Gruppe zu beobachten.



**Abbildung 8:** a) Übersicht der durchschnittlichen Dauer eines Versuchsdurchgangs sowie b) der Anzahl der Armeintritte im radialen Acht-Arm-Labyrinth im Versuchsverlauf

Gezeigt ist die durchschnittliche Dauer eines Versuchsdurchgangs, welche die Ratten zum Finden der Belohnungspellets (bzw. bis das Abbruchkriterium von 5 Minuten erfüllt war) benötigt haben und die Anzahl der Armeintritte von VT1 bis VT14. Von VT1-VT7 befand sich die Belohnung in den gleichen Armen (Lernphase). An VT8 änderte sich die Positionierung der Belohnung und blieb bis VT14 konstant in diesen Armen (Umlernphase). Die senkrechte gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt, zu welchem sich die Belohnungsverteilung änderte. Gruppengrößen: KG=20, HPA=18.

## 4.1.2 Fehlertypen

### 4.1.2.1 Fehler des Arbeitsgedächtnisses

Dieser Fehlertyp hatte den geringsten Anteil an der Gesamtfehlerzahl und wurde über die Versuchsdurchläufe seltener ( $F_{1,8,318}=2,47$ ;  $p=0,012$ ). So betrug der prozentuale Anteil der Arbeitsgedächtnisfehler an den Gesamtfehlern an VT1  $9,83\% \pm 1,32$  in der KG und  $10,04\% \pm 2,44$  in der HPA-Gruppe (Abbildung 9a). Nachdem die Fehlerzahl an VT7 auf  $7,63\% \pm 1,4$  in der KG und  $7,6\% \pm 1,4$  in der HPA-Gruppe gesunken war stieg sie nach neuer Verteilung der Belohnungspellets an VT8 auf  $8,28\% \pm 1,64$  bzw.  $8,56\% \pm 0,98$  an. Weiterhin zeigte sich in beiden Gruppen eine vergleichbare Abnahme der Häufigkeit über die Versuchstage auf  $7,34\% \pm 1,19$  bzw.  $6,60\% \pm 1,50$  an VT14.

### 4.1.2.2 Referenzfehler

Die Fehler des Referenzgedächtnisses zeigten sich über den gesamten Lern-/Umlernversuch hinweg relativ konstant ( $F_{1,13}=1,712$ ;  $p=0,056$ ; Abbildung 9b).

An VT1 handelte es sich bei  $41,78\% \pm 1,83$  der Armeintritte der KG und  $38,97\% \pm 2,48$  der HPA-Gruppe um Referenzfehler. Bis VT7 sank die Anzahl leicht ab und die Gruppen näherten sich einander an (KG:  $38,21\% \pm 1,67\%$  bzw. HPA:  $37,77\% \pm 1,29$ ). An VT8 erfolgte ein Anstieg auf  $43,49\% \pm 2\%$  in der KG und auf  $39,83\% \pm 1,36$  in der HPA-Gruppe. An VT14 lag der Anteil der Referenzfehler mit  $32,73\% \pm 2$  in der KG gegenüber der HPA-Gruppe mit  $38,17\% \pm 1,73$  deutlich tiefer. Es zeigte sich, dass die HPA-Tiere in der Lernphase tendenziell etwas weniger Fehler als die KG-Tiere begingen. In der Umlernphase kehrte sich diese Tendenz jedoch um und die HPA-Tiere begingen mehr Referenzfehler als die Tiere der KG (VT x väterliches Alter:  $p=0,027$ ).

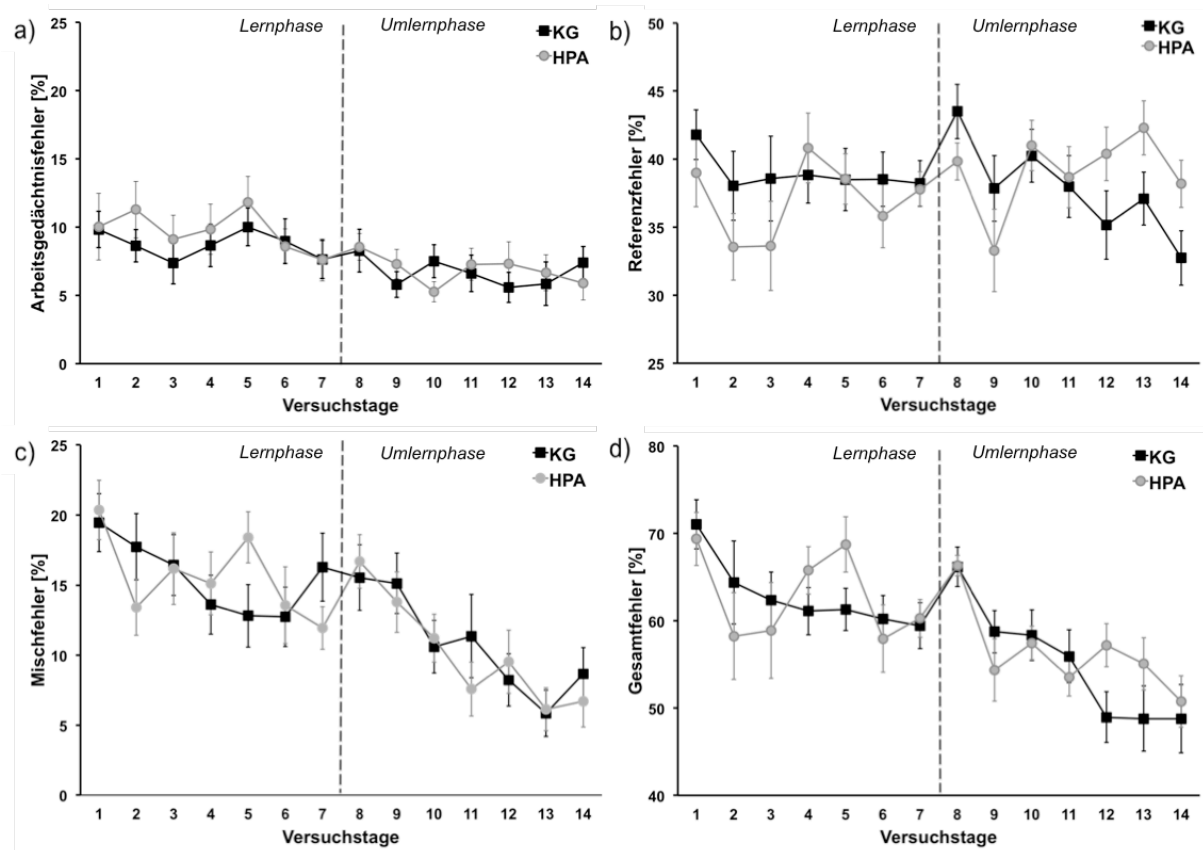
#### **4.1.2.3 Mischfehler**

Die Mischfehler sanken über die Versuchstage ( $F_{1,13}=7,799$ ;  $p<0,001$ ) und zeigten in beiden Gruppen einen ähnlichen Verlauf (Abbildung 9c). Der prozentualen Anteil der Mischfehler an den Armeintritten sank von  $19,45\% \pm 2,06$  an VT1 auf  $8,65\% \pm 1,90$  an VT14 in der KG und von  $20,36\% \pm 2,11$  auf  $6,69\% \pm 1,82$  in der HPA-Gruppe. Während sich die Positionsänderung der Belohnung in der HPA-Gruppe mit einer sprunghaften Vermehrung des Fehlertyps von  $11,95\% \pm 1,52$  auf  $16,7\% \pm 1,92$  bemerkbar machte, sank in der KG die Fehlerzahl hingegen von  $16,29\% \pm 2,43$  an VT7 auf  $15,53\% \pm 2,34$  an VT8.

#### **4.1.2.4 Gesamtfehlerzahl**

Die Zahl der Gesamtfehler verringerte sich im Verlauf des Lern-/Umlernversuchs ( $F_{1,7,244}=8,156$ ;  $p<0,001$ ). An VT1 waren  $71,06\% \pm 2,81$  der Armeintritte der Kontrollgruppe und  $69,38\% \pm 3,03$  der HPA-Gruppe Fehler in Form von allen ermittelten Fehlertypen (Referenzfehler, Fehler des Arbeitsgedächtnisses und Mischfehler; Abbildung 9d). Die Lernkurven beider Gruppen lagen relativ nah beieinander. An Versuchstag 8, dem Tag an dem die belohnten Arme gewechselt wurden, zeigte sich verglichen mit VT7 ein deutlicher Peak. So stieg von VT7 auf VT8 die Fehleranzahl von  $59,45\% \pm 2,62$  auf  $66,18\% \pm 2,26$  in der KG und von  $60,30\% \pm 2,16$  auf  $66,32\% \pm 1,17$  in der HPA-Gruppe an. Über den gesamten Versuch betrachtet zeigte sich in der KG eine stetige Abnahme der zusammengefassten Fehlertypen mit beschriebenem

Peak an VT8. Die HPA-Gruppe zeigte von VT1 bis VT14 stärkere Schwankungen. Beide Gruppen hatten jedoch ihren Maximalwert an VT1 und erreichten ihren niedrigsten Wert am letzten Versuchstag ( $48,79\% \pm 3,93$  in der KG und  $50,76\% \pm 2,94$  in der HPA-Gruppe), an dem etwa jeder zweite Armeintritt ein Fehler gewesen ist.



**Abbildung 9:** Die verschiedenen Fehlertypen sowie die Gesamtfehlerzahl in Prozent der Gesamtarmeintritte pro Trial im Versuchsverlauf: a) Fehler des Arbeitsgedächtnisses b) Fehler des Referenzgedächtnisses c) Mischfehler d) Gesamtfehler.

Gezeigt ist die Anzahl der begangenen Fehler in Abhängigkeit von den Armeintritten von VT1 bis VT14. Von VT1-VT7 befand sich die Belohnung in den gleichen Armen (Lernphase). An VT8 änderte sich die Positionierung der Belohnung und blieb bis VT14 konstant in diesen Armen (Umlernphase). Die senkrechte gestrichelte Linie kennzeichnet den Zeitpunkt, zu welchem sich die Belohnungsverteilung änderte. Die Skalierung wurde der prozentualen Häufigkeit der Fehlertypen angepasst. Gruppengrößen: KG:  $n=20$ , HPA:  $n=18$ .

### 4.1.3 Der Probe Trial

Beide Gruppen zeigten ein ähnliches Verhalten zugunsten häufigerer Armeintritte und einer längeren Aufenthaltszeit in den während der regulären Versuchsdurchgänge mit Futter belohnten Armen (nachfolgend „belohnte Arme“ genannt; Abbildung 10).

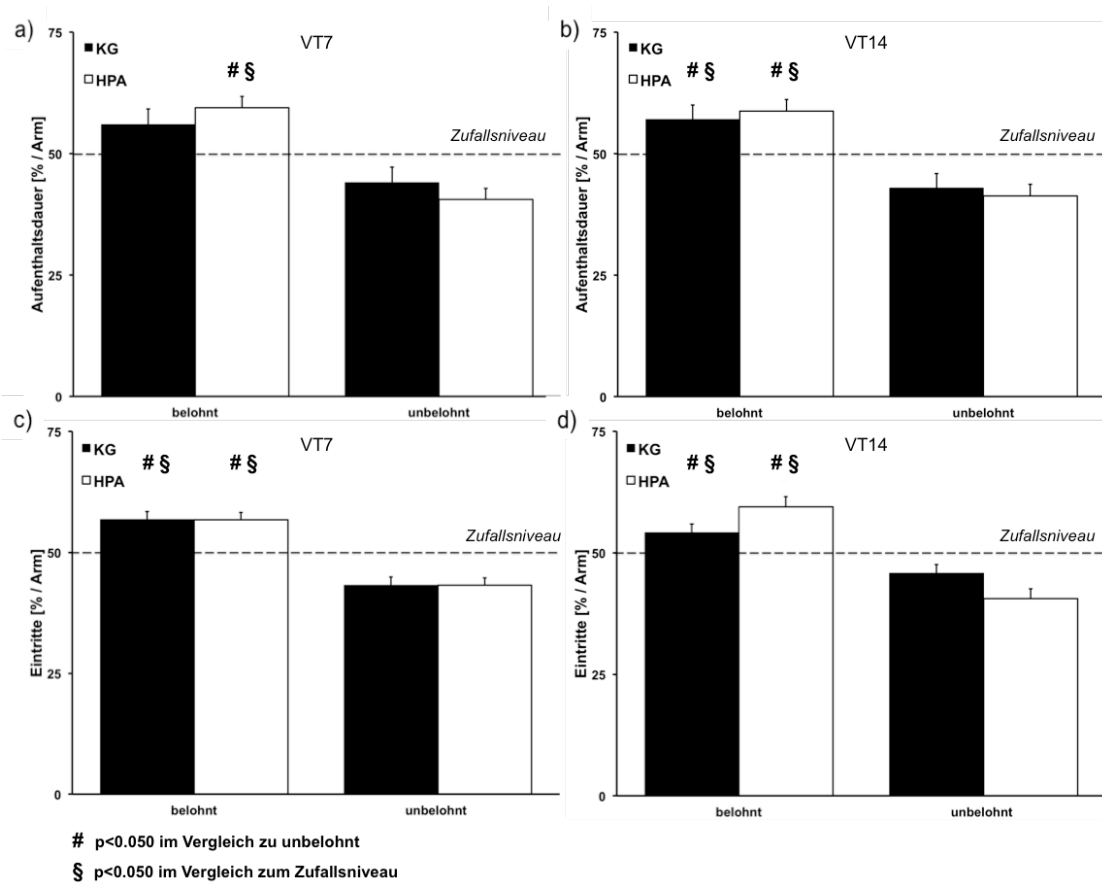
#### 4.1.3.1 Aufenthaltsdauer in belohnten Armen

Die Aufenthaltsdauer der Tiere in belohnten und unbelohnten Armen war in beiden Gruppen tendenziell ähnlich. So verbrachte die KG an VT7  $56\% \pm 3,2$  in belohnten und  $44\% \pm 3,2$  ihrer Zeit im radialen Acht-Arm-Labyrinth in unbelohnten Armen ( $T_{17}=1,874$ ;  $p=0,078$ ). Auch die Tiere der HPA-Gruppe hielten sich an VT7 signifikant länger in belohnten Armen auf (Belohnt:  $59,46\% \pm 2,3$ ; Unbelohnt:  $40,54\% \pm 2,3$ ;  $T_{17}=4,124$ ;  $p=0,001$ ). Die Aufenthaltszeit in belohnten oder unbelohnten Armen unterschied sich an VT7 in der KG im Gegensatz zur HPA-Gruppe nicht von der Zufallsrate von 50% (KG:  $T_{19}=1,874$ ;  $p=0,087$  bzw. HPA:  $T_{17}=4,124$ ;  $p=0,001$ ). An VT14 betrug die prozentuale Armaufenthaltsdauer der Tiere der KG bzw. der HPA-Gruppe in belohnten Armen  $57,05\% \pm 2,94$  bzw.  $58,73\% \pm 2,4$  und  $42,95\% \pm 2,94$  bzw.  $41,27\% \pm 2,4$  in unbelohnten Armen. Dieser Unterschied war in beiden Gruppen signifikant zugunsten der belohnten Arme (KG:  $T_{19}=2,392$ ;  $p=0,027$  bzw. HPA:  $T_{17}=3,642$ ;  $p=0,002$ ). An VT14 unterschieden sich beide Gruppen vom Zufallsniveau (KG:  $T_{19}=2,392$ ;  $p=0,027$  bzw. HPA:  $T_{17}=3,642$ ;  $p=0,002$ ).

#### 4.1.3.2 Armeintritte in belohnte Arme

Sowohl die KG als auch die HPA-Gruppe besuchten die belohnten Arme an VT7 gleich oft. So betraten Tiere der KG zu  $56,77\% \pm 1,70$  und Tiere der HPA-Gruppe zu  $56,75\% \pm 1,51$  belohnte Arme. Die unbelohnten Arme wurden dementsprechend zu  $43,23\% \pm 1,70$  von der KG bzw. zu  $43,25\% \pm 1,51$  von der HPA-Gruppe betreten. An VT14 betrugen die prozentualen Armeintritte in belohnte Arme  $54,17\% \pm 1,75$  in der KG und  $59,45\% \pm 2,10$  in der HPA-Gruppe. Unbelohnte Arme wurden folglich zu  $48,83\% \pm 1,80$  von Tieren der KG und zu  $40,55\% \pm 2,10$  von Tieren der HPA-Gruppe betreten. Beide Gruppen besuchten sowohl an VT7 als auch an VT14 signifikant häufiger belohnte Arme (VT7: KG:  $T_{19}=4$ ;  $p=0,001$ ; HPA:  $T_{17}=4,46$ ;  $p<0,001$ ; VT14: KG:  $T_{19}=2,38$ ;  $p=0,028$ ; HPA:  $T_{17}=4,58$ ;  $p<0,001$ ). Der Vergleich gegen das Zufallsniveau von 50% zeigte für

die KG und die HPA-Gruppe statistische Signifikanz ( $T_{19}=3,998$ ;  $p=0,001$  bzw.  $T_{17}=4,456$ ;  $p<0,001$ ).



**Abbildung 10: Probe Trial Auswertung der Aufenthaltsdauer und Armeintritte:** a) Aufenthaltsdauer in den Armen an VT7 b) Aufenthaltsdauer in den Armen an VT14 c) Armeintritte an VT7 d) Armeintritte an VT14

Gezeigt sind die prozentuale Aufenthaltsdauer und Armeintritte in belohnte und unbelohnte Arme während des Probe Trials an VT7 und VT14. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Zufallsniveau von 50%. Gruppengrößen: KG:  $n=20$ , HPA:  $n=18$ .

#### 4.1.3.3 Auswertung nach Belohnungsstärke – Aufenthaltsdauer

Die Aufenthaltsdauer der Tiere beider Gruppen in unterschiedlich stark belohnten Armen des radialen Labyrinths zeigte in beiden Gruppen ein ähnliches Muster zugunsten stark belohnter Arme ( $F_{1,2}=29,827$ ;  $p<0,001$ ; Abbildung 11a,b). An VT7 hielten sich die Tiere am längsten im mit sechs Pellets belohnten Arm (6Pel) (KG:  $43,39s \pm 5,51$ ; HPA:  $48,51s \pm 4,11$ ), am

zweitlängsten in mit einem Pellet belohnten Armen (1Pel) (KG: 31,64s  $\pm$  2,42; HPA: 32,8s  $\pm$  2,08) und am kürzesten in unbelohnten Armen (0Pel) (KG: 27,13s  $\pm$  1,9; HPA: 26,43s  $\pm$  1,84) auf. In der KG zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Aufenthaltsdauer in dem stark belohnten Arm und den unbelohnten Armen, wobei sich die Aufenthaltsdauer in schwach belohnten Armen nicht signifikant von jener in unbelohnten und stark belohnten Armen unterschied (6Pel vs. 1Pel:  $T_{19}=1,971$ ;  $p=0,065$ ; 6Pel vs. 0Pel:  $T_{19}=2,351$ ;  $p=0,031$ ; 1Pel vs. 0Pel:  $T_{19}=1,218$ ;  $p=0,24$ ). In der HPA-Gruppe war die Aufenthaltsdauer der Tiere in den unterschiedlich stark belohnten Armen stets signifikant verschieden (6Pel vs. 1Pel:  $T_{17}=2,981$ ;  $p=0,008$ ; 6Pel vs. 0Pel:  $T_{17}=4,61$ ;  $p<0,001$ ; 1Pel vs. 0Pel:  $T_{17}=2,208$ ;  $p=0,041$ ).

An VT14 verhielten sich die Tiere nach einem ähnlichen Schema zugunsten stark belohnter Arme ( $F_{1,1,437}=14,129$ ;  $p<0,001$ ). Die maximale Aufenthaltsdauer hatten beide Gruppen demnach in dem stark belohnten Arm (KG: 61,77s  $\pm$  5,35, HPA: 51, 92s  $\pm$  4,17). Danach folgten die schwach belohnten Arme (KG: 28,31s  $\pm$  4,1, HPA: 31,65  $\pm$  2,53) und mit der kürzesten Verweildauer die unbelohnten Arme (KG: 28,79s  $\pm$  1,89, HPA: 27,41s  $\pm$  1,63). In beiden Gruppen wurde der stark belohnte Arm häufiger besucht als schwach belohnte (6Pel vs. 1Pel: KG:  $T_{19}=4,523$ ;  $p<0,001$ , HPA:  $T_{17}=4,047$ ;  $p=0,001$ ) und unbelohnte Arme (6Pel vs. 0Pel: KG:  $T_{19}=5,124$ ;  $p<0,001$ , HPA:  $T_{19}=4,804$ ;  $p<0,001$ ). Weder in der KG noch in der HPA-Gruppe ließ sich ein Unterschied zwischen der Aufenthaltsdauer in schwach belohnten und unbelohnten Armen finden (1Pel vs. 0Pel: KG:  $T_{19}=-0,094$ ;  $p=0,926$ ; HPA:  $T_{17}=1,15$ ;  $p=0,266$ ).

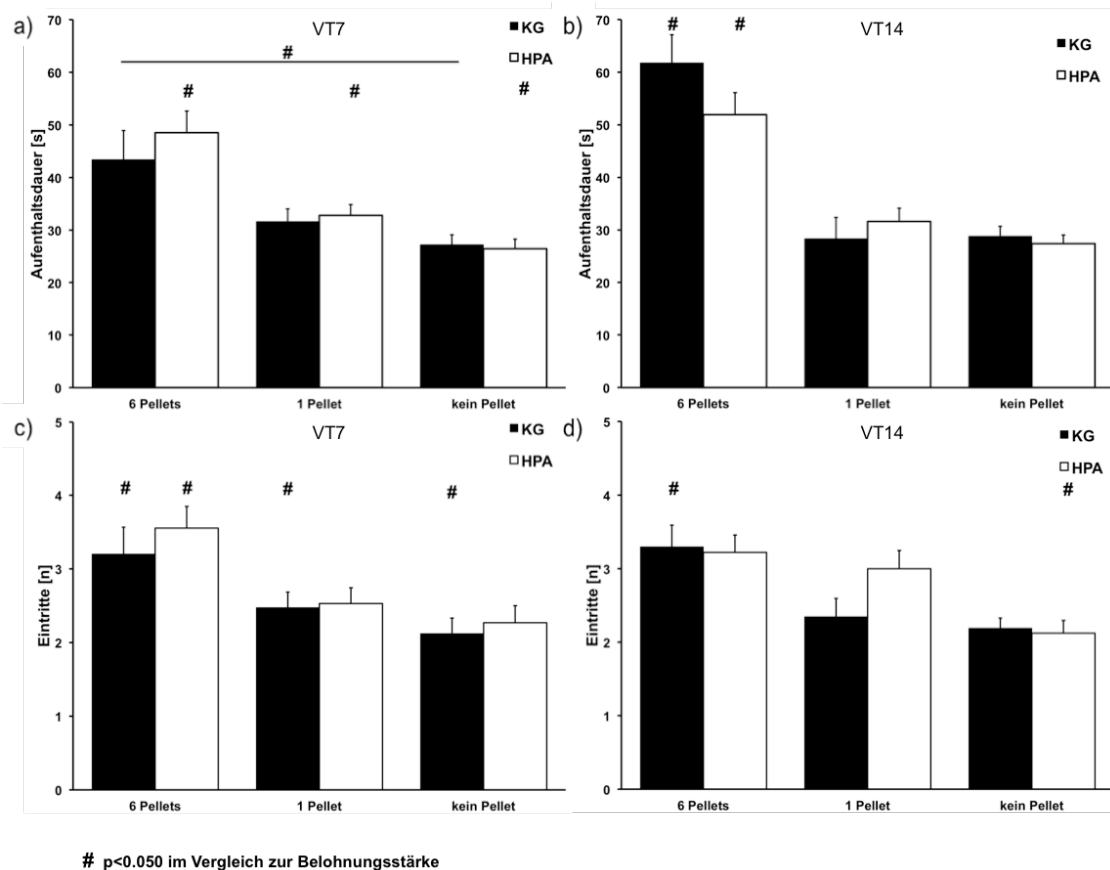
#### 4.1.3.4 Auswertung nach Belohnungsstärke – Armeintritte

Auch die Armeintritte der Tiere beider Gruppen in unterschiedlich stark belohnten Armen des radialen Labyrinths zeigte in beiden Gruppen ein ähnliches Muster zugunsten stark belohnter Arme (VT7:  $F_{1,1,33}=20,727$ ;  $p<0,001$ , VT14:  $F_{1,2}=11,107$ ;  $p<0,001$ ; Abbildung 11c,d). An VT7 betraten die KG-Tiere im Schnitt 3,2  $\pm$  0,37 Mal den stark belohnten Arm, 2,47  $\pm$  0,21 Mal schwach belohnte Arme und 2,12  $\pm$  0,21 Mal unbelohnte Arme. Bei den HPA-Tieren zeigte sich mit 3,6  $\pm$  0,3 bzw. 2,53  $\pm$  0,22 bzw. 2,27  $\pm$  0,23 Eintritten ein ähnliches Muster. Die Häufigkeit der Armbesuche unterschieden sich in der KG stets signifikant voneinander (6Pel vs. 1Pel:  $T_{19}=2,137$ ;  $p=0,046$ ; 6Pel vs. 0Pel:  $T_{19}=3,176$ ;  $p=0,005$ ; 1Pel vs. 0Pel:  $T_{19}=2,652$ ;  $p=0,016$ ). Die Tiere der HPA-



Gruppe besuchten den stark belohnten Arm signifikant häufiger als den schwach belohnten und den unbelohnten Arm während die schwach belohnten Arme nicht signifikant häufiger besucht wurden als die unbelohnten Arme (6Pel vs. 1Pel:  $T_{17}=4,099$ ;  $p=0,001$ ; 6Pel vs. 0Pel:  $T_{17}=5,524$ ;  $p<0,001$ ; 1Pel vs. 0Pel:  $T_{17}=1,78$ ;  $p=0,093$ ).

An VT14 wurde der stark belohnte Arm von der KG mit  $3,3 \pm 0,29$  häufiger als schwach belohnte Arme mit  $2,35 \pm 0,25$  und unbelohnte Arme mit  $2,19 \pm 0,13$  betreten. Die KG besuchte somit schwach belohnte und unbelohnte Arme signifikant seltener als den stark belohnten Arm während die schwach belohnten Arme nicht signifikant häufiger besucht wurden als die unbelohnten Arme (6Pel vs. 1Pel:  $T_{19}=2,661$ ;  $p=0,015$ ; 6Pel vs. 0Pel:  $T_{19}=3,561$ ;  $p=0,002$ ; 1Pel vs. 0Pel:  $T_{19}=0,506$ ;  $p=0,618$ ). Die HPA-Gruppe zeigte mit  $3,22 \pm 0,24$  in stark belohnte Arme und  $3 \pm 0,25$  Armeintritten in schwach belohnte und  $2,12 \pm 0,17$  Armeintritten in unbelohnte Arme eine ähnliche Tendenz. Der stark belohnte Arm wurde in dieser Gruppe nicht signifikanter häufiger als die schwach belohnten, jedoch häufiger als unbelohnte Arme besucht, während schwach belohnte Arme im Gegensatz zur KG signifikant häufiger als unbelohnte Arme besucht wurden (6Pel vs. 1Pel:  $T_{17}=0,827$ ;  $p=0,42$ ; 6Pel vs. 0Pel:  $T_{17}=3,705$ ;  $p=0,002$  1Pel vs. 0Pel:  $T_{17}=2,501$ ;  $p=0,023$ ).



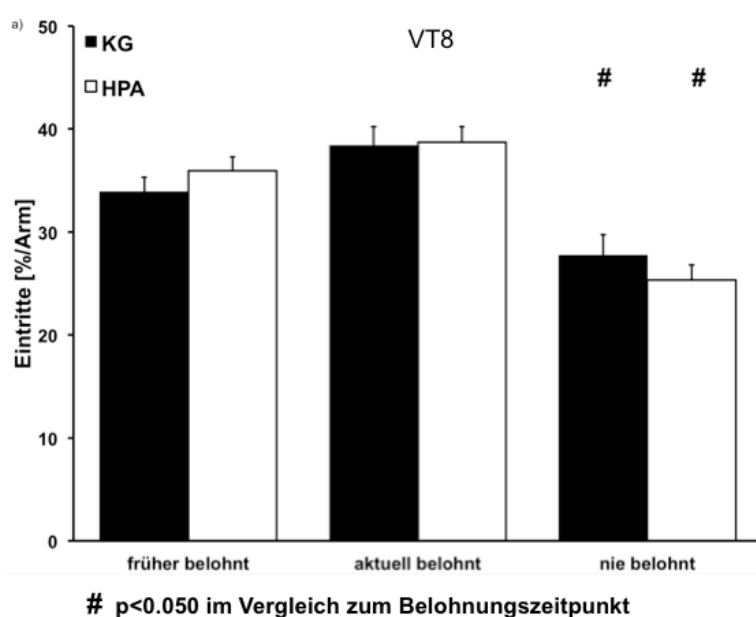
**Abbildung 11: Probe Trial Auswertung nach der Belohnungsstärke: a) Aufenthaltsdauer an VT7 b) Aufenthaltsdauer an VT 14 c) Armeintritte an VT7 d) Armeintritte an VT14**

Gezeigt ist die Aufenthaltsdauer in Sekunden und die Anzahl der Armeintritte in Bezug auf die Belohnungsstärke der belohnten Arme (6, 1 oder kein Pellet) an VT7 und VT14. Gruppengrößen: KG: n=20, HPA: n=18.

#### 4.1.4 Das Umlernverhalten

Da sich an VT8 das Belohnungsschema änderte, erfolgte an VT8 die Auswertung der Armeintritte in früher belohnte (VT1-7), aktuell belohnte (ab VT8) und zu keiner Zeit belohnte Arme. Die Versuchstiere der HPA-Gruppe zeigten ein ähnliches Verhalten, wie die Tiere der KG zugunsten aktuell und früher belohnter Arme ( $F_{1,2}=19,223$ ;  $p<0,001$ , Abbildung 12). Der prozentuale Anteil der aktuell belohnten Arme an den Gesamteintritten war mit  $38,36\% \pm 1,87$  in der KG und  $38,73\% \pm 1,5$  in der HPA-Gruppe nahezu identisch. Früher belohnte Arme wurde von der KG zu  $33,90\% \pm 1,41$  und von der HPA-Gruppe zu  $35,96\% \pm 1,35$  betreten. Die wenigsten Armeintritte fanden bei beiden

Gruppen in Arme statt, welche zu keiner Zeit eine Futterpille enthielten (KG: 27,73%  $\pm$  2,01; HPA: 25,31%  $\pm$  1,49). Beide Kohorten besuchten früher belohnte Arme signifikant häufiger als nie belohnte Arme (KG:  $T_{19}=2,105$ ;  $p=0,049$ , HPA:  $T_{17}=4,387$ ;  $p<0,001$ ). Auch aktuell belohnte Arme wurden von beiden Gruppen häufiger besucht als nie belohnte Arme (KG:  $T_{19}=-2,931$ ;  $p=0,009$ , HPA:  $T_{17}=-5,031$ ;  $p<0,001$ ). Zwischen der Anzahl der Armeintritte in früher und in aktuell belohnte Arme bestand in beiden Gruppen kein Unterschied (KG:  $T_{19}=-1,687$ ;  $p=0,108$ , HPA:  $T_{17}=-1,14$ ;  $p=0,27$ ).



**Abbildung 12: Armeintritte in früher belohnte, aktuell belohnte und nie belohnte Arme**

Gezeigt sind die Armeintritte pro Arm in früher belohnte Arme (VT1-7), aktuell belohnte Arme (ab VT8) und nie belohnte Arme an VT8. Gruppengrößen: KG:  $n=20$ , HPA:  $n=18$ .

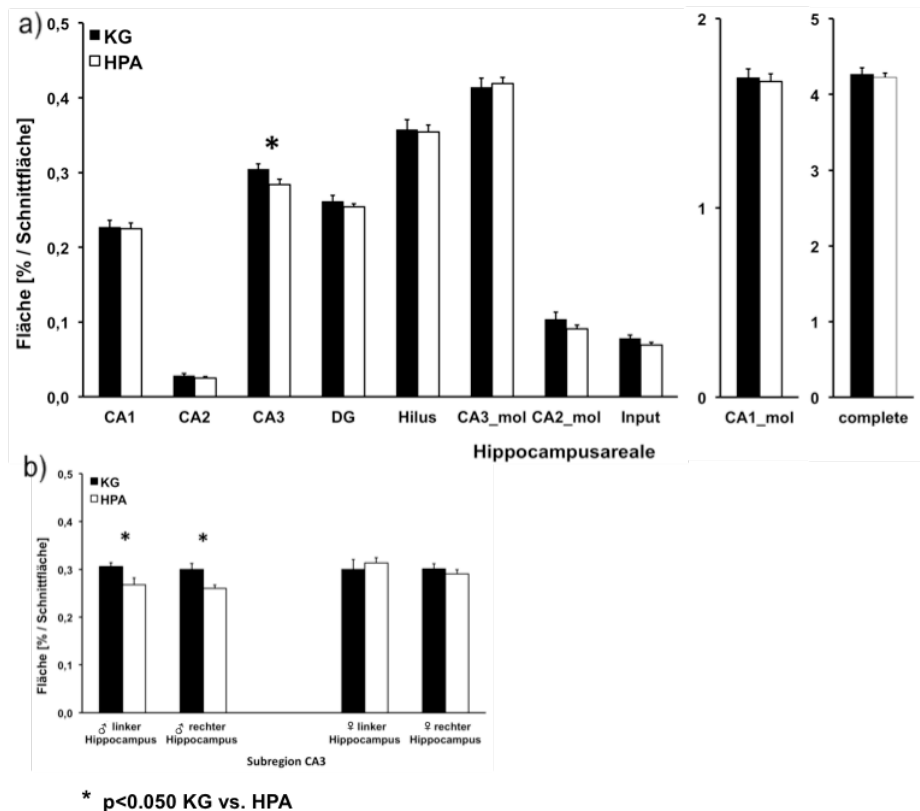
## 4.2 Morphologische Auswertung

### 4.2.1 Vergleich der Hirngröße zwischen den Zeitpunkten der Hirnentnahme

Die morphologischen Daten basieren auf Gehirnen, die zu zwei verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden. Zunächst erfolgte an PND 39 die Hirnentnahme bei 20 Tieren der KG ( $\text{♂}=10$ ,  $\text{♀}=10$ ) und 18 Tieren der HPA-Gruppe ( $\text{♂}=8$ ,  $\text{♀}=10$ ). Die Entnahme der übrigen Gehirne erfolgte zwischen PND  $118\pm 2$  und  $194\pm 2$ , nachdem die Versuchstiere am Lern-/Umlernversuch teilgenommen hatten. Auch hier lag die Gruppengröße bei 20 Tieren in der KG ( $\text{♂}=10$ ,  $\text{♀}=10$ ) und 18 Tieren in der HPA-Gruppe ( $\text{♂}=8$ ,  $\text{♀}=10$ ). Die durchschnittliche Größe der Gesamtschnittfläche eines Rattenhirnes an PND 39 betrug  $91,31\text{mm}^2$  und zum zweiten Entnahmezeitpunkt (PND  $118\pm 2$  bis  $194\pm 2$ )  $94,98\text{mm}^2$ . Das Gehirn wuchs im Rahmen der, zum ersten Entnahmezeitpunkts noch nicht vollständig abgeschlossenen, Hirnentwicklung weiter ( $T_{74}=-2,944$ ;  $p=0,004$ ). Weder zum ersten noch zum zweiten Zeitpunkt der Hirnentnahme zeigte sich ein Unterschied der Hirngröße zwischen KG und HPA-Gruppe (beide  $p>0,05$ ).

### 4.2.2 Größe der hippocampalen Subregionen bei Hirnentnahme an PND 39

Die Versuchstiere, deren Gehirne bereits an PND 39 entnommen wurden, nahmen nicht am Lern-/Umlernversuch teil. In dieser Gruppe zeigte sich die Subregion CA3 in der KG mit  $0,30\% \pm 0,01$  gegenüber der HPA-Gruppe mit  $0,28\% \pm 0,01$  der Gesamtschnittfläche signifikant vergrößert ( $T_{36}=2,079$ ;  $p=0,045$ ; Abbildung 13a). Dieser Effekt schien vor allem durch die männlichen Versuchstiere verursacht zu sein, da die Subregion CA3 bei männlichen Ratten sowohl im rechten Hippocampus (KG:  $0,3\% \pm 0,01$  bzw. HPA:  $0,26\% \pm 0,01$ ;  $T_{16}=2,587$ ;  $p=0,02$ ) als auch im linken Hippocampus (KG:  $0,31\% \pm 0,01$  bzw. HPA:  $0,27\% \pm 0,01$ ;  $T_{16}=2,491$ ;  $p=0,024$ ) signifikante Größenunterschiede zeigte. Konträr hierzu wies die Subregion CA3 bei den Weibchen weder im rechten noch im linken Hippocampus signifikante Größenunterschiede auf (Abbildung 13b).



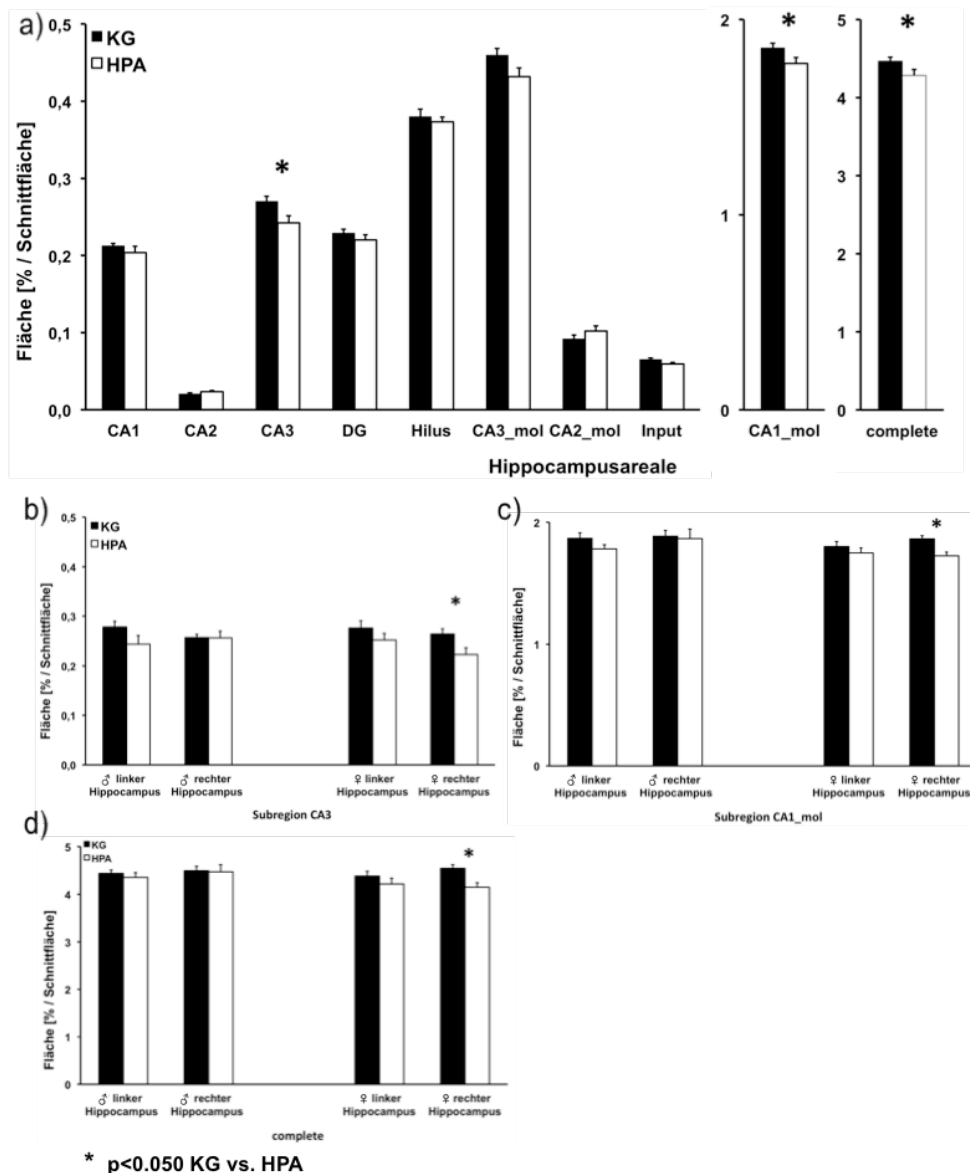
**Abbildung 13: Hippocampus nach Hirnentnahme an PND 39: a) Größe der hippocampalen Subregionen b) Größe der Subregion CA3**

Die Größe der einzelnen hippocampalen Subregionen wurde über Geschlecht und Hemisphäre gemittelt. Die Größe der Subregion CA3 wurde nach Geschlecht und Hemisphäre getrennt dargestellt. Die Größenangaben sind im Verhältnis zur Gesamtschnittfläche des Hirnpräparates angegeben. Gruppengrößen: KG:  $n=20$ , ♂=10, ♀=10; HPA:  $n=18$ , ♂=8, ♀=10.

#### 4.2.3 Größe der hippocampalen Subregionen bei Hirnentnahme im Anschluss an die Teilnahme am Lern-/Umlernversuch

Zunächst wurden auch hier die Messergebnisse gemittelt für rechten und linken Hippocampus und die Geschlechter betrachtet (Abbildung 14a). In der KG war die Fläche des Areals CA3 mit  $0,27\% \pm 0,01$  gegenüber der HPA-Gruppe mit  $0,24\% \pm 0,01$  der Gesamtschnittfläche signifikant vergrößert ( $T_{36}=2,518$ ;  $p=0,016$ ). Die Subregion CA1\_mol machte in der KG  $1,86\% \pm 0,02$  und in der HPA-Gruppe  $1,78\% \pm 0,03$  von der Schnittfläche aus und zeigte sich somit signifikant größer ( $T_{36}=2,112$ ;  $p=0,042$ ). Zudem war die Gesamtfläche des Hippocampus (=complete) in der KG mit einem Anteil von  $4,47\% \pm 0,051$  im

Gegensatz zur HPA-Gruppe mit einem Anteil von  $4,29\% \pm 0,08$  der Gesamtschnittfläche vergrößert ( $T_{36}=0,079$ ;  $p=0,049$ ). Im Anschluss wurde untersucht, welche Faktoren maßgeblich an den gefundenen Veränderungen beteiligt gewesen sind. Hierbei stellte sich in der geschlechterspezifischen und nach Hemisphären getrennten Analyse heraus, dass die Größenunterschiede im rechten Hippocampus der weiblichen Versuchstiere zu verorten waren (Abbildung 14b-d). Es zeigten sich signifikant vergrößerte Flächen bei den Kontrolltieren im Vergleich zur HPA-Gruppe in den Subregionen CA3 (KG:  $0,26\% \pm 0,01$ ; HPA:  $0,22\% \pm 0,01$ ;  $T_{18}=2,374$ ;  $p=0,029$ ), CA1\_mol (KG:  $1,86\% \pm 0,02$ ; HPA:  $1,73\% \pm 0,03$ ;  $T_{18}=3,506$ ;  $p=0,003$ ) und der Gesamtfläche des Hippocampus (KG:  $4,54\% \pm 0,08$ ; HPA:  $4,15\% \pm 0,10\%$ ;  $T_{18}=3,188$ ;  $p=0,005$ ).



**Abbildung 14: Hippocampus bei Hirnentnahme nach Teilnahme am Lern-/Umlernversuch zwischen PND 118±2 und PND 194±2: a) Größe der einzelnen hippocampalen Subregionen b) Größe der Subregion CA3 c) Größe der Subregion CA1\_mol d) Größe der Gesamtfläche des linken und rechten Hippocampus**

Die Größe der einzelnen hippocampalen Subregionen wurde über Geschlecht und Hemisphäre gemittelt. Die Größe der Subregionen CA3, CA1\_mol und der Gesamtfläche des Hippocampus wurde nach Geschlecht und Hemisphäre getrennt dargestellt. Die Größenangaben sind im Verhältnis zur Gesamtschnittfläche des Hirnpräparates angegeben. Gruppengrößen: KG:  $n=20$ , ♂=10, ♀=10; HPA:  $n=18$ , ♂=8, ♀=10.

## 5. Diskussion

### 5.1 Effekte auf Lern- und Umlernverhalten

Die durchgeführten Verhaltenstests dienten dazu die Auswirkungen des hohen paternalen Alters auf das Lern- und Umlernverhalten der Versuchstiere zu untersuchen. Eine grundsätzliche Bedingung um aufgabenspezifische Einschränkungen zu beurteilen ist in diesem Kontext die Voraussetzung, dass die Tiere gelernt haben und somit ein Lernprozess stattgefunden hat. Um die Funktionalität des eingesetzten Verfahrens zu verifizieren, sollte dieser Lernprozess zumindest bei den Tieren der KG vorhanden sein. Grundlegend für den Lernprozess spricht, dass sich die Aufenthaltszeit der Ratten der KG und der HPA-Gruppe im Labyrinth, einhergehend mit einer Reduktion der Armeintritte, im Versuchsverlauf verringerte. Zudem reduzierte sich die Fehlerrate der Versuchstiere über die Versuchstage hinweg von VT1 bis VT14. Diese Zeitspanne lässt sich durch die Änderung des Belohnungsschemas an VT8 in eine Lernphase (VT1-7) und eine Umlernphase (VT8-14) untergliedern. Einhergehend mit dieser Unterteilung kann der Lernprozess durch ein Abfallen der Fehlerrate in der Lernphase und einem Anstieg bei Veränderung der Konfiguration an VT8, gefolgt von einer abermals sinkenden Fehlerrate in der Umlernphase abgebildet werden. Darüber hinaus besitzen die Tiere beider Gruppen trotz minimaler gruppeninterner Unterschiede eindeutig die Fähigkeit entsprechende Arme in Abhängigkeit von der Belohnungsstärke zu besuchen. Folglich sind die Tiere nicht nur in der Lage zwischen belohnt und unbelohnt zu unterscheiden, sondern die Arme auch noch nach unterschiedlichen Belohnungsstärken zu differenzieren. Des Weiteren ist das überzufällige Aufsuchen der belohnten Arme ein Indiz für zielgerichtetes Verhalten und weist ebenfalls darauf hin, dass die Versuchstiere die Aufgaben gelernt haben. Lediglich die Aufenthaltsdauer der KG-Tiere an VT7 entsprach dem Zufallsprinzip. Die gleichzeitig ermittelten Armeintritte zeigten jedoch ein zielgerichtetes Verhalten und relativieren somit diesen Befund.

Mithilfe dieses Versuchs ließ sich in der vorliegenden Studie bei Tieren der HPA-Gruppe kein Defizit des Arbeitsgedächtnisses nachweisen. Ein defizitäres Arbeitsgedächtnis wäre im Rahmen einer Störung der Exekutivfunktionen zu sehen und ist vermehrt bei neurobiologischen, mit HPA assoziierten, Entwicklungsstörungen wie ASS oder auch ADHS zu finden (Corbett *et al.*,



2008; D'Onofrio *et al.*, 2014; Forbes *et al.*, 2009). Die Studienlage zur Assoziation zwischen ASS und einem defizitären Arbeitsgedächtnis ist jedoch uneinheitlich (Bennetto *et al.*, 1996; Corbett *et al.*, 2008; Lotter, 1966; Russell *et al.*, 1996). Der Zusammenhang zwischen defizitärem Arbeitsgedächtnis und dem Auftreten von ASS muss demnach kritisch betrachtet werden. Daher lässt sich der Umkehrschluss, also der Ausschluss von ASS durch ein uneingeschränkt arbeitendes Arbeitsgedächtnis, nicht treffen. Darüber hinaus konnte in Studien vielfach gezeigt werden, dass ASS gehäuft mit Störungen des Referenzgedächtnisses einhergehen. Diese Einschränkungen sind vornehmlich im deklarativen episodischen Gedächtnis zu verorten (Boucher, 1981; Boucher und Lewis, 1989; Southwick *et al.*, 2011). Die in der vorliegenden Studie gefundenen dezente Einschränkungen des Referenzgedächtnisses in der HPA-Gruppe lassen sich somit mit ASS assoziieren. Doch sind diese Befunde vorsichtig zu interpretieren, da einige Studien keine Belege für ein eingeschränktes Langzeitgedächtnis im Zusammenhang mit hochfunktionalen ASS finden konnten (Minschew und Goldstein, 1993; Renner *et al.*, 2000). Interessanterweise zeigten die Tiere der HPA-Gruppe ausschließlich in der Umlernphase ein im Vergleich zur KG defizitäres Referenzgedächtnis. Da diese Beeinträchtigungen während der Umlernphase auftraten, lässt sich eine Assoziation zu perseverierendem Verhalten, dem Festhalten an Routinen, als weiteres Kernsymptom von ASS herstellen. Diese Interpretation ist jedoch kritisch zu betrachten, da die HPA Tiere in einem spezifischen Test zur Detektion von perseverierendem Verhalten keine diesbezüglichen Auffälligkeiten zeigten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Lernphase lediglich dezente Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der HPA-Gruppe gefunden werden konnten. Alle Tiere zeigten sich lernfähig und wurden schneller in der Durchführung der Aufgaben. Folglich sank in beiden Gruppen die Aufenthaltszeit im Labyrinth und die Anzahl der Armeintritte im generellen, sowie die Aufenthaltszeit und die Armeintritte in unbelohnten Armen im Probe Trial im speziellen. Es liegen demzufolge keine Hinweise für eine Beeinträchtigung des räumlichen Gedächtnisses vor. Die HPA-Tiere zeigten analog zu den Tieren der Kontrollgruppe eine stetige Verminderung der meisten erhobenen Fehlertypen und ließen dadurch keine Rückschlüsse auf ein im

Gegensatz zur KG defizitäres Arbeitsgedächtnis zu. Das hohe paternale Alter führte jedoch zu kognitiven Einschränkungen im Sinne einer dezenten Beeinträchtigung des Referenzgedächtnisses in der Umlernphase. Somit lässt sich eine Assoziation zu perseverierendem Verhalten herstellen. Im Test auf perseverierendes Verhalten zeigten sich demgegenüber keine Auffälligkeiten in der HPA-Gruppe. In Zusammenschau dieser Ergebnisse lassen sich die Hypothesen 1 und 2 nur in Teilen bestätigen.

## **5.2 Effekte auf die Hippocampusmorphologie**

Das hohe väterliche Alter beeinflusst die Hippocampusmorphologie und führt zu einer Reduktion der Subregionen CA1\_mol und CA3 sowie der Gesamtfläche des Hippocampus.

Den stärksten Einfluss scheint das hohe väterliche Alter auf die Subregion CA3 zu haben, da sich diese auch ohne Teilnahme am Lern-/Umlernversuch verkleinert zeigte. Versuchstiere, die am Lern-/Umlernversuch teilnahmen, wiesen, zusätzlich zur Größenreduktion der Subregion CA3, eine Größenreduktion der Subregion CA1\_mol und der Gesamtfläche des Hippocampus auf. Der Lern-/Umlernversuch hat vornehmlich Hippocampusfunktionen, wie räumliche Orientierung, das räumliche Gedächtnis und das räumliche Arbeitsgedächtnis getestet. Humanstudien zeigen, dass eine starke Beanspruchung des räumlichen Gedächtnisses zu einer Vergrößerung des Hippocampus führt (Hartley und Harlow, 2012; Maguire *et al.*, 2000). Bezieht man diese Ergebnisse aus Humanstudien auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie, so ist auffällig, dass sich bei den HPA-Tieren im Gegensatz zu den KG-Tieren eine verkleinerte Fläche zeigte und es kann vermutet werden, dass ein möglicher Wachstum bei der Experimentalgruppe nur vermindert stattgefunden hat.

Da der Versuch zudem zu einem Zeitpunkt stattfand, zu welchem das Gehirn noch nicht vollständig ausgereift war, ist es denkbar, dass der Versuch im Sinne eines Stressors in den Reifungsprozess eingegriffen hat. Interessanterweise konnte in verschiedene Studien gezeigt werden, dass Stress sowohl bei humanen Probanden als auch im Tiermodell zu einem kleineren Hippocampusvolumen führt (Douglas, 1995; Lee und Kesner, 2003; Lee *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2016). Zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie passend, konnten einige Studien zeigen, dass Stress eine Atrophie von

Dendriten im Areal CA3 und eine Volumenreduktion des rechten Hippocampus und der Subregion CA1 verursacht (Conrad *et al.*, 1999; Donohue *et al.*, 2006; Douglas, 1995).

Alternativ könnten die Hippocampusalterationen, unabhängig vom Lern-/Umlernversuch, erst in erhöhtem Alter im ausgereiften Gehirn auftreten. Zwischen beiden Hirnentnahmen lagen im Durchschnitt 98,5 Tage. Hier ist jedoch anzuführen, dass sich weder zum ersten noch zum zweiten Zeitpunkt der Hirnentnahme ein Unterschied der Hirngröße (Gesamtschnittfläche der Hirnpräparate) zwischen KG und HPA-Gruppe zeigte. Darüber hinaus scheint sich der Lern-/Umlernversuch geschlechtsspezifisch auszuwirken. Im Anschluss an den Versuch zeigte sich lediglich der Hippocampus der Weibchen verkleinert, während bei den Tieren, welche den Versuch nicht absolvierten, ausschließlich der rechte Hippocampus der Männchen betroffen war.

Die veränderte Hippocampusgröße ist auch in Anbetracht der Assoziation zwischen HPA und ASS von besonderem Interesse. Prinzipiell scheinen ASS in einem Zusammenhang mit einer aberranten Hippocampusmorphologie zu stehen (Nicolson *et al.*, 2006; Schumann *et al.*, 2004; Sparks *et al.*, 2002). Einige wenige Studien fanden hingegen keine Veränderungen des Hippocampus (Haznedar *et al.*, 2000; Piven *et al.*, 1998). So lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit, verkleinerten Subregionen und Gesamtfläche, in verschiedene Studien einreihen, welche eine Assoziation zwischen ASS und einem verminderten Hippocampusvolumen zeigen (Aylward *et al.*, 1999; Howard *et al.*, 2000; Saitoh *et al.*, 2001). Auch die Schizophrenie, als weitere mit HPA assoziierte neuropsychiatrische Erkrankung, führt zu einem verminderten Hippocampusvolumen (Nelson *et al.*, 1998). Des Weiteren zeigten Krug *et al.* (2014) eine Beeinflussung des Hippocampus im Sinne eines linearen Zusammenhangs zwischen hohem väterlichen Alter, schizotypen Verhalten, Neurotizismus und dem Hippocampusvolumen. Der Fund eines verkleinerten Hippocampus bzw. verkleinerter hippocampaler Subregionen durch erhöhtes väterliches Alter, ist von besonderem Interesse in der Erforschung des Zusammenhangs zwischen HPA und dem Auftreten neuropsychiatrischer Erkrankungen wie ASS und Schizophrenie.

Aus vorher erläuterten Befunden lässt sich schließen, dass erhöhtes paternales Alter zu einer veränderten Hippocampusmorphologie führt. Der Lern-/

Umlernversuch scheint hierbei die Rolle eines verstärkenden Faktors zu spielen. Demzufolge lässt sich die Hypothese 3 bestätigen.

### **5.3 Konklusion aus den Ergebnissen zu Lernverhalten und Hippocampusmorphologie**

In der vorliegenden Studie konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass erhöhtes paternales Alter einen Risikofaktor für dezente kognitive Einschränkungen darstellt und zudem zu einer veränderten Hippocampusmorphologie führt. Interessanterweise führte die veränderte Morphologie lediglich zu sehr leichten kognitiven Einschränkungen. Funktionseinschränkungen des Hippocampus hätten jedoch zu weitaus umfangreicheren Beeinträchtigungen führen können. So wäre ein defizitäres Arbeitsgedächtnis (Axmacher *et al.*, 2007; Ranganath und D'Esposito, 2001) und eine Beeinträchtigungen des Langzeitgedächtnisses zu erwarten gewesen (Eichenbaum, 2000; Nadel und Moscovitch, 1997). Darüber hinaus ist der Hippocampus von zentraler Bedeutung für die räumliche Orientierung und das räumliche Gedächtnis (O'Keefe, 1976; O'Keefe und Dostrovsky, 1971; O'Keefe und Nadel, 1978; Olton und Paras, 1979). So scheinen Hippocampusläsionen mit perseverierendem Verhalten assoziiert zu sein (Ellen und Wilson, 1963). Die Studienlage, inwiefern eine abnormale Hippocampusmorphologie bei ASS mit Einschränkungen des episodischen Gedächtnisses korreliert, ist hingegen uneinheitlich (Goh und Peterson, 2012; Salmond *et al.*, 2005).

Das Arbeitsgedächtnis, das Langzeitgedächtnis, die räumliche Orientierung und auch das perseverierende Verhalten wurden durch den Lern-/Umlernversuch untersucht, so dass Beeinträchtigungen dieser Bereiche detektiert worden wären.

Bei näherer Betrachtung der funktionellen Aufgaben der veränderten Subregionen fällt auf, dass die Subregion CA3 bei Prozessen der räumlichen Orientierung und dem Aufbau eines räumlichen Gedächtnisses von Bedeutung ist. Des Weiteren führen Läsionen dieser Subregion zu Beeinträchtigungen im Enkodieren bzw. im täglichen Lernen räumlicher Informationen z.B. an einzelnen Versuchstagen (Jerman *et al.*, 2006). Läsionen der Subregion CA1 führen wiederum zu Einschränkungen im Abrufen von z.B. über den gesamten Versuchsablauf gewonnenen Informationen (Vago *et al.*, 2007). Ein reduziertes

Hippocampusvolumen ist außerdem mit einem schlechten Ergebnis im WCST, also perseverierendem Verhalten, assoziiert (Frodl *et al.*, 2006).

Im Rahmen der Frage nach hemisphärenspezifischer Prozesslateralisierung des Hippocampus zeigten Shipton *et al.* (2014), dass ein akutes Ausschalten der Subregion CA3 des linken Hippocampus von Mäusen mit optogenetischen Methoden zu Einschränkungen des räumlichen Langzeitgedächtnisses führte. Die äquivalente Manipulation des rechtsseitig liegenden Hippocampus blieb ohne diesen Effekt. Weitere Untersuchungen stützen diese Annahmen (Goto *et al.*, 2010). Im Gegensatz hierzu ist in Humanstudien der rechte Hippocampus bei Aufgaben zur räumlichen Orientierung verstärkt aktiviert (Motley und Kirwan, 2012). Andere Studien finden wiederum keine Beeinflussung von Aufgaben des räumlichen Gedächtnisses durch unilaterale Läsionen (Li *et al.*, 1999) bzw. keinen klaren Unterschied zwischen rechts und links (Gerlai *et al.*, 2002).

Im vorliegenden Versuch konnten jedoch keine schwerwiegenden funktionellen Ausfälle gefunden werden. Dies könnte darin begründet liegen, dass eine Größenreduktion nicht zu einem Ausfall der Subregion führt und Verkleinerungen zudem stets auf eine Hemisphäre begrenzt waren. Außerdem erfolgte der Wegfall von Funktionen höchstwahrscheinlich sukzessiv und nicht akut, so dass genügend Zeit zur Etablierung entsprechender Kompensationsmechanismen gegeben war. Hierzu passend zeigen Patienten im Anschluss an eine unilaterale Hippocampusresektion sowie Patienten mit einseitiger Hippocampusklerose Kompensationsmechanismen durch ipsilaterale Reorganisation, verstärkte kontralaterale Hippocampusaktivierung und Aktivierung neokortikaler Regionen (Finke *et al.*, 2013). In diesem Kontext wäre interessant gewesen, inwiefern die gefundenen morphologischen Veränderungen mit einer im fMRT sichtbaren veränderten Aktivierung dieser Areale einhergegangen wären und darüber hinaus zu einer Aktivierung anderer Areale geführt hätten. Zudem ließe sich anführen, dass die Subregionen CA3 und CA1 nicht genau genug getestet wurden, um spezifische Einschränkungen dieser Areale zu detektieren. Hier muss jedoch ergänzend angefügt werden, dass für die Subregion CA1, dem Hauptort für Zellkörper, kein Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen gefunden werden konnte. Eine Größenreduktion zeigte sich lediglich in der Molekularschicht, Subregion CA1\_mol. Da die Molekularschicht vornehmlich Axone und Dendriten und keine

Zellkörper enthält, könnten fehlende Ausfallerscheinungen auch hierauf zurückzuführen sein. In vielen Studien resultieren die Störungen zudem aus großflächigen Läsionen bis hin zu totalen Hippocampusausfällen. In der hiesigen Studie zeigten sich jedoch lediglich dezente Veränderungen. Darüber hinaus muss angeführt werden, dass hier nur die Fläche und nicht das Volumen, wie in MRT Studien üblich, analysiert werden konnte. Die Flächengröße wurde jedoch in Verhältnis zur Gesamtschnittfläche des Hirnpräparates gesetzt und gibt somit einen relativen Wert in Bezug auf die Hirngröße an.

Da keine schwerwiegenden Autismus-typischen Einschränkungen gefunden werden konnten, stellt sich die Frage, ob HPA als Risikofaktor für ASS ausgeschlossen werden kann. Hierzu lässt sich anführen, dass perseverierendes Verhalten und auch Gedächtnisstörungen mit ASS assoziierte Symptome darstellen. Zu den Hauptmerkmalen von ASS zählen jedoch neben perseverierenden Verhaltensmustern, Interessen und Aktivitäten vor allem Einschränkungen der sozialen Interaktion und Kommunikation. Zudem handelt es sich nach dem DSM-5 (American Psychiatric Association, 2013) um eine in der frühen Kindheit auftretende Störung. Im Rahmen dieser Dissertation konnte neben Gedächtnisstörungen lediglich der Einfluss des väterlichen Alters auf das perseverierende Verhalten als im DSM-5 (American Psychiatric Association, 2013) verankerten Teilaspekt dieses vielfältigen Krankheitsbildes untersucht werden. Die Ergebnisse können HPA als Risikofaktor für die Entstehung von perseverierendem Verhalten nicht belegen. Diese Ergebnisse schließen HPA als Risikofaktor für ASS jedoch keineswegs aus, da die Möglichkeit besteht, dass HPA zu anderen Merkmalen von ASS geführt haben könnte, welche in diesem Versuch nicht untersucht wurden. Im Einklang hiermit stände die Beobachtung, dass in anderen Tiermodellen für HPA weitere mit ASS assoziierte Symptome, wie repetitives Verhalten und soziale und kommunikative Defizite nachgewiesen werden konnten (Janecka *et al.*, 2015; Krug *et al.*, in Vorbereitung; Sampino *et al.*, 2014). In diesem Kontext wäre die Durchführung weiterer ASS spezifischer Tests interessant, um ein breiteres Spektrum an Symptomen abzudecken und den Phänotyp weiter zu analysieren. Beispielhaft sei hier die Erfassung der Ultraschallvokalisation, wie es beispielweise im *Shank1*-Mausmodell für Autismus eingesetzt wurde (Wöhr *et al.*, 2011) oder die Überprüfung der sozialen Interaktion im Dreikammertest

(Nadler *et al.*, 2004) genannt. Darüber hinaus wäre im Rahmen dieses Versuchs die morphologische Analyse von anderen mit ASS assoziierten Hirnareale, wie der Amygdala (Schumann *et al.*, 2004) und des Cerebellums (Sparks *et al.*, 2002), von Interesse.

In der Krankheitsentstehung von ASS scheinen neben HPA (Reichenberg *et al.*, 2006) vermutlich vor allem genetische Komponenten einen starken Einfluss zu haben (Bailey *et al.*, 1995; Clarke *et al.*, 2016; Gaugler *et al.*, 2014). Allerdings beschreiben einige Studien weitere Risikofaktoren, wie maternale Infektionen (Smith *et al.*, 2007), Geburtskomplikationen und ein niedriges Geburtsgewicht (Gardener *et al.*, 2011), eine medikamentöse Therapie mit Valproat oder Antidepressiva während der Schwangerschaft (Croen *et al.*, 2011; Kolozsi *et al.*, 2009) und auch Migration (Magnusson *et al.*, 2012). Welche Faktoren entscheidend dazu beitragen, dass HPA das Risiko für ASS erhöht, ist nicht abschließend geklärt. Einen möglichen zugrundeliegenden Faktor stellt neben den oben genannten Faktoren der Einfluss des Vaters auf Sozialisationsprozesse dar. Eine Stärke dieser vorgelegten Studie liegt darin, dass die Väter ausschließlich zur Zeugung eingesetzt wurden und keinerlei Kontakt zu den Nachkommen hatten. Die Aufzucht und somit ein Großteil der Umwelteinflüsse lag gänzlich bei der Mutter. Folglich kann der potentiell schädliche Einfluss alter Väter durch differente Sozialisationsprozesse als Risikofaktor ausgeschlossen werden. Auch bei anderen HPA assoziierten Erkrankungen, wie z.B. der Schizophrenie, erhöhen Umweltfaktoren, wie das Aufwachsen bzw. Leben in einer Großstadt (Pedersen und Mortensen, 2001), Migration (Cantor-Graae und Selten, 2005) und auch der Konsum psychotroper Substanzen wie Cannabis (Semple *et al.*, 2005) das Erkrankungsrisiko. Ein Vorteil des Tiermodells liegt darin, diese und andere Einflussfaktoren aus der Umwelt zu eliminieren bzw. für alle Tiere gleich zu halten. Diese Umweltfaktoren konnten durch den Versuchsaufbau somit weitestgehend ausgeschlossen werden. Ein interessanter Aspekt der weiterer Nachforschung bedarf ist, inwiefern die Exposition durch diese Faktoren in Abhängigkeit vom väterlichen Alter variiert.

Betrachtet man die verschiedenen geläufigen Erklärungsansätze für eine gesteigerte Autismusprävalenz durch hohes paternales Alter, steht die These der Neumutation im Mittelpunkt (Flatscher-Bader *et al.*, 2011; Kong *et al.*, 2012).

Diese These sieht den Hauptrisikofaktor für ASS und Schizophrenie in einer mit dem Alter zunehmenden Rate an Neumutationen der spermatoiden DNA. Andere Forscher sehen den Hauptfaktor in einer mit dem steigenden Alter einhergehenden Dysregulation epigenetischer Prozesse (Perrin *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2013).

Im Rahmen dieses Versuchs werden durch die Verwendung des gleichen Rattenstammes unter gleichen Zuchtbedingungen und einem identischen Alter der Rattenväter sehr vergleichbare genetische Grundbedingungen geschaffen. Da zudem die Umweltfaktoren streng kontrolliert und gleichgehalten wurden, sollten demzufolge postkonzeptionelle genetische Alterationen wie *de novo* Mutationen und auch epigenetische Veränderungen überwiegend den Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen ausmachen. Es sei an dieser Stelle jedoch angemerkt, dass die Mutationsrate der DNA ein statistischer Wert ist, im Individuum stark abweichen kann und zudem nicht jede Mutation zwangsläufig schädlich ist. Epigenetische Veränderungen sind wiederum nicht nur von der Umwelt abhängig (Fraga *et al.*, 2005). Die veränderte Hippocampusmorphologie steht im Einklang mit der Hypothese, dass Neumutationen und dysregulierte Epigenetik einen Haupteinflussfaktor darstellen. Die lediglich milden kognitiven Einschränkungen können diese Annahme allerdings nicht bestätigen. Ohne genetische und epigenetische Analyse lässt sich an dieser Stelle aber nur über einen potentiellen Einfluss dieser Faktoren spekulieren. Von großem Interesse wäre daher eine genetische Analyse der Versuchstiere gewesen, um einen Rückschluss auf die Zusammenhänge zwischen Neumutationen, Epigenetik und der erhöhten Rate an ASS durch HPA zu ermöglichen.

Andere Autoren gehen davon aus, dass der HPA-Effekt auf eine verspätete erste Vaterschaft und nicht ausschließlich auf ein hohes paternales Alter zurückgeht (Pedersen *et al.*, 2014; Petersen *et al.*, 2011). Der dazu passende Erklärungsansatz sieht eine genetische Vulnerabilität für psychiatrische Erkrankungen, welche sich bei den Vätern in eingeschränkten sozialen Funktionen zeigt, als ursächlich. Demzufolge werden die betroffenen Individuen später Vater und geben ihr genetisches Risikoprofil, einhergehend mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko, an ihre Nachfahren weiter. Im Einklang dazu konnte gezeigt werden, dass Verwandte von an ASS Erkrankten



überdurchschnittlich häufig milde Symptomen der Erkrankung zeigen (Bolton *et al.*, 1994; Piven *et al.*, 1994). Diese Überlegung lässt sich im Tiermodell allerdings nicht überprüfen. Im Rahmen dieser Studie erfolgte keine Verhaltensphänotypisierung der Väter, welche Rückschlüsse auf etwaige soziale Defizite ermöglicht hätte. Allerdings waren die zur Zucht verwendeten Tiere allesamt Wistarratten, also einem Rattenstamm zugehörig, welcher häufig als Modellorganismus verwendet wird und prinzipiell keine Verhaltensauffälligkeiten zeigen sollte. Ein defizitäres Sozialverhalten der Väter kann somit zwar nicht ausgeschlossen werden, sollte aber nicht überzufällig häufiger bei den alten Vätern im Vergleich zu den jungen Vätern auftreten.

Die angestellten Überlegungen legen den Schluss nahe, dass das hier verwendete Tiermodell des HPA für ASS noch nicht abschließend bewertet werden kann, da die Verhaltensanalyse weitere autismusspezifische Symptome inkludieren könnte. Zudem sollte es um eine genetische Auswertung erweitert werden, um eine differenziertere ätiologische Zuordnung von Auffälligkeiten zu ermöglichen. Darüber hinaus wäre die exakte Testung spezifischer Funktionen betroffener hippocampaler Subregionen zu empfehlen. Auch könnten zusätzlich andere neuroanatomische Areale in die morphologische Analyse miteinbezogen werden.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit wichtige Erkenntnisse, da erstmals im Tiermodell gezeigt werden konnte, dass hohes paternales Alter eine veränderte Hippocampusmorphologie einhergehend mit milden kognitiven Defiziten bedingt. Da sowohl Hippocampusalterationen als auch Gedächtnisstörungen mit ASS assoziiert sind, wäre eine Verbindung zu dieser Erkrankung plausibel.

## 5.4 Allgemeine Aspekte und Ausblick

Im Rahmen der Forschung zum hohen paternalen Alter und dem damit verbundenen Krankheitsbild der ASS bestehen allgemein zu diskutierende Aspekte. Ein Kritikpunkt in diesem Forschungsgebiet ist das Fehlen einer einheitlichen studienübergreifend definierten Altersgrenze, welche festlegt, ab wann ein Vater als alt angesehen werden kann. Die diesbezügliche Heterogenität zeigt sich bei der Betrachtung einiger beispielhaft ausgewählter Humanstudien in welchen die Altersgrenzen zwischen über 40 Jahre (Reichenberg *et al.*, 2006), über 45 Jahre (D'Onofrio *et al.*, 2014) oder über 50 Jahre alten Vätern (Frans *et al.*, 2013; Hultman *et al.*, 2011) variieren. Diese Inkongruenz erschwert die Vergleichbarkeit von Studien. Prinzipiell wäre die Einteilung in Altersgruppen, wie z.B. <20, 21-25, 26-30 usw., wünschenswert und möglicherweise ein probates Mittel um zudem eine linear ansteigende Risikoverteilung abzubilden.

Des Weiteren stellt sich in Anbetracht der nahezu sprunghaften Vermehrung von ASS-Diagnosen die Frage nach zugrundeliegenden Ursachen. Im Jahr 2000 wurde bei 6,7 von 1000 8-jährigen Kindern in den USA die Diagnose ASS gestellt, im Jahr 2012 stieg diese Zahl auf 14,6 (Christensen *et al.*, 2016). Die Autismusprävalenz ist somit innerhalb von 12 Jahren um den Faktor 2,1 gestiegen. Hierfür kommen verschiedene mögliche Erklärungen infrage. Zunächst einmal besteht die Möglichkeit, dass ein tatsächlicher Anstieg der Prävalenzrate vorliegt, welcher z.B. durch den HPA-Effekt erklärt werden könnte. Denkbar ist zudem, dass der Anstieg auf eine Erweiterung der Diagnosekriterien zurückzuführen ist (Chaste und Leboyer, 2012). Einhergehend mit dieser Annahme könnte auch eine erhöhte Screeningrate, welche obendrein vermehrt leichte Fälle von ASS detektiert, ursächlich für die Zunahme sein. Die Frage der Kausalität lässt sich in diesem Kontext nicht abschließend klären. Es kann jedoch angenommen werden, dass der gestiegenen Prävalenz vermutlich ein synergetischer Effekt der genannten Ursachen zugrunde liegt.

Unabhängig von den zuvor diskutierten Faktoren besteht jedoch einheitlicher Konsens, dass ein erhöhtes paternales Alter mit einem beim Nachwuchs erhöhten Risiko an ASS zu erkranken einhergeht. Im Kontext einer alternden Gesellschaft und der damit verbundenen Tendenz zu später Vaterschaft rückt

dieser Risikofaktor vermehrt in den öffentlichen Fokus. Dies hat zur Folge, dass die Ursachensuche und das Aufdecken zugrundeliegender Pathomechanismen zunehmend auch volkswirtschaftliche Bedeutung erlangt. Überdies ist für die Präventionsmedizin das Definieren einer Altersgrenze, ab welcher das Erkrankungsrisiko ansteigt, von Interesse. Die Festlegung einer einprägsamen und anschaulichen Altersgrenze ist aufgrund des vermeintlich linearen Risikoanstiegs diffizil. Sie könnte jedoch perspektivisch dabei helfen, den Risikofaktor vermehrt in das öffentliche Bewusstsein zu rücken und damit den bestehenden Trend später Vaterschaft gegebenenfalls zu beeinflussen. Dies macht deutlich, wie bedeutsam es sein kann, den Risikofaktor des väterlichen Alters und die damit verbundenen kausalen Mechanismen zu verstehen.

Im Gegensatz zu Humanstudien bieten Tiermodelle den Vorteil eines verhältnismäßig freien Versuchsdesigns mit der Möglichkeit der weitgehenden Kontrolle potentieller Einflussfaktoren. Daher erlauben sie eine bessere Überprüfbarkeit und Differenzierung zwischen Korrelationen und Kausalzusammenhängen und sollten folglich in Kombination mit Humanstudien der weiteren Erforschung dienen. Es sei angemerkt, dass von einem einzigen Tiermodell nicht vollumfänglich auf komplexe neuropsychiatrische Erkrankungen wie ASS geschlossen werden kann. Für zukünftige Forschung scheint in diesem Kontext das Konzept der Endophänotypen (intermediärer Phänotyp) hilfreich zu sein, da hierbei quantifizierbarer Krankheitskorrelate untersucht werden. Dieses Konzept dient der gezielten Untersuchung einzelner messbarer Ausprägungen biochemischer, neuroanatomischer, neurophysiologischer, endokrinologischer, kognitiver oder neuropsychologischer Natur und verknüpft somit klinische Symptome mit biologischen Grundlagen (Gottesman und Gould, 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten nicht alle mit ASS assoziierten Symptome untersucht werden. Dies könnte eine Erklärung für den in dieser Untersuchung geringen Einfluss des HPA sein. Die im Tiermodell in der vorliegenden Studie durch HPA evozierten dezenten kognitiven Defizite sowie die neuroanatomischen Veränderungen sollten jedoch zu weiteren Forschungsvorhaben führen, bei denen in einem integrierten Ansatz Verhalten, Neuroanatomie und Genetik untersucht werden sollten.

## 6. Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

#### [A]

Abrahams, S., Pickering, A., Polkey, C. und Morris, R. (1997). **Spatial memory deficits in patients with unilateral damage to the right hippocampal formation.** *Neuropsychologia* 35, 11-24.

American Psychiatric Association (2013). **Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)**, American Psychiatric Publishing

Andersen, P. (2007). **The Hippocampus Book**, Oxford University Press, USA

Andersen, P., Bliss, T. V. P. und Skrede, K. K. (1971). **Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways.** *Experimental Brain Research* 13, 222-238.

Aradillas, E., Libon, D. J. und Schwartzman, R. J. (2011). **Acute loss of spatial navigational skills in a case of a right posterior hippocampus stroke.** *Journal of the neurological sciences* 308, 144-146.

Asperger, H. (1944). **Die „Autistischen Psychopathen“ im Kindesalter.** *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 117, 76-136.

Astolfi, P. und Zonta, L. A. (1999). **Risks of preterm delivery and association with maternal age, birth order, and fetal gender.** *Human Reproduction* 14, 2891-2894.

Auroux, M. (1983). **Decrease of learning capacity in offspring with increasing paternal age in the rat.** *Teratology* 27, 141-148.

Axmacher, N., Mormann, F., Fernández, G., Cohen, M. X., Elger, C. E. und Fell, J. (2007). **Sustained Neural Activity Patterns during Working Memory in the Human Medial Temporal Lobe.** *The Journal of Neuroscience* 27, 7807-7816.

Aylward, E. H., Minshew, N. J., Goldstein, G., Honeycutt, N. A., Augustine, A. M., Yates, K. O., Barta, P. E. und Pearlson, G. D. (1999). **MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults.** *Neurology* 53, 2145.

**[B]**

Badcock, C. (2011). **The imprinted brain: how genes set the balance between autism and psychosis.** *Epigenomics* 3, 345-359.

Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E. und Rutter, M. (1995). **Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study.** *Psychological Medicine* 25, 63-77.

Bennetto, L., Pennington, B. F. und Rogers, S. J. (1996). **Intact and Impaired Memory Functions in Autism.** *Child Development* 67, 1816-1835.

Bohbot, V. D., Kalina, M., Stepankova, K., Spackova, N., Petrides, M. und Nadel, L. (1998). **Spatial memory deficits in patients with lesions to the right hippocampus and to the right parahippocampal cortex.** *Neuropsychologia* 36, 1217-1238.

Bolton, P., Macdonald, H., Pickles, A., Rios, P., Goode, S., Crowson, M., Bailey, A. und Rutter, M. (1994). **A Case-Control Family History Study of Autism.** *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 35, 877-900.

Boucher, J. (1981). **Memory for recent events in autistic children.** *Journal of Autism and Developmental Disorders* 11, 293-301.

Boucher, J. und Lewis, V. (1989). **Memory impairments and communication in relatively able autistic children.** *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 30, 99-122.

Bray, I. und Gunnell, D. (2006). **Advanced paternal age: How old is too old?** *Journal of Epidemiology and Community Health* 60, 851-853.

Brown, A. S., Schaefer, C. A., Wyatt, R. J., Begg, M. D., Goetz, R., Bresnahan, M. A., Harkavy-Friedman, J., Gorman, J. M., Malaspina, D. und Susser, E. S. (2002). **Paternal age and risk of schizophrenia in adult offspring.** *Am J Psychiatry* 159, 1528-1533.

**[C]**

Cantor-Graae, E. und Selten, J.-P. (2005). **Schizophrenia and Migration: A Meta-Analysis and Review.** *American Journal of Psychiatry* 162, 12-24.

- Chaste, P. und Leboyer, M. (2012). **Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions.** *Dialogues in Clinical Neuroscience* 14, 281-292.
- Christensen, D. L., Baio, J., Van Naarden Braun, K. B., Deborah, Charles, J., Constantino, J. N., Daniels, J., Durkin, M. S., Fitzgerald, R. T. K.-S., Margaret Lee, Li-Ching, Pettygrove, S. R., Cordelia, Schulz, E., Wells, C., Wingate, M. S. und Zahorodny, W. Y.-A., Marshalyn (2016). **Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years—autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2012.** *MMWR. Surveillance Summaries* 65.
- Clarke, T. K., Lupton, M. K., Fernandez-Pujals, A. M., Starr, J., Davies, G., Cox, S., Pattie, A., Liewald, D. C., Hall, L. S., MacIntyre, D. J., Smith, B. H., Hocking, L. J., Padmanabhan, S., Thomson, P. A., Hayward, C., Hansell, N. K., Montgomery, G. W., Medland, S. E., Martin, N. G., Wright, M. J., Porteous, D. J., Deary, I. J. und McIntosh, A. M. (2016). **Common polygenic risk for autism spectrum disorder (ASD) is associated with cognitive ability in the general population.** *Mol Psychiatry* 21, 419-425.
- Conrad, C. D., Magariños, A. M., LeDoux, J. E. und McEwen, B. S. (1999). **Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy.** *Behavioral neuroscience* 113, 902.
- Corbett, B. A., Constantine, L. J., Hendren, R., Rocke, D. und Ozonoff, S. (2008). **Examining executive functioning in children with autism spectrum disorder, attention deficit hyperactivity disorder and typical development.** *Psychiatry Research* 166, 210-222.
- Corcoran, C., Perrin, M., Harlap, S., Deutsch, L., Fennig, S., Manor, O., Nahon, D., Kimhy, D., Malaspina, D. und Susser, E. (2009). **Effect of socioeconomic status and parents' education at birth on risk of schizophrenia in offspring.** *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology* 44, 265-271.
- Croen, L. A., Grether, J. K., Yoshida, C. K., Odouli, R. und Hendrick, V. (2011). **Antidepressant use during pregnancy and childhood autism spectrum disorders.** *Archives of general psychiatry* 68, 1104-1112.
- Crow, J. F. (2000). **The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation.** *Nat Rev Genet* 1, 40-47.

**[D]**

D'Onofrio, B. M., Rickert, M. E., Frans, E., Kuja-Halkola, R., Almqvist, C., Sjolander, A., Larsson, H. und Lichtenstein, P. (2014). **Paternal age at childbearing and offspring psychiatric and academic morbidity.** *JAMA Psychiatry* 71, 432-438.

de Garengot, R. J. C. und Osmont, C. (1742). **Splanchnologie, ou L'anatomie des visceres: avec des figures originales tirées d'après les cadavres, suivie d'une Dissertation sur l'origine de la chirurgie,** chez Charles Osmont

de Kluiver, H., Buizer-Voskamp, J. E., Dolan, C. V. und Boomsma, D. I. (2016). **Paternal age and psychiatric disorders: A review.** *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, n/a-n/a.

de Nó, R. L. (1934). **Studies on the Structure of the Cerebral Cortex: Continuation of the study of the ammonic system. II,** Johann Ambrosius Barth

Donohue, H. S., Gabbott, P. L. A., Davies, H. A., Rodríguez, J. J., Cordero, M. I., Sandi, C., Medvedev, N. I., Popov, V. I., Colyer, F. M., Peddie, C. J. und Stewart, M. G. (2006). **Chronic restraint stress induces changes in synapse morphology in stratum lacunosum-moleculare CA1 rat hippocampus: A stereological and three-dimensional ultrastructural study.** *Neuroscience* 140, 597-606.

Douglas, J. (1995). **MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder.** *Am J Psychiatry* 152, 973-998.

**[E]**

Eichenbaum, H. (2000). **A cortical-hippocampal system for declarative memory.** *Nat Rev Neurosci* 1, 41-50.

Ek, M., Wicks, S., Magnusson, C. und Dalman, C. (2012). **Adoptive paternal age and risk of psychosis in adoptees: a register based cohort study.** *PLoS One* 7, e47334.

Ellen, P. und Wilson, A. S. (1963). **Perseveration in the rat following hippocampal lesions.** *Experimental Neurology* 8, 310-317.

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.-M., Nordborg, C., Peterson, D. A. und Gage, F. H. (1998). **Neurogenesis in the adult human hippocampus**. *Nat Med* 4, 1313-1317.

## [F]

Feinberg, J. I., Bakulski, K. M., Jaffe, A. E., Tryggvadottir, R., Brown, S. C., Goldman, L. R., Croen, L. A., Hertz-Picciotto, I., Newschaffer, C. J., Daniele Fallin, M. und Feinberg, A. P. (2015). **Paternal sperm DNA methylation associated with early signs of autism risk in an autism-enriched cohort**. *International Journal of Epidemiology*.

Finke, C., Bruehl, H., Düzel, E., Heekeren, H. R. und Ploner, C. J. (2013). **Neural Correlates of Short-Term Memory Reorganization in Humans with Hippocampal Damage**. *The Journal of Neuroscience* 33, 11061-11069.

Flatscher-Bader, T., Foldi, C. J., Chong, S., Whitelaw, E., Moser, R. J., Burne, T. H., Eyles, D. W. und McGrath, J. J. (2011). **Increased de novo copy number variants in the offspring of older males**. *Transl Psychiatry* 1, e34.

Foldi, C. J., Eyles, D. W., Flatscher-Bader, T., McGrath, J. J. und Burne, T. H. (2011). **New perspectives on rodent models of advanced paternal age: relevance to autism**. *Front Behav Neurosci* 5, 32.

Forbes, N. F., Carrick, L. A., McIntosh, A. M. und Lawrie, S. M. (2009). **Working memory in schizophrenia: a meta-analysis**. *Psychological Medicine* 39, 889-905.

Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J. C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T. D., Wu, Y.-Z., Plass, C. und Esteller, M. (2005). **Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 10604-10609.

Frans, E. M., McGrath, J. J., Sandin, S., Lichtenstein, P., Reichenberg, A., Langstrom, N. und Hultman, C. M. (2011). **Advanced paternal and grandpaternal age and schizophrenia: a three-generation perspective**. *Schizophr Res* 133, 120-124.



- Frans, E. M., Sandin, S., Reichenberg, A., Langstrom, N., Lichtenstein, P., McGrath, J. J. und Hultman, C. M. (2013). **Autism risk across generations: a population-based study of advancing grandpaternal and paternal age.** *JAMA Psychiatry* 70, 516-521.
- Fretts, R. C. (2005). **Etiology and prevention of stillbirth.** *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 193, 1923-1935.
- Frisk, V. und Milner, B. (1990). **The role of the left hippocampal region in the acquisition and retention of story content.** *Neuropsychologia* 28, 349-359.
- Frodl, T., Schaub, A., Banac, S., Charypar, M., Jäger, M., Kümmler, P., Bottlender, R., Zetzsche, T., Born, C., Leinsinger, G., Reiser, M., Möller, H.-J. und Meisenzahl, E. M. (2006). **Reduced hippocampal volume correlates with executive dysfunctioning in major depression.** *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 31, 316-325.

## [G]

- Garcia-Palomares, S., Pertusa, J. F., Minarro, J., Garcia-Perez, M. A., Hermenegildo, C., Rausell, F., Cano, A. und Tarin, J. J. (2009). **Long-term effects of delayed fatherhood in mice on postnatal development and behavioral traits of offspring.** *Biol Reprod* 80, 337-342.
- Gardener, H., Spiegelman, D. und Buka, S. L. (2011). **Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis.** *Pediatrics*, peds. 2010-1036.
- Gaugler, T., Klei, L., Sanders, S. J., Bodea, C. A., Goldberg, A. P., Lee, A. B., Mahajan, M., Manaa, D., Pawitan, Y., Reichert, J., Ripke, S., Sandin, S., Sklar, P., Svantesson, O., Reichenberg, A., Hultman, C. M., Devlin, B., Roeder, K. und Buxbaum, J. D. (2014). **Most genetic risk for autism resides with common variation.** *Nat Genet* 46, 881-885.
- Gauthier, J., Spiegelman, D., Piton, A., Lafrenière, R. G., Laurent, S., St-Onge, J., Lapointe, L., Hamdan, F. F., Cossette, P., Mottron, L., Fombonne, É., Joobar, R., Marineau, C., Drapeau, P. und Rouleau, G. A. (2009). **Novel de novo SHANK3 mutation in autistic patients.** *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 150B, 421-424.

- Gerlai, R. T., McNamara, A., Williams, S. und Phillips, H. S. (2002). **Hippocampal dysfunction and behavioral deficit in the water maze in mice: an unresolved issue?** Brain research bulletin 57, 3-9.
- Gilbert, P. E. und Kesner, R. P. (2003). **Localization of function within the dorsal hippocampus: the role of the CA3 subregion in paired-associate learning.** Behavioral neuroscience 117, 1385.
- Goh, S. und Peterson, B. S. (2012). **Imaging evidence for disturbances in multiple learning and memory systems in persons with autism spectrum disorders.** Developmental Medicine & Child Neurology 54, 208-213.
- Goto, K., Kurashima, R., Gokan, H., Inoue, N., Ito, I. und Watanabe, S. (2010). **Left-Right Asymmetry Defect in the Hippocampal Circuitry Impairs Spatial Learning and Working Memory in iv Mice.** PLOS ONE 5, e15468.
- Gottesman, I. I. und Gould, T. D. (2003). **The Endophenotype Concept in Psychiatry: Etymology and Strategic Intentions.** American Journal of Psychiatry 160, 636-645.
- Gupta, S., Aggarwal, S., Rathanravan, B. und Lee, T. (1998). **Th1- and Th2-like cytokines in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in autism.** Journal of Neuroimmunology 85, 106-109.
- Guzman, S. J., Schlögl, A., Frotscher, M. und Jonas, P. (2016). **Synaptic mechanisms of pattern completion in the hippocampal CA3 network.** Science 353, 1117.

## [H]

- Hartley, T. und Harlow, R. (2012). **An association between human hippocampal volume and topographical memory in healthy young adults.** Frontiers in Human Neuroscience 6, 338.
- Haznedar, M. M., Buchsbaum, M. S., Wei, T.-C., Hof, P. R., Cartwright, C., Bienstock, C. A. und Hollander, E. (2000). **Limbic Circuitry in Patients With Autism Spectrum Disorders Studied With Positron Emission Tomography and Magnetic Resonance Imaging.** American Journal of Psychiatry 157, 1994-2001.

Heaton, R. K. (1981). **A manual for the Wisconsin card sorting test**, Western Psychological Services

Henneman, W. J. P., Sluimer, J. D., Barnes, J., van der Flier, W. M., Sluimer, I. C., Fox, N. C., Scheltens, P., Vrenken, H. und Barkhof, F. (2009). **Hippocampal atrophy rates in Alzheimer disease: Added value over whole brain volume measures**. *Neurology* 72, 999-1007.

Hitti, F. L. und Siegelbaum, S. A. (2014). **The hippocampal CA2 region is essential for social memory**. *Nature* 508, 88-92.

Hommer, R. E. und Swedo, S. E. (2015). **Schizophrenia and Autism—Related Disorders**. *Schizophrenia Bulletin* 41, 313-314.

Hook, E. B. (1981). **Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages**. *Obstet Gynecol* 58(3), 282-285.

Howard, M. A., Cowell, P. E., Boucher, J., Broks, P., Mayes, A., Farrant, A. und Roberts, N. (2000). **Convergent neuroanatomical and behavioural evidence of an amygdala hypothesis of autism**. *NeuroReport* 11, 2931-2935.

Hultman, C. M., Sandin, S., Levine, S. Z., Lichtenstein, P. und Reichenberg, A. (2011). **Advancing paternal age and risk of autism: new evidence from a population-based study and a meta-analysis of epidemiological studies**. *Mol Psychiatry* 16, 1203-1212.

Hunsaker, M. R., Thorup, J. A., Welch, T. und Kesner, R. P. (2006). **The role of CA3 and CA1 in the acquisition of an object-trace-place paired-associate task**. *Behavioral neuroscience* 120, 1252.

[I]

—

[J]

Janecka, M., Manduca, A., Servadio, M., Trezza, V., Smith, R., Mill, J., Schalkwyk, L. C., Reichenberg, A. und Fernandes, C. (2015). **Effects of advanced paternal age on trajectories of social behavior in offspring**. *Genes Brain Behav* 14, 443-453.

Jerman, T., Kesner, R. P. und Hunsaker, M. R. (2006). **Disconnection analysis of CA3 and DG in mediating encoding but not retrieval in a spatial maze learning task.** *Learning & Memory* 13, 458-464.

## [K]

Kanner, L. (1943). **Autistic disturbances of affective contact.** *Nervous Child* 2, 217-250.

Karl, K. und Lack, N. (2009). **Die ältere Erstgebärende – wie hoch ist das Risiko wirklich?** *Hebamme* 22, 234-237.

Kempermann, G., Kuhn, H. G. und Gage, F. H. (1997). **More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment.** *Nature* 386, 493-495.

Kesner, R. P. (2013). **A process analysis of the CA3 subregion of the hippocampus.** *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7, 78.

Kesner, R. P., Hunsaker, M. R. und Gilbert, P. E. (2005). **The role of CA1 in the acquisition of an object-trace-odor paired associate task.** *Behavioral neuroscience* 119, 781.

Klauck, S. M., Poustka, L. und Chiocchetti, A. (2011). **Genetics and animal modeling of autism spectrum disorders.** *Der Nervenarzt* 82, 553-563.

Kogan, M. D., Blumberg, S. J., Schieve, L. A., Boyle, C. A., Perrin, J. M., Ghandour, R. M., Singh, G. K., Strickland, B. B., Trevathan, E. und van Dyck, P. C. (2009). **Prevalence of Parent-Reported Diagnosis of Autism Spectrum Disorder Among Children in the US, 2007.** *Pediatrics* 124, 1395-1403.

Kolozsi, E., Mackenzie, R., Roullet, F., Decatanzaro, D. und Foster, J. (2009). **Prenatal exposure to valproic acid leads to reduced expression of synaptic adhesion molecule neuroligin 3 in mice.** *Neuroscience* 163, 1201-1210.

Kong, A., Frigge, M. L., Masson, G., Besenbacher, S., Sulem, P., Magnusson, G., Gudjonsson, S. A., Sigurdsson, A., Jonasdottir, A., Jonasdottir, A., Wong, W. S., Sigurdsson, G., Walters, G. B., Steinberg, S., Helgason, H., Thorleifsson, G., Gudbjartsson, D. F., Helgason, A., Magnusson, O. T., Thorsteinsdottir, U. und Stefansson, K. (2012). **Rate of de novo**

**mutations and the importance of father's age to disease risk.** *Nature* 488, 471-475.

Kouser, M., Speed, H. E., Dewey, C. M., Reimers, J. M., Widman, A. J., Gupta, N., Liu, S., Jaramillo, T. C., Bangash, M., Xiao, B., Worley, P. F. und Powell, C. M. (2013). **Loss of Predominant Shank3 Isoforms Results in Hippocampus-Dependent Impairments in Behavior and Synaptic Transmission.** *The Journal of Neuroscience* 33, 18448-18468.

Krug, A., Seffer, D., Rippberger, H., Dietsche, B., Backes, H., Schneider-Haßloff, H., Schwarting, R.K.W., Kircher, T. & Wöhr, M. (2014). **Advanced paternal age as a risk factor for schizophrenia: A translational study in humans and rats.** *Schizophrenia Research* 153, Supplement 1, S94, #S18.

## [L]

Lee, I. und Kesner, R. (2003). **Differential roles of dorsal hippocampal subregions in spatial working memory with short versus intermediate delay.** *Behavioral neuroscience* 117, 1044.

Lee, T., Jarome, T., Li, S.-J., Kim, J. J. und Helmstetter, F. J. (2009). **Chronic stress selectively reduces hippocampal volume in rats: a longitudinal MRI study.** *Neuroreport* 20, 1554-1558.

Lehrer, D. S., Pato, M. T., Nahhas, R. W., Miller, B. R., Malaspina, D., Buckley, P. F., Sobell, J. L., Walsh-Messinger, J., Cohort Consortium, G. P. und Pato, C. N. (2016). **Paternal age effect: Replication in schizophrenia with intriguing dissociation between bipolar with and without psychosis.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 171, 495-505.

Li, H., Matsumoto, K. und Watanabe, H. (1999). **Different effects of unilateral and bilateral hippocampal lesions in rats on the performance of radial maze and odor-paired associate tasks.** *Brain Research Bulletin* 48, 113-119.

Lichtenstein, P., Carlström, E., Råstam, M., Gillberg, C. und Anckarsäter, H. (2010). **The Genetics of Autism Spectrum Disorders and Related Neuropsychiatric Disorders in Childhood.** *American Journal of Psychiatry* 167, 1357-1363.

Lotter, V. (1966). **Epidemiology of autistic conditions in young children.** *Social psychiatry* 1, 124-135.

Luna, B., Doll, S. K., Hegedus, S. J., Minshew, N. J. und Sweeney, J. A. (2007). **Maturation of Executive Function in Autism**. *Biological Psychiatry* 61, 474-481.

Lundstrom, S., Haworth, C. M., Carlstrom, E., Gillberg, C., Mill, J., Rastam, M., Hultman, C. M., Ronald, A., Anckarsater, H., Plomin, R., Lichtenstein, P. und Reichenberg, A. (2010). **Trajectories leading to autism spectrum disorders are affected by paternal age: findings from two nationally representative twin studies**. *J Child Psychol Psychiatry* 51, 850-856.

## [M]

Magnusson, C., Rai, D., Goodman, A., Lundberg, M., Idring, S., Svensson, A., Koupil, I., Serlachius, E. und Dalman, C. (2012). **Migration and autism-spectrum disorder: population-based study**. *The British Journal of Psychiatry, bjp*. bp. 111.095125.

Maguire, E. A., Frackowiak, R. S. und Frith, C. D. (1997). **Recalling routes around London: activation of the right hippocampus in taxi drivers**. *The Journal of Neuroscience* 17, 7103-7110.

Maguire, E. A., Gadian, D. G., Johnsrude, I. S., Good, C. D., Ashburner, J., Frackowiak, R. S. J. und Frith, C. D. (2000). **Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 4398-4403.

Malaspina, D., Harlap, S., Fennig, S., Heiman, D., Nahon, D., Feldman, D. und Susser, E. S. (2001). **Advancing paternal age and the risk of schizophrenia**. *Arch Gen Psychiatry* 58, 361-367.

McCarthy, S. E., Gillis, J., Kramer, M., Lihm, J., Yoon, S., Berstein, Y., Mistry, M., Pavlidis, P., Solomon, R., Ghiban, E., Antoniou, E., Kelleher, E., O'Brien, C., Donohoe, G., Gill, M., Morris, D. W., McCombie, W. R. und Corvin, A. (2014). **De novo Mutations in Schizophrenia Implicate Chromatin Remodeling and Support a Genetic Overlap with Autism and Intellectual Disability**. *Molecular psychiatry* 19, 652-658.

McGrath, J. J., Petersen, L., Agerbo, E., Mors, O., Mortensen, P. B. und Pedersen, C. B. (2014). **A comprehensive assessment of parental age and psychiatric disorders**. *JAMA Psychiatry* 71, 301-309.

Miller, B., Suvisaari, J., Miettunen, J., Jarvelin, M. R., Haukka, J., Tanskanen, A., Lonnqvist, J., Isohanni, M. und Kirkpatrick, B. (2011). **Advanced**

**paternal age and parental history of schizophrenia.** Schizophr Res 133, 125-132.

Minshew, N. J. und Goldstein, G. (1993). **Is autism an amnesic disorder? Evidence from the California Verbal Learning Test.** Neuropsychology 7, 209.

Motley, S. E. und Kirwan, C. B. (2012). **A parametric investigation of pattern separation processes in the medial temporal lobe.** The Journal of Neuroscience 32, 13076-13084.

Moy, S. S., Nadler, J. J., Poe, M. D., Nonneman, R. J., Young, N. B., Koller, B. H., Crawley, J. N., Duncan, G. E. und Bodfish, J. W. (2008). **Development of a Mouse Test for Repetitive, Restricted Behaviors: Relevance to Autism.** Behavioural brain research 188, 178-194.

Moy, S. S., Nadler, J. J., Young, N. B., Perez, A., Holloway, L. P., Barbaro, R. P., Barbaro, J. R., Wilson, L. M., Threadgill, D. W., Lauder, J. M., Magnuson, T. R. und Crawley, J. N. (2007). **Mouse behavioral tasks relevant to autism: Phenotypes of 10 inbred strains.** Behavioural Brain Research 176, 4-20.

## [N]

Nadel, L. und Moscovitch, M. (1997). **Memory consolidation, retrograde amnesia and the hippocampal complex.** Current Opinion in Neurobiology 7, 217-227.

Nadler, J. J., Moy, S. S., Dold, G., Simmons, N., Perez, A., Young, N. B., Barbaro, R. P., Piven, J., Magnuson, T. R. und Crawley, J. N. (2004). **Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice.** Genes, Brain and Behavior 3, 303-314.

Nakazawa, K., Quirk, M. C., Chitwood, R. A., Watanabe, M., Yeckel, M. F., Sun, L. D., Kato, A., Carr, C. A., Johnston, D. und Wilson, M. A. (2002). **Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall.** Science 297, 211-218.

Nakazawa, K., Sun, L. D., Quirk, M. C., Rondi-Reig, L., Wilson, M. A. und Tonegawa, S. (2003). **Hippocampal CA3 NMDA Receptors Are Crucial for Memory Acquisition of One-Time Experience.** Neuron 38, 305-315.

Nelson, M. D., Saykin, A. J., Flashman, L. A. und Riordan, H. J. (1998). **Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: A meta-analytic study.** Archives of General Psychiatry 55, 433-440.

Nguyen, A., Rauch, T. A., Pfeifer, G. P. und Hu, V. W. (2010). **Global methylation profiling of lymphoblastoid cell lines reveals epigenetic contributions to autism spectrum disorders and a novel autism candidate gene, RORA, whose protein product is reduced in autistic brain.** The FASEB Journal 24, 3036-3051.

Nicolson, R., DeVito, T. J., Vidal, C. N., Sui, Y., Hayashi, K. M., Drost, D. J., Williamson, P. C., Rajakumar, N., Toga, A. W. und Thompson, P. M. (2006). **Detection and mapping of hippocampal abnormalities in autism.** Psychiatry Research: Neuroimaging 148, 11-21.

Nilsen, A. B. V., Waldenström, U., Rasmussen, S., Hjelmstedt, A. und Schytt, E. (2013). **Characteristics of first-time fathers of advanced age: a Norwegian population-based study.** BMC Pregnancy and Childbirth 13, 29.

## [O]

O'Keefe, J. (1976). **Place units in the hippocampus of the freely moving rat.** Experimental neurology 51, 78-109.

O'Keefe, J. und Dostrovsky, J. (1971). **The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat.** Brain research 34, 171-175.

O'Keefe, J. und Nadel, L. (1978). **The hippocampus as a cognitive map,** Oxford University Press, USA

Olton, D. S., Becker, J. T. und Handelmann, G. E. (1980). **Hippocampal function: Working memory or cognitive mapping?** Physiological Psychology 8, 239-246.

Olton, D. S. und Paras, B. C. (1979). **Spatial memory and hippocampal function.** Neuropsychologia 17, 669-682.

Ozonoff, S. (1995). **Reliability and validity of the Wisconsin Card Sorting Test in studies of autism.** Neuropsychology 9, 491.



**[P]**

Pedersen, C. und Mortensen, P. (2001). **Evidence of a dose-response relationship between urbanicity during upbringing and schizophrenia risk.** Archives of General Psychiatry 58, 1039-1046.

Pedersen, C. B., McGrath, J., Mortensen, P. B. und Petersen, L. (2014). **The importance of father's age to schizophrenia risk.** Mol Psychiatry 19, 530-531.

Penfield, W. und Milner, B. (1958). **MEemory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone.** A.M.A. Archives of Neurology & Psychiatry 79, 475-497.

Perrin, M. C., Brown, A. S. und Malaspina, D. (2007). **Aberrant epigenetic regulation could explain the relationship of paternal age to schizophrenia.** Schizophr Bull 33, 1270-1273.

Petersen, L., Mortensen, P. B. und Pedersen, C. B. (2011). **Paternal age at birth of first child and risk of schizophrenia.** Am J Psychiatry 168, 82-88.

Piven, J., Bailey, J., Ranson, B. J. und Arndt, S. (1998). **No Difference in Hippocampus Volume Detected on Magnetic Resonance Imaging in Autistic Individuals.** Journal of Autism and Developmental Disorders 28, 105-110.

Piven, J., Wzorek, M., Landa, R., Lainhart, J., Bolton, P., Chase, G. A. und Folstein, S. (1994). **Personality characteristics of the parents of autistic individuals.** Psychological Medicine 24, 783-795.

Puleo, C. M., Schmeidler, J., Reichenberg, A., Kolevzon, A., Soorya, L. V., Buxbaum, J. D. und Silverman, J. M. (2012). **Advancing paternal age and simplex autism.** Autism 16, 367-380.

**[Q]**

-

**[R]**

- Rahman, M. M., Callaghan, C. K., Kerskens, C. M., Chattarji, S. und O'Mara, S. M. (2016). **Early hippocampal volume loss as a marker of eventual memory deficits caused by repeated stress.** *Scientific Reports* 6, 29127.
- Ranganath, C. und D'Esposito, M. (2001). **Medial Temporal Lobe Activity Associated with Active Maintenance of Novel Information.** *Neuron* 31, 865-873.
- Reichenberg, A., Gross, R., Weiser, M., Bresnahan, M., Silverman, J., Harlap, S., Rabinowitz, J., Shulman, C., Malaspina, D., Lubin, G., Knobler, H. Y., Davidson, M. und Susser, E. (2006). **Advancing paternal age and autism.** *Arch Gen Psychiatry* 63, 1026-1032.
- Renner, P., Klinger, L. G. und Klinger, M. R. (2000). **Implicit and Explicit Memory in Autism: Is Autism an Amnesic Disorder?** *Journal of Autism and Developmental Disorders* 30, 3-14.
- Risch, N., Reich, E. W., Wishnick, M. M. und McCarthy, J. G. (1987). **Spontaneous mutation and parental age in humans.** *American Journal of Human Genetics* 41, 218-248.
- Risch, N., Spiker, D., Lotspeich, L., Nouri, N., Hinds, D., Hallmayer, J., Kalaydjieva, L., McCague, P., Dimiceli, S., Pitts, T., Nguyen, L., Yang, J., Harper, C., Thorpe, D., Vermeer, S., Young, H., Hebert, J., Lin, A., Ferguson, J., Chiotti, C., Wiese-Slater, S., Rogers, T., Salmon, B., Nicholas, P., Petersen, P. B., Pingree, C., McMahon, W., Wong, D. L., Cavalli-Sforza, L. L., Kraemer, H. C. und Myers, R. M. (1999). **A Genomic Screen of Autism: Evidence for a Multilocus Etiology.** *The American Journal of Human Genetics* 65, 493-507.
- Rolls, E. T., Treves, A. und Rolls, E. T. (1998). **Neural networks and brain function**, Bd. 572, Oxford university press Oxford
- Russell, J., Jarrold, C. und Henry, L. (1996). **Working memory in children with autism and with moderate learning difficulties.** *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 37, 673-686.

**[S]**

Saitoh, O., Karns, C. M. und Courchesne, E. (2001). **Development of the hippocampal formation from 2 to 42 years**. MRI evidence of smaller area dentata in autism *124*, 1317-1324.

Salmond, C. H., Ashburner, J., Connelly, A., Friston, K. J., Gadian, D. G. und Vargha-Khadem, F. (2005). **The role of the medial temporal lobe in autistic spectrum disorders**. *European Journal of Neuroscience* *22*, 764-772.

Sampino, S., Juszczak, G. R., Zacchini, F., Swiergiel, A. H., Modlinski, J. A., Loi, P. und Ptak, G. E. (2014). **Grand-paternal age and the development of autism-like symptoms in mice progeny**. *Transl Psychiatry* *4*, e386.

Schneider, M. (2013). **Adolescence as a vulnerable period to alter rodent behavior**. *Cell and tissue research* *354*, 99-106.

Schumann, C. M., Hamstra, J., Goodlin-Jones, B. L., Lotspeich, L. J., Kwon, H., Buonocore, M. H., Lammers, C. R., Reiss, A. L. und Amaral, D. G. (2004). **The Amygdala Is Enlarged in Children But Not Adolescents with Autism; the Hippocampus Is Enlarged at All Ages**. *The Journal of Neuroscience* *24*, 6392-6401.

Scoville, W. B. und Milner, B. (1957). **LOSS OF RECENT MEMORY AFTER BILATERAL HIPPOCAMPAL LESIONS**. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* *20*, 11-21.

Seffer, D., Schwarting, R. K. und Wöhr, M. (2014). **Pro-social ultrasonic communication in rats: insights from playback studies**. *Journal of neuroscience methods* *234*, 73-81.

Semple, D. M., McIntosh, A. M. und Lawrie, S. M. (2005). **Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review**. *Journal of psychopharmacology* *19*, 187-194.

Sengupta, P. (2013). **The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's**. *Int J Prev Med* *4*, 624-630.

Shipton, O. A., El-Gaby, M., Apergis-Schoute, J., Deisseroth, K., Bannerman, D. M., Paulsen, O. und Kohl, M. M. (2014). **Left-right dissociation of hippocampal memory processes in mice**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *111*, 15238-15243.

- Sipos, A., Rasmussen, F., Harrison, G., Tynelius, P., Lewis, G., Leon, D. A. und Gunnell, D. (2004). **Paternal age and schizophrenia: a population based cohort study**. *BMJ* 329, 1070.
- Smith, R. G., Kember, R. L., Mill, J., Fernandes, C., Schalkwyk, L. C., Buxbaum, J. D. und Reichenberg, A. (2009). **Advancing paternal age is associated with deficits in social and exploratory behaviors in the offspring: a mouse model**. *PLoS One* 4, e8456.
- Smith, R. G., Reichenberg, A., Kember, R. L., Buxbaum, J. D., Schalkwyk, L. C., Fernandes, C. und Mill, J. (2013). **Advanced paternal age is associated with altered DNA methylation at brain-expressed imprinted loci in inbred mice: implications for neuropsychiatric disease**. *Mol Psychiatry* 18, 635-636.
- Smith, S. E., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K. und Patterson, P. H. (2007). **Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6**. *The Journal of Neuroscience* 27, 10695-10702.
- Southwick, J. S., Bigler, E. D., Froehlich, A., DuBray, M. B., Alexander, A. L., Lange, N. und Lainhart, J. E. (2011). **Memory Functioning in Children and Adolescents With Autism**. *Neuropsychology* 25, 702-710.
- Sparks, B. F., Friedman, S. D., Shaw, D. W., Aylward, E. H., Echelard, D., Artru, A. A., Maravilla, K. R., Giedd, J. N., Munson, J., Dawson, G. und Dager, S. R. (2002). **Brain structural abnormalities in young children with autism spectrum disorder**. *Neurology* 59, 184-192.
- Squire, L. R. (2004). **Memory systems of the brain: A brief history and current perspective**. *Neurobiology of Learning and Memory* 82, 171-177.
- Statistisches Bundesamt Deutschland (2016a). **Ältere Menschen in Deutschland und der EU**, unter: <https://www.bmfsfj.de/blob/93214/95d5fc19e3791f90f8d582d61b13a95e/aeltere-menschen-deutschland-eu-data.pdf> (Stand: 29.01.2017)
- Statistisches Bundesamt Deutschland, (2016b). **Tabelle 12612-0006**, unter: [https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/data;jsessionid=3630B68A9FBFA8345EA2C4962251D37D.tomcat\\_GO\\_1\\_2?operation=abrufetabelleAbrufen&selectionname=12612-0006&levelindex=1&levelid=1480163791260&index=6](https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/data;jsessionid=3630B68A9FBFA8345EA2C4962251D37D.tomcat_GO_1_2?operation=abrufetabelleAbrufen&selectionname=12612-0006&levelindex=1&levelid=1480163791260&index=6) (Stand: 05.12.2016)

Steele, S. D., Minshew, N. J., Luna, B. und Sweeney, J. A. (2007). **Spatial Working Memory Deficits in Autism**. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 37, 605-612.

## [T]

Tarín, J. J., Brines, J. und Cano, A. (1998). **Long-term effects of delayed parenthood**. *Human Reproduction* 13, 2371-2376.

## [U]

–

## [V]

Vago, D. R., Bevan, A. und Kesner, R. P. (2007). **The role of the direct perforant path input to the CA1 subregion of the dorsal hippocampus in memory retention and retrieval**. *Hippocampus* 17, 977-987.

van Balkom, I. D., Bresnahan, M., Vuijk, P. J., Hubert, J., Susser, E. und Hoek, H. W. (2012). **Paternal age and risk of autism in an ethnically diverse, non-industrialized setting: Aruba**. *PLoS One* 7, e45090.

van der Staay, F. J., Arndt, S. S. und Nordquist, R. E. (2009). **Evaluation of animal models of neurobehavioral disorders**. *Behavioral and Brain Functions* : BBF 5, 11-11.

Vanderschuren, L. J. M., Niesink, R. J. M., Spruijt, B. M. und Van Ree, J. M. (1995). **Influence of environmental factors on social play behavior of juvenile rats**. *Physiology & Behavior* 58, 119-123.

## [W]

Willner, P. (1984). **The validity of animal models of depression**. *Psychopharmacology* 83, 1-16.

World Health Organization, (1992). **The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: Clinical descriptions and diagnostic guidelines**. Geneva: World Health Organization.

Wöhr, M., Rouillet, F. I., Hung, A. Y., Sheng, M. und Crawley, J. N. (2011). **Communication Impairments in Mice Lacking Shank1: Reduced Levels of Ultrasonic Vocalizations and Scent Marking Behavior.** PLOS ONE 6, e20631.

[X]

–

[Y]

Yan, Q., Asafo - Adjei, P., Arnold, H., Brown, R. und Bauchwitz, R. (2004). **A phenotypic and molecular characterization of the fmr1 - tm1Cgr Fragile X mouse.** Genes, Brain and Behavior 3, 337-359.

[Z]

Zola-Morgan, S., Squire, L. und Amaral, D. (1986). **Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus.** The Journal of Neuroscience 6, 2950-2967.

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prävalenzrate von ASS auf 1000 achtjährige Kinder in den USA von den Jahren 2000 bis 2012	1
Abbildung 2: a) Vergleichende Übersicht der Altersentwicklung der Väter in Deutschland von den Jahren 2000 bis 2015 b) Vergleichende Übersicht des Anteils der Väter über 40 Jahre in Deutschland von den Jahren 2000 bis 2015	5
Abbildung 3: Übersicht zum zeitlichen Ablauf des Versuchs	23
Abbildung 4: Das radiale Acht-Arm-Labyrinth, Versuchsaufbau	25
Abbildung 5: Übersicht zum zeitlichen Ablauf des Lern-/ Umlernversuchs	26
Abbildung 6: Verteilung der Belohnungspellets in der Lern- und Umlernphase	27
Abbildung 7: a) Darstellung des linken Hippocampus einer Ratte mit Beschriftung und farblicher Markierung der untersuchten Regionen b) Gesamtfläche eines Hirnschnittes c) beispielhafte Messwerttabelle	31
Abbildung 8: a) Übersicht der durchschnittlichen Dauer eines Versuchsdurchgangs sowie b) der Anzahl der Armeintritte im radialen Acht-Arm-Labyrinth im Versuchsverlauf	34
Abbildung 9: Die verschiedenen Fehlertypen sowie die Gesamtfehlerzahl in Prozent der Gesamtarmeintritte pro Trial im Versuchsverlauf: a) Fehler des Arbeitsgedächtnisses b) Fehler des Referenzgedächtnisses c) Mischfehler d) Gesamtfehler.	36
Abbildung 10: Probe Trial Auswertung der Aufenthaltsdauer und Armeintritte: a) Aufenthaltsdauer in den Armen an VT7 b) Aufenthaltsdauer in den Armen an VT14 c) Armeintritte an VT7 d) Armeintritte an VT14	38
Abbildung 11: Probe Trial Auswertung nach der Belohnungsstärke: a) Aufenthaltsdauer an VT7 b) Aufenthaltsdauer an VT 14 c) Armeintritte an VT7 d) Armeintritte an VT14	41
Abbildung 12: Armeintritte in früher belohnte, aktuell belohnte und nie belohnte Arme	42
Abbildung 13: Hippocampus nach Hirnentnahme an PND 39: a) Größe der hippocampalen Subregionen b) Größe der Subregion CA3	44
Abbildung 14: Hippocampus bei Hirnentnahme nach Teilnahme am Lern-/ Umlernversuch zwischen PND 118±2 und PND 194±2: a) Größe der einzelnen hippocampalen Subregionen b) Größe der Subregion CA3 c) Größe der Subregion CA1_mol d) Größe der Gesamtfläche des linken und rechten Hippocampus	46

### **6.3 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien	18
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Laborgeräte und Materialien	20
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Materialien für Tierhaltung und Versuche	21
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Software	21



## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

<b>ANOVA</b>	Varianzanalyse; engl.: <i>analysis of variance</i>
<b>ASD</b>	engl.: <i>autism spectrum disorder</i>
<b>ASS</b>	Autismus-Spektrum-Störung
<b>CA</b>	Ammonshorn; lat.: <i>Cornu ammonis</i>
<b>CA_mol</b>	Molekularschicht des Ammonshorns
<b>DG</b>	engl.: <i>dentate gyrus</i> ; lat.: <i>Gyrus dentatus</i>
<b>HE</b>	Haupteffekt
<b>HPA</b>	hohes paternales Alter
<b>ICD</b>	<i>International Classification of Diseases</i> der WHO
<b>DSM</b>	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i> , der <i>American Psychiatric Association</i>
<b>KG</b>	Kontrollgruppe
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>PND</b>	Postnataltag; engl.: <i>post natal day</i>
<b>SEM</b>	Standardfehler des MW; engl.: <i>standard error of the mean</i>
<b>VT</b>	Versuchstag
<b>WCST</b>	<i>Wisconsin card sorting test</i>

## **6.5 Lebenslauf Curriculum vitae**



## 6.6 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren

an der **Philipps-Universität Marburg** waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Adamkiewicz, Ahrens, Arabin, Bartsch, Baum, Baumann, Becker, Best, Bürk, Buchholz, Burchert, Cetin, Czubayko, Damanakis, Dannlowski, Daut, Decher, Dettmeyer, Dodel, Donner-Banzhoff, Efe, Eilers, Ellenrieder, Fendrich, Feuser, Fuchs-Wunkelmann, Geks, Glatzl, Görg C., Gress, Grimm, Henke, Heverhagen, Heyse, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Josephs, Kann, Kill, Kircher, Kirschbaum, Klose, Koolman, Krug, Leonhardt, Lill, Lohoff, Lüsebrink, Maier, Maisch, Mittag, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Neumüller, Nimphius, Nimsky, Oertel, Oliver, Pagenstecher, Pantazis, Pape-Meyer, Peterlein, Plant, Renz, Rey del, Richter, Riera, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schieffer, Schneider, Schu, Schwarting, Seffer, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Steinfeldt, Steiniger, Steinkamp, Strick, Stiewe, Suske, Tackenberg, Teymoortasch, Vogelmeier, Vogt , Weihe, Werner, Westermann, Wiegand, Wöhr, Wrocklage, Wulf, Zwioerek, Zemlin, Zettl, Zoremba

an der **Medizinischen Universität Wien, Österreich**, waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Arbeiter, Bangert ,Barta, Bartl, Bidmon- Fliegenschnee , Birnbacher, Bodner-Adler, Brandstetter, Breier, Curcic, Dawid, Egarter, Emminger, Eppel, Fink, Foedinger, Gadenstätter, Galid, Golej, Hartmann, Häusler, Hermon, Horvat, Huber, Imhof, Jurecka, Kanppitsch, Kaulich, Kerak, Koller, Kudielka, Lass, Lehner, Leiss, Leitich, Lilgenau, Loewe, Maier, Manavi, Marx, Maurer, Mayer, Mazanek, Michel-Behnke, Mühlebner, Neumann, Obruca, Obwegeser, Ostermann, Philipp, Radakovic, Rappersberger, Riegler, Salzer, Schmied, Scholl-Firon, Seeber, Sevelda, Skrobal, Slavc, Steiner, Stöberl, Takacs, Thom, Thurner, Tschachler , Vargha, Vokovic-Bobic, Volc-Platzer, Vujic, Wagner

an der **Charité, Berlin** waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Audebert, Curio, Endres, Häusler, Klostermann, Losch, Marzinzik, Nolte, Rocco,

an dem **Klinikum St. Georg, Leipzig**, Lehrkrankenhaus der Universität Leipzig waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Hanschke, Kretzschmar, Mantovani Löffler, Schimmelpfennig, Treutler

an dem **Karapitiya Teaching Hospital, University of Ruhuna, Sri Lanka**, waren in alphabetischer Reihenfolge die folgenden Damen und Herren:

Abeywickrama, Kumara, Kumarasinghe

## 6.7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben. Ein großes Projekt geht zu Ende und viele Menschen haben mich durch das Aufzeigen und die Eröffnung neuer Möglichkeiten, die wohlwollende Bereitstellung ihrer Zeit, wertvolle Ratschläge und auch willkommene Ablenkung in diesem Zeitraum begleitet.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Tilo Kircher für die Möglichkeit zur Promotion an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Uniklinik Marburg bedanken. Herrn Prof. Dr. Dipl.-Psych. Axel Krug danke ich für die Betreuung meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Rainer Schwarting und Herrn Dr. Markus Wöhr der Arbeitsgruppe Verhaltensneurowissenschaft des Fachbereichs Psychologie der Philipps-Universität Marburg möchte ich dafür danken, dass sie mir die Mitarbeit an diesem Projekt ermöglicht haben.

Die Zeit in der interdisziplinären Arbeitsgruppe sowie hilfreiche Anmerkungen habe ich stets geschätzt.

Besonderer Dank gebührt zudem Herrn Dr. Dominik Seffer für die herausragende Anleitung und die Einführung in die Welt der Tierversuche, stetiges Feedback und die konstruktive Zusammenarbeit.

Herausheben möchte ich die Unterstützung durch meine Freundin Caro, welche immer für mich da ist und mich liebevoll durch diese nicht immer ganz einfache Phase begleitet und mir den Rücken gestärkt hat.

Ein großer Dank gebührt meiner Familie, im Besonderen Margit, Dirk und Chululu, für den stetigen Zuspruch, ihr Zuhören und ihre konstruktiven und wegweisenden Ratschläge während der Doktorarbeit und in der gesamten Studienzzeit.

Ein großes Danke geht zudem an meine Freunde, wo auch immer sie gerade verstreut sind, Ihr bereichert mein Leben.

## **6.8 Ehrenwörtliche Erklärung**





# 6.9 Wissenschaftliches Poster

NWG Workshop 2014, Marburg, Deutschland

## Advanced Paternal Age as a Risk Factor for Autism: Effects on brain morphology

HO HO

Eggebrecht JC<sup>1</sup>, Seffer D<sup>1</sup>, Krug A<sup>2</sup>, Schwarting RKW<sup>1</sup>, Kircher T<sup>2</sup>, Wöhr M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology | Philipps-University of Marburg, Germany

<sup>2</sup>Department of Psychiatry and Psychotherapy | Philipps-University of Marburg, Germany

contact: juliuseg@yahoo.de

Philipps  
Universität  
Marburg

### INTRODUCTION

Advanced paternal age (APA) is considered as a risk factor for the development of neuropsychiatric disorders [1]. This topic becomes more and more the focus of attention, since there is a worldwide trend in industrialized countries in the past couple of decades that fathers are getting older at the time of procreation, while autism spectrum disorders (ASD) diagnoses are climbing steadily since the 1970s. In support of this notion, current epidemiological studies report a correlation between APA and the increased incidence of ASD, schizophrenia, bipolar disorders and bad school achievements [2]. However, the underlying causality is not yet understood. In addition to genetic risk, there are environmental effects and gene-environment interactions contributing to overall liability. Since experimental evidence in humans is not feasible, the development of animal models is needed that allow environmental and genetic confounds to be controlled in order to establish causality between risk factors and brain pathophysiology. Therefore, we recently developed a rat model, comparing offspring from young and old fathers in a detailed and longitudinal study. Current findings show that APA produces behavioural alterations with relevance to all ASD core symptoms [3] in rats. Due to the fact that there is evidence for altered size of hippocampal area in ASD diagnosed patients [4], the brain morphology was investigated at different developmental stages. To have a translational view, a large cohort of healthy human subjects (N=347) was investigated with 3-Tesla structural MRI, the schizotypal personality questionnaire (SPQ-B) as well as the NEO-FFI subscale for neuroticism.

### GENERAL METHODS

Offspring was generated by using 10 triplets (1 male, 2 females) of Wistar rats (RocHan-WIST, Harlan, Venray, The Netherlands) for breeding. Females were 2 months of age and males were either 2 months (n=5, offspring termed CO) or 23 months old (n=5, offspring termed APA). This procedure led to 5 litters per group, each reduced to 8 pups whenever feasible: CO: 20 ♂, 20 ♀ APA: 16 ♂, 20 ♀

To ensure comparable social experience, offspring underwent similar behavioural testing like in first study, including pup isolation, playback of pro-social 50-kHz USV (PND 26) and social play behavior (PND 32-34). On PND 39, half of the rats were sacrificed while the other half was divided into subcohorts. They were tested for (reversal) learning of food sources in a radial-maze paradigm and sacrificed 5 days later by transcardial perfusion. Brains were removed and postfixed. Coronal sections of 40µm were cut on a cryostat and nissl-stained. Hippocampus area was measured in 10 subregions (anterior-posterior from bregma -4.08 mm) with a research microscope (Axio Imager.M2, Zeiss, Göttingen) at 25x magnification using Stereo Investigator (MicroBrightField, Williston, VT, USA).

### HUMAN BEHAVIOUR & MRI DATA

A cohort of healthy subjects was investigated with the SPQ-B, the NEO-FFI (N=677) and structural MRI (N=347). APA contributed linear to schizotypal behavior and elevated levels of neuroticism (tab. 1) as well as hippocampal size (k<sub>v</sub> = 68 voxels; fig. A) and inferior frontal gyrus size (k<sub>v</sub> = 53 voxels; fig. B) in the right hemisphere (controlled for maternal age, subjects' age, sex and level of education).

	Schizotypy (SPQ-B)	Neuroticism (NEO-FFI)
Paternal age	r = .125 p = .001	r = .102 p = .008

### REGION OF INTEREST

Histology of Hippocampus & 10 subregions

Subregion	Area (mm²)	Volume (mm³)
CA1	0.015	0.001
CA2	0.015	0.001
CA3	0.015	0.001
CA4	0.015	0.001
CA5	0.015	0.001
CA6	0.015	0.001
CA7	0.015	0.001
CA8	0.015	0.001
CA9	0.015	0.001
CA10	0.015	0.001
Input	0.015	0.001
Complete	0.015	0.001

### PRELIMINARY RESULTS

**I. PND 39 after behavioural testing:**  
CO: 10 ♂, 10 ♀ APA: 8 ♂, 10 ♀

Trend towards a decreased CA3 Area in the APA group (t-test, CA3: p=.086)

**II. PND 119-194 after behavioural testing and reversal learning:** CO: 8 ♂, 8 ♀ APA: 6 ♂, 7 ♀

Significant reduction of CA3, CA3\_mol, Input and the complete hippocampus area in the APA group (t-test, CA3: p=.023, CA3\_AUC: p=.009, Input: p=.029, complete: p=.029)

**III. Synopsis of both groups:**  
CO: 18 ♂, 18 ♀ APA: 14 ♂, 17 ♀

Significant reduction of CA3 Area, trend towards reduction of the Input Area in the APA group (t-test, CA3: p=.008, Input: p=.051)

### CONCLUSION

- Indications in humans:** APA has linear effects on SPQ-B sum scores and neuroticism and is correlated with alterations in brain morphology, which is in line with reports of increased grey matter volumes in these brain areas in ASD [5].
- Findings in the animal model:** Preliminary results indicate that APA seems to decrease hippocampal measures depending on developmental stage.
- Taken together:** The results show APA-influenced hippocampal alteration. This is a new finding, which might be helpful in understanding the effect of APA on the increased incidence of neuropsychiatric disorders.

### DISCUSSION

- Due to inconsistent findings on hippocampus volume in autistic patients [4;6] it is difficult to diagnose ASD by investigating brain morphology only. However, the combination of anatomic data and behavioural findings make a link to ASD conceivable.
- It is possible that APA rats are more stress-prone which is in line with increased USV emission after isolation. Stress also leads to a decrease of hippocampus size. This might be an alternative explanation for our findings, since rats were food deprived during the reversal learning test.
- Hippocampus size still needs to be adjusted for total brain volume.
- Data set is not complete yet.

### REFERENCES

[1] Malaspina D., Harlap S., Fennig S., Heiman D., Nahon D., Feldman D., Susser E.S., 2001 Advancing paternal age and the risk of schizophrenia. Arch Gen Psychiatry 58, 361-367.

[2] D'Onofrio B.M., Rickett M.E., Frans E., Kujala-Halkola R., Almqvist C., Sjölander A., Larsson H., Lichtenstein P., 2014 Paternal age at childbearing and offspring psychiatric and academic morbidity. JAMA Psychiatry 71, 432-438.

[3] Wöhr M., Scattoni M.L., 2013 Behavioural methods used in rodent models of autism spectrum disorders: current standards and new developments. Behav Brain Res 251, 5-17.

[4] Brambilla P., Hardan A., Uccelli di Niemi S., Perez J., Soares J.C., Barale F., 2003 Brain anatomy and development in autism: review of structural MRI studies. Brain Research Bulletin 61, 557-569.

[5] Barnea-Goraly N., Frazier T.W., Piacenza L., Minshew N.J., Keshavan M.S., Reiss A.L., Hardan A.Y., 2014 A preliminary longitudinal volumetric MRI study of amygdala and hippocampal volumes in autism. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 48, 124-128.

[6] Aylward E.H., Minshew N.J., Goldstein G., Honeycutt N.A., Augustine A.M., Yates K.O., Barta P.E., Pearson G.D., 1999. MRI volumes of amygdala and hippocampus in non-mentally retarded autistic adolescents and adults. Neurology 53, 2145-2150.

This research was supported by an educational grant from the Philipps-University of Marburg (R.K.W. Schwarting, T. Kircher, A. Krug & M. Wöhr)