

**Effekte der *Cacna1c* Haploinsuffizienz auf  
Sozialverhalten und adulte hippocampale  
Neurogenese bei Ratten**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Psychologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Tobias Manuel Redecker

aus Herford

Marburg, 2020

Vom Fachbereich Psychologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer 1080)  
als Dissertation am 30.03.2020 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Markus Wöhr, Syddansk Universitet und Philipps-Universität Marburg

Zweitgutachter: Prof. Dr. Rainer Schwarting, Philipps-Universität Marburg

Tag der mündlichen Prüfung: 30.03.2020

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Summary</b> .....	<b>2</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1.1 Ätiologie neuropsychiatrischer Störungen.....	3
1.1.1 Neuropsychiatrische Störungen und das <i>CACNA1C</i> Gen.....	5
1.1.2 Das <i>CACNA1C</i> Gen.....	5
1.1.3 Effekte von <i>CACNA1C</i> Veränderungen.....	6
1.2 Tiermodelle neuropsychiatrischer Störungen.....	10
1.2.1 Verhaltenstest störungsrelevanter Phänotypen.....	11
1.2.2 Ultraschallvokalisationen.....	13
1.2.2.1 Furchtinduzierte 22-kHz Ultraschallvokalisationen.....	13
1.2.2.2 Appetitive 50-kHz Ultraschallvokalisationen.....	14
1.2.2.2.1 50-kHz USV: Hypothese zum positiven affektiven Zustand.....	15
1.2.2.2.2 50-kHz USV: Hypothese zur kommunikativen Funktion.....	16
1.2.2.3 Subtypen der 50-kHz Ultraschallvokalisationen.....	18
1.2.2.4 Neurobiologie der Ultraschallvokalisationen.....	20
1.2.3 <i>Cacna1c</i> in Nagetiermodellen.....	20
1.2.3.1 <i>Cacna1c</i> in Mausmodellen.....	21
1.2.3.2 <i>Cacna1c</i> im Rattenmodell.....	24
1.3 Neurogenese im adulte Gehirn.....	26
1.3.1 Adulte hippocampale Neurogenese.....	27
1.3.1.1 Verhalten und adulte hippocampale Neurogenese bei Nagetieren.....	30
1.3.1.2 Funktionelle Längsachse der hippocampalen Neurogenese.....	31
1.3.2 <i>Cacna1c</i> und adulte hippocampale Neurogenese.....	31
<b>2 Fragestellung und Hypothesen</b> .....	<b>33</b>
<b>3 Publikationen</b> .....	<b>35</b>
Zusammenfassung der Publikationen.....	35
Studie I: Effects of <i>Cacna1c</i> haploinsufficiency on social interaction behavior and 50-kHz ultrasonic vocalizations in adult female rats.....	35

Studie II: <i>Cacnalc</i> haploinsufficiency lacks effects on adult hippocampal neurogenesis and volumetric properties of prefrontal cortex and hippocampus in female rats .....	36
Studie I.....	37
Ergänzendes Material.....	56
Studie II .....	61
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>91</b>
4.1 Studie I: <i>Cacnalc</i> und Sozialverhalten bei weiblichen adulten Ratten .....	92
4.1.1 Studie I: Methodische Aspekte und Limitationen .....	102
4.2 Studie II: <i>Cacnalc</i> und adulte hippocampale Neurogenese bei Ratten .....	103
4.2.1 <i>Cacnalc</i> und strukturelle Veränderungen des Gehirns von Ratten.....	108
4.2.2 Studie II: Methodische Aspekte und Limitationen.....	111
4.3 Zusammenfassung des Phänotyps adulter weiblicher <i>Cacnalc</i> <sup>+/-</sup> Ratten.....	113
4.4 Einordnung bisheriger Modellierungsansätze von <i>Cacnalc</i> bei Nagetieren .....	114
4.4.1 <i>Cacnalc</i> und Geschlechtseffekte in der präklinischen Forschung.....	116
4.5 Translatationaler Vergleich des <i>Cacnalc</i> <sup>+/-</sup> Rattenmodells.....	117
4.6 Zukunftsperspektiven .....	118
4.7 Abschlussbemerkungen.....	121
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
<b>6 Anhang.....</b>	<b>140</b>
6.1 Nomenklatur.....	140
6.2 Abkürzungen .....	140
6.3 Abbildungsverzeichnis .....	143
<b>7 Danksagung .....</b>	<b>144</b>
<b>8 Lebenslauf.....</b>	<b>146</b>
<b>9 Erklärung.....</b>	<b>150</b>

## ZUSAMMENFASSUNG

Genomweite Assoziationsstudien liefern überzeugende Hinweise darauf, dass das Risikogen *CACNA1C* an der Ätiologie der wichtigsten neuropsychiatrischen Störungen wie Depression, bipolare Störung, Autismus und Schizophrenie beteiligt ist. *CACNA1C* kodiert die porenformende  $\alpha_1C$  Untereinheit des spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals  $Ca_v1.2$ , der durch die Kontrolle des Calciumeinstroms in die Zelle eine wichtige Rolle bei der Regulation neuronaler Erregbarkeit, synaptischer Plastizität und Genexpression einnimmt. Neuropsychiatrische Störungen weisen hohe Komorbiditätsraten und Überlappungen der Symptombereiche auf. Insbesondere Defizite der sozialen Funktionsfähigkeit und Veränderungen des affektiven Zustands sind häufig zu finden. Außerdem wurden Geschlechtseffekte von *CACNA1C* auf Prävalenz und psychologische Eigenschaften berichtet, da weibliche Individuen stärker von *CACNA1C* Mutationen betroffen erscheinen. Genetische Nagetiermodelle bieten einen wichtigen translationalen Ansatz, um grundlegende Pathomechanismen zu untersuchen. Basierend auf Verhaltensstudien an *Cacna1c* Maus- und Rattenmodellen konnten Defizite des Sozialverhaltens, Abweichungen des Affektzustands und geschlechtsabhängige Effekte auf behaviorale Phänotypen gefunden werden.

In dieser Dissertation wurde daher in Studie I ein weibliches haploinsuffizientes *Cacna1c* Rattenmodell verwendet, um den Einfluss von *Cacna1c* auf Sozialverhalten und Kommunikation mittels 50-kHz Ultraschallvokalisationen (USV) zu untersuchen. Die Befunde deuten darauf hin, dass die *Cacna1c* Haploinsuffizienz zu einer reduzierten 50-kHz USV Emission und leichten sozialen Defiziten während der sozialen Interaktion von Weibchen führt, was einen verringerten positiven Affektzustand vermuten lässt.

Diverse Bildgebungsstudien konnten *CACNA1C* Varianten mit Veränderungen des menschlichen Gehirns in Verbindung bringen. Bei *Cacna1c* Nagetiermodellen wurde eine reduzierte adulte hippocampale Neurogenese festgestellt, die an der Ätiologie neuropsychiatrischer Störungen beteiligt ist. In Studie II wurde daher der Einfluss von *Cacna1c* auf Neurogeneseprozesse und Hirnmorphologie weiblicher Ratten untersucht. Im Gegensatz zu vorherigen Studien konnte in Studie II kein Einfluss der *Cacna1c* Haploinsuffizienz auf die adulte hippocampale Neurogenese und Hirnstruktur bei Weibchen gefunden werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die *Cacna1c* Haploinsuffizienz mit einem reduzierten positiven Affektzustand und leicht abweichenden Sozialverhalten von weiblichen Ratten assoziiert ist, während die adulte hippocampale Neurogenese und Hirnanatomie nicht durch die partielle *Cacna1c* Depletion betroffen sind.

## SUMMARY

Genome-wide association studies provide convincing evidence that the risk gene *CACNA1C* is involved in the etiology of all major neuropsychiatric disorders such as depression, bipolar disorder, autism and schizophrenia. *CACNA1C* encodes the pore-forming  $\alpha_{1c}$  subunit of the voltage-dependent L-type  $Ca_v1.2$  calcium channel, which plays an important role in regulating neuronal excitability, synaptic plasticity and gene expression by controlling calcium influx into the cell. Neuropsychiatric disorders also show high comorbidity and overlapping symptoms. In particular, deficits in social functioning and alterations of the affective state are prevalent. Interestingly, sex-dependent effects of *CACNA1C* on the prevalence of neuropsychiatric disorders and psychological characteristics have been reported, as female individuals are more affected by *CACNA1C* mutations than males. Genetically modified rodent models provide an important translational approach to investigate the fundamental pathomechanisms of neuropsychiatric disorders. Using behavioral studies in *Cacna1c* mouse and rat models deficits in social behavior and sex-dependent effects on behavioral phenotypes were repeatedly found. In this dissertation, a female haploinsufficient *Cacna1c* rat model was used to study the impact of *Cacna1c* on social behavior and communication by 50-kHz ultrasonic vocalizations. The findings of Study I suggest that a partial *Cacna1c* depletion leads to a reduction in the emission of 50-kHz ultrasonic vocalizations and mild social deficits during direct social interaction of female rats. Taken together this implies a decreased positive affective state. In *Cacna1c* rodent models, reduced adult hippocampal neurogenesis, which is involved in the pathology of neuropsychiatric disorders, has also been observed along with disorder-like behavioral phenotypes. Therefore, in Study II the effect of *Cacna1c* on different neurogenesis processes and the brain morphology of female rats was investigated. In contrast to previous studies, which primarily used male animals, no influence of *Cacna1c* on adult hippocampal neurogenesis and brain morphology of female rats was found. In summary, a partial *Cacna1c* haploinsufficiency is associated with an reduced positive affective state and mild social deficits in female rats, whereas adult hippocampal neurogenesis and brain anatomy are not affected.

# 1 EINLEITUNG

Mit der zentralen Botschaft „Keine Gesundheit ohne psychische Gesundheit“ erklärten bereits im letzten Jahrzehnt die Gesundheitsminister/innen der europäischen Mitgliedsstaaten psychische Gesundheit als grundlegend für die Lebensqualität der Bevölkerung (Europäische WHO-Konferenz für Psychische Gesundheit, 2005). Die Wichtigkeit dieser Aussage lässt sich aus dem damaligen „Global Burden of Disease“ Bericht ableiten, in dem betont wurde, dass psychische Störungen für etwa 14 % der weltweiten Krankheitslast verantwortlich waren und deutlich höhere Belastungen verursachten als beispielsweise Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Krebs (zur Übersicht siehe: Prince et al., 2007). Weiterhin stützt die Übersichtsarbeit von Wittchen et al. (2011) diese Befunde, da innerhalb der Europäischen Union (EU) die 12-Monats-Prävalenz an einer psychischen Störung zu erkranken auf 40 % geschätzt wurde, was in etwa 165 Millionen betroffene Europäer/innen entspricht. Die hohen volkswirtschaftlichen Kosten von psychischen Störungen, die sich im Jahr 2015 auf 4 % des europäischen Bruttoinlandsprodukts beliefen, weisen außerdem auf die hohe gesellschaftliche Bedeutung dieser Störungen hin (OECD/EU, 2018). Ursachen und auslösenden Faktoren psychischer Störungen sind äußerst komplex und nur teilweise verstanden, daher besteht einer großer Forschungsbedarf, um die Ätiologie dieser Störungsbilder besser zu verstehen.

## 1.1 Ätiologie neuropsychiatrischer Störungen

Moderne Krankheitsmodelle beinhalten biologische, psychologische, umweltbedingte und soziale Faktoren und berücksichtigen die Interaktion dieser miteinander, um die Entstehung neuropsychiatrischer Störungen<sup>1</sup> zu beschreiben (Engel, 1977, 1980; Kinderman, 2005), wobei die Gewichtung dieser Faktoren intensiv diskutiert wird (zur Übersicht siehe: Deacon, 2013; Frances, 2014).

Epidemiologische Studien berichten von Geschlechtsunterschieden in der Prävalenz aller neuropsychiatrischen Störungen. So weisen Frauen beispielsweise höhere Erkrankungsraten von majorer Depression (engl. „Major depressive disorder“; MDD) und bipolarer Störung (BPD) auf, während Männer häufiger an Autismus-Spektrum-Störung (engl. „Autism spectrum disorder“; ASD) und Schizophrenie (SCZ) erkranken (Abel et al., 2010; Eaton et al., 2012; Steel et al., 2014; Halladay et al., 2015). Auf klinischer Ebene weisen neuropsychiatrische Störungen hohe Raten an Komorbiditäten (Steel et al., 2014) und eine teilweise Überlappung

---

<sup>1</sup> Anmerkung: Dieser Begriff wird häufig in der Literatur synonym für psychische Störungen benutzt und aus Gründen der Lesbarkeit im nachfolgenden Text verwendet. Für neuropsychiatrische Störungen wird die Grundannahme getroffen, dass diese psychische Störungen sind, die auf einer Erkrankung des zentralen Nervensystem basieren.

der Symptombereiche auf, wie beispielsweise kognitive Einschränkungen (Millan et al., 2012). Insbesondere Defizite der sozialen Funktionsfähigkeit sind ein wichtiges diagnostisches Kriterium für viele der neuropsychiatrischen Störungsbilder (Kennedy und Adolphs, 2012; Meyer-Lindenberg und Tost, 2012). Diese Überschneidungen lassen bereits gemeinsame, grundlegende Mechanismen in der Ätiologie vermuten.

Auch Zwillings- und Familienstudien weisen auf eine gemeinsame biologische respektive genetische Komponente bei der Entstehung neuropsychiatrischer Störungen hin, da diese Erkrankungen zum Teil eine sehr hohe Gesamterblichkeit (Heritabilität) aufweisen (zur Übersicht siehe: Sullivan et al., 2014). So wird die Heritabilität bei MDD auf ca. 40 % (Mullins und Lewis, 2017) und BPD auf etwa 60 bis 85 % (McGuffin et al., 2003; Lichtenstein et al., 2009) geschätzt. Die Erblichkeit von ASD liegt bei bis zu 90 % (Sandin et al., 2017) und SCZ hat eine geschätzte Heritabilität von ungefähr 60 bis 85 % (Bienvenu et al., 2011; Pettersson et al., 2019). Außerdem treten diese Störungsbilder überdurchschnittlich häufig gemeinsam in betroffenen Familien auf, was auf Überschneidungen der genetischen Faktoren hinweist (Lichtenstein et al., 2009).

Durch große technologische Fortschritte in der letzten Dekade, die mit einer erstmaligen Sequenzierung des menschlichen Genoms einhergingen (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), konnten individuelle Variationen des menschlichen Genoms mittels genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) identifiziert und mit multifaktoriellen Phänotypen, wie neuropsychiatrischen Störungen und psychologischen Eigenschaften, in Verbindung gebracht werden (Horwitz et al., 2018; Nöthen et al., 2019). Mit der zunehmenden Verfügbarkeit großer GWAS-basierter Datensätze für neuropsychiatrische Erkrankungen konnten bereits gemeinsame Ursachen auf molekularer Ebene und polygene Überlappungen aufgezeigt (Gandal et al., 2018) und neue Strategien zur Diagnostik und Behandlung entwickelt werden (Visscher et al., 2017). Interessanterweise zeigten Metaanalysen des internationalen „Psychiatric Genomics Consortium“ (PGC) unter Einschluss bisheriger GWAS, dass Gene, die mit der Calcium-basierten Signalübertragung assoziiert sind, eine besondere Rolle in der Ätiologie der neuropsychiatrischen Störungen spielen (Cross-Disorder Group of the PGC, 2013), was durch sogenannte Pfadanalysen (engl. „Pathway Analysis“) gestützt wurde (O’Dushlaine et al., 2015). Insbesondere für das *CACNA1C* Gen konnte so eine genomweite signifikante Assoziation gefunden werden (Kabir et al., 2016).

Die im Jahr 2014 gegründete Forschergruppe FOR2107 „Neurobiologie affektiver Störungen: Eine translationale Perspektive auf Hirnstruktur und -funktion“ (Kircher et al., 2018) greift diese Befunde auf, um genetische und umweltbedingte Faktoren, die an der Ätiologie und dem

Krankheitsverlauf neuropsychiatrischer Störungen beteiligt sind, weiter zu ergründen. Die umfangreiche Phänotypisierung (klinische Diagnostik, Bildgebung, Neuropsychologie, etc.) von über 2500 Patienten und Kontrollpersonen unter Berücksichtigung von *CACNA1C* Veränderungen wird von einem translationalen tierexperimentellen Projekt begleitet, um neurobiologische Mechanismen mittels eines genetischen *Cacna1c* Rattenmodells zu untersuchen. Dieses Dissertationsprojekt ist im tierexperimentellen Bereich der FOR2107 zu verorten und soll zur weiteren behavioralen und neurobiologischen Phänotypisierung des *Cacna1c* Rattenmodells beitragen.

### **1.1.1 Neuropsychiatrische Störungen und das *CACNA1C* Gen**

Das *CACNA1C* Gen wird als störungsübergreifendes Risikogen angesehen, da es mit den wichtigsten neuropsychiatrischen Störungen, wie den affektiven Störungen, d. h. MDD und BPD, und den Entwicklungsstörungen des Nervensystems, d. h. ASD und SCZ, in Verbindung gebracht werden konnte (Splawski et al., 2005, 2004; Ferreira et al., 2008; Sklar et al., 2008, 2011; Moskvina et al., 2009; Dao et al., 2010; Green et al., 2010; Nyegaard et al., 2010; Ripke et al., 2011, 2014; Witt et al., 2014). Auch wurde wiederholt nachgewiesen, dass eine *de novo* Mutation von *CACNA1C*, die mit einer Verstärkung der Genaktivität (engl. „Gain-of-function“) einhergeht, die Ursache für das Timothy-Syndrom (TS) darstellt, das sich unter anderem durch Symptome der ASD auszeichnet (Splawski et al., 2004, 2005; Liao und Soong, 2010).

Diverse *CACNA1C* Einzelnukleotidpolymorphismen (engl. „Single nucleotide polymorphism“; SNP) konnten durch GWAS identifiziert werden. Insbesondere der intronische SNP rs1006737 gehört zu den am besten replizierten Risiko-SNPs, da dieser wiederholt mit allen der oben genannten Störungsbildern assoziiert wurde (zur Übersicht siehe: Heyes et al., 2015; Moon et al., 2018). Interessanterweise gibt es Hinweise auf geschlechtsabhängige Effekte von *CACNA1C*, da höhere Prävalenzen von MDD und BPD (Dao et al., 2010; Witt et al., 2014) sowie eine verminderte funktionelle Erholung nach einer Episode einer SCZ (Heilbronner et al., 2015) bei weiblichen Patienten mit einem *CACNA1C* Risikoallel nachgewiesen wurden.

### **1.1.2 Das *CACNA1C* Gen**

*CACNA1C* kodiert für die porenformende  $\alpha_1c$  Untereinheit (auch  $Ca_v1.2$ ) eines spannungsabhängigen L-Typ Calciumkanals (engl. „L-Type voltage-gated calcium channel“; LTCC), der zu den hochspannungsabhängigen Calciumkanälen gezählt wird (Bidaud et al., 2006). Die Nomenklatur der LTCCs basiert auf den Proteinen der  $\alpha_1$  Untereinheit, daher wird neben  $Ca_v1.2$  zusätzlich zwischen den drei weiteren LTCCs, namentlich  $Ca_v1.1$ ,  $Ca_v1.3$  und  $Ca_v1.4$ , unterschieden (Catterall, 2011). Die vier Mitglieder der Familie der LTCCs zeigen

unterschiedliche Expressionsmuster im Säugetier. Beispielsweise sind  $Ca_v1.1$  und  $Ca_v1.4$  in der Retina und Skelettmuskulatur aufzufinden (Heyes et al., 2015), während  $Ca_v1.2$  im gesamten Körper verbreitet ist und insbesondere in der Herzmuskulatur und in den meisten neuronalen Zellen exprimiert wird (Striessnig et al., 2014; zur Übersicht siehe: Zamponi, 2015). Genexpressionsanalysen mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion in Mäusegehirnen zeigten, dass  $Ca_v1.2$  mit über 80 % der am häufigsten exprimierte LTCC im Gehirn ist (Sinnegger-Brauns et al., 2009) und insbesondere im Cortex, Hippocampus und Cerebellum gefunden werden kann (Schlick et al., 2010).

Laut Bhat et al. (2012) besteht ein funktionaler  $Ca_v1.2$  Kanal aus den drei folgenden Untereinheiten: 1. die transmembrane  $\alpha1c$  (*CACNA1C* Gen) und  $\alpha2\delta$  (*CACNA2D1-3* Gen) Untereinheit, 2. die intrazelluläre  $\beta$  (*CACNB1-4* Gen) Untereinheit sowie 3. die Calmodulin (*CaM* Gen) Untereinheit. Die Untereinheiten  $\alpha2\delta$ ,  $\beta$  und *CaM* sind vermutlich an der Regulation der Expression und Modulation allgemeiner Eigenschaften von  $Ca_v1.2$  beteiligt (Bhat et al., 2012). Die besondere funktionelle Charakteristik von  $Ca_v1.2$  ist hingegen von der  $\alpha1c$  Untereinheit abhängig. Auf zellulärer Ebene besitzt die  $\alpha1c$  Untereinheit insgesamt 24 Transmembran-Segmente, die vier homologe Domänen mit der Bezeichnung I-IV umfassen. Jede Domäne hat sechs Transmembransegmente (S1-S6), einschließlich des Spannungssensors S4 und der porenbildenden Segmente S5 und S6 (Catterall, 2011; Heyes et al., 2015). Durch diese Eigenschaften beeinflusst  $Ca_v1.2$  den depolarisationsabhängigen Calciumeinstrom in die Zelle und spielt somit eine grundlegende Rolle bei der Gehirnfunktion durch die Regulation der neuronalen Erregbarkeit, der synaptischen Plastizität und der Genexpression (Zamponi, 2015; Kabir et al., 2017c).

### **1.1.3 Effekte von *CACNA1C* Veränderungen**

Die Folgen von *CACNA1C* Mutationen sind aktuell noch nicht vollständig geklärt, da vor allem SNPs, wie rs1006737, auf nicht-kodierenden Abschnitten des Gens liegen und somit zunächst kein direkter Einfluss auf die strukturellen und funktionellen Eigenschaften von  $Ca_v1.2$  angenommen wird. Dennoch wird davon ausgegangen, dass *CACNA1C* SNPs auf Regionen des Gens liegen, die der Transkriptionskontrolle unterliegen, wodurch die SNPs die Genexpression beeinflussen (Kabir et al., 2017c). Passend zu dieser Annahme wurde für rs1006737 eine verringerte Expression von *CACNA1C* in Gehirnen von SCZ und BPD Patienten gefunden (Gershon et al., 2014; Roussos et al., 2014; Eckart et al., 2016).

Im Kontrast dazu berichten Bigos et al. (2010) von einer gesteigerten Expression der *CACNA1C* mRNA (engl. „Messenger RNA“) in post mortem Gewebe von rs1006737 Risikoallelträgern.

Auch in induzierten humanen Neuronen von Trägern des rs1006737 Risikoallels konnte eine erhöhte *CACNA1C* mRNA Expression nachgewiesen werden (Yoshimizu et al., 2015). Klarer hingegen ist die Datenlagen hinsichtlich kodierender *CACNA1C* Varianten, die mit Autismus assoziiert sind, da sinnverändernde Mutationen (engl. „Missense mutationen) von *CACNA1C* (G402S und G406R) mit einer Zunahme der Genaktivität einhergehen (Splawski et al., 2004, 2005). Es kann daher festgestellt werden, dass eine erhöhte sowie verringerte Expression von *CACNA1C* mit neuropsychiatrischen Störungen assoziiert ist.

Auf struktureller und funktioneller Ebene konnten *CACNA1C* mit Veränderung des Gehirns bei gesunden und erkrankten Individuen in Verbindung gebracht werden (Ou et al., 2015; Kabir et al., 2016). In einer ersten strukturell-bildgebenden Studie konnte eine Zunahme der gesamten grauen Substanz gesunder Träger des Risikoallels rs1006737 im Vergleich zu Kontrollpersonen gefunden werden (Kempton et al., 2009). Gestützt wurden diese Befunde durch Wang et al. (2011a), die zeigten, dass Träger des Risikoallels rs1006737 bilateral ein erhöhtes Volumen der grauen Substanz im präfrontalen Cortex (PFC), hier unter anderem im anterioren cingulären Cortex (ACC), aufwiesen. Des Weiteren konnte eine erhöhte Dichte der grauen Substanz der Amygdala und des Hypothalamus bei rs1006737 Risikoallelträgern nachgewiesen werden (Perrier et al., 2011). Eine weitere Studie zeigte Veränderungen der Mikrostruktur der weißen Substanz in der rechten hippocampalen Formation bei rs1006737 Risikoallelträgern im Vergleich zu Kontrollpersonen (Dietsche et al., 2014).

Soeiro-de-Souza et al. (2017) untersuchten in einer weiteren Bildgebungsstudie unterschiedliche Substrukturen des medialen präfrontalen Cortex (mPFC) von weiblichen euthymen BPD Patienten unter Berücksichtigung des Risikoallels rs1006737. Die Autoren konnten eine altersabhängige Verdünnung des linken ACC bei Risikoallelträgerinnen feststellen, was bei Kontrollpersonen nicht der Fall war. Zudem wiesen Risikoallelträgerinnen eine erhöhte Dicke des linken medialen orbitofrontalen Cortex auf. Im Gegensatz dazu berichteten Tesli et al. (2013) keinen Einfluss des Risikoallels rs1006737 auf die frontale, parietale, temporale oder gesamte kortikale Dicke und das Volumen des Hippocampus bei BP und SCZ Patienten. Auch in einer vorherigen Studie konnte kein Einfluss des Risikoallels rs1006737 auf die Morphologie des limbischen Systems, d. h. Hippocampus und Amygdala, nachgewiesen werden (Soeiro-de-Souza et al., 2012).

Neben strukturellen Veränderungen konnten auch diverse Veränderungen auf funktioneller Ebene, d. h. Hirnaktivierungsmuster und Verhalten, mit *CACNA1C* in Verbindung gebracht werden. In einer ersten Studie zeigten Wang et al. (2011a) mithilfe funktioneller Bildgebung auf, dass bei rs1006737 Risikoallelträgern eine verringerte funktionelle Verbindung zwischen

dem PFC und der Amygdala während der Verarbeitung von Gesichtern, die einen ängstlichen, neutralen oder glücklichen Ausdruck hatten, bestand. Im Einklang mit diesen Ergebnissen berichteten Radua et al. (2013), dass rs1006737 mit einer verringerten Konnektivität präfrontaler kortikaler Areale mit limbischen Strukturen während der Verarbeitung negativer Gesichter bei remittierten BPD Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen assoziiert war. Des Weiteren zeigten gesunde rs1006737 Risikoallelträger eine erhöhte Konnektivität innerhalb des emotionalen Gesichtsverarbeitungsnetzwerkes, u. a. eine erhöhte Aktivierung des fusiformen Gyrus und des Hippocampus, wenn diese negative Gesichter verarbeiteten (Dima et al., 2013). Darüber hinaus fanden Krautheim et al. (2018) eine veränderte Aktivierung des ventralen anterioren cingulären Cortex (vACC), der an Erkennung von Gesichtsemotionen beteiligt ist, während Emotionsverarbeitungsaufgaben bei rs1006737 Risikoallelträgern in Abhängigkeit traumatischer Ereignisse, die in der Kindheit erlebt wurden. Zudem konnte auf behavioraler Ebene gezeigt werden, dass rs1006737 mit einer verlangsamten Emotionserkennung von Gesichtern bei rs1006737 Risikoallelträgern assoziiert war (Nieratschker et al., 2015). Zusätzlich lieferten Pasparakis et al. (2015) Hinweise dafür, dass gesunde männliche Träger des rs1006737 Risikoallels im Vergleich zu Kontrollpersonen im Allgemeinen nicht nur ängstlicher und emotional negativer eingestellt waren, sondern auch veränderte emotionale Verarbeitungsprozesse von negativen Bildern aufwiesen, die sich durch eine verstärkte Schreckreaktion auf das Bildmaterial zeigten. Aus diesen Studien lässt sich daher schließen, dass *CACNA1C* Risikoallele mit einer defizitären Verarbeitung von emotionalen Informationen verbunden sein könnten.

Auch ein Einfluss von *CACNA1C* auf kognitive Prozesse konnte bereits nachgewiesen werden, wobei die bisherigen Ergebnisse zum Teil widersprüchlich sind. Beispielsweise wurden bei rs1006737 Risikoallelträgern eine verringerte verbale Sprachproduktion auf semantischer Ebene (Krug et al., 2010), Defizite im Bereich der Aufmerksamkeit (Thimm et al., 2011), ein verschlechtertes Arbeitsgedächtnis (Zhang et al., 2012) und eine reduzierte Lernleistung (Dietsche et al., 2014) gefunden. Diese Veränderungen kognitiver Funktion werden begleitet von abweichenden Hirnaktivierungsmustern, wie einer veränderten hippocampalen Aktivität, während verschiedener Gedächtnisaufgaben (Bigos et al., 2010; Erk et al., 2010, 2014a) und einer veränderten Aktivierung des dorsolateralen präfrontalen Cortex während einer Arbeitsgedächtnisaufgabe (Paulus et al., 2014).

Im Gegensatz dazu konnten andere Studien keine Effekte von rs1006737 auf allgemeine kognitive Funktionen (Roussos et al., 2011), Exekutivfunktionen (Soeiro-de-Souza et al., 2013), Arbeitsgedächtnis (Paulus et al., 2014) sowie verbale Intelligenz und

Gedächtnisfunktion (Erk et al., 2010, 2014a) bei gesunden *CACNA1C* Risikoallelträgern aufdecken. Bei Patienten, die an BPD oder SCZ erkrankt waren, wurden hingegen konsistent negative Effekte von rs1006737 auf die kognitive Leistung nachgewiesen, wie beispielsweise ein eingeschränktes Arbeitsgedächtnis (Zhang et al., 2012) und eine verschlechterte Exekutivfunktion (Soeiro-de-Souza et al., 2013), im Vergleich zu gesunden Risikoallelträgern. Das Risikoallel rs1006737 scheint zudem mit Persönlichkeitsmerkmalen, wie verringerter Extraversion, gesteigerter Ängstlichkeit und erhöhter Schadensvermeidung, assoziiert zu sein (Roussos et al., 2011). Auch wiesen rs1006737 Risikoallelträger in weiteren psychodiagnostischen Erhebungen erhöhte Angst- und Depressionswerte sowie gesteigerte Unsicherheit im Sozialkontakt auf, was mit einer verringerten Aktivierung des Hippocampus einherging (Erk et al., 2010, 2014a). In einer Gen-Umwelt-Interaktionsstudie von Dedic et al. (2018) wurde zudem ein Zusammenhang zwischen einem *CACNA1C* SNP und Traumata im Erwachsenenalter festgestellt, da die Entwicklung von depressiven Symptomen nach traumatischen Ereignissen durch Veränderungen von *CACNA1C* vorhergesagt werden konnte, was darauf hindeutet, dass *CACNA1C* und Umgebungsfaktoren miteinander interagieren.

Darüber hinaus scheint *CACNA1C* geschlechtsspezifische Auswirkungen auf psychologische Merkmale zu haben, was durch die Befunde von Takeuchi et al. (2018) gestützt wird. Die Autoren fanden bei gesunden weiblichen Trägern des rs1024582, der eng mit rs1006737 in Verbindung steht, eine erhöhte Feindseligkeit vor. Dieser Effekt trat bei männlichen Versuchspersonen hingegen nicht auf. Außerdem zeigten weibliche Risikoallelträger in dieser Studie reduzierte intrapersonliche emotionale Intelligenz und erhöhte Schadensvermeidung. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass Strohmaier et al. (2013) gegenläufige Effekte aufdeckten, da männliche rs1006737 Risikoträger erhöhte emotionale Labilität und verringerte Belastbarkeit aufwiesen, während weibliche Risikoallelträger eine erhöhte Resilienz hinsichtlich dieser Faktoren zeigten.

Zusammenfassend kann ein Einfluss von *CACNA1C* auf morphologische und funktionale Domänen als gesichert angesehen werden. Zu erwähnen ist, dass Veränderungen sowohl bei Risikoallelträgern als auch bei erkrankten Individuen aufzufinden sind, was für die Relevanz von *CACNA1C* spricht. Viele der Befunde stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit der psychosozialen Funktionsfähigkeit von betroffenen Individuen. Insbesondere fallen Veränderungen im PFC-Amygdala-Hippocampus Netzwerk auf, wie von Kabir et al. (2016) betont wird. Eine Dysregulation dieses Netzwerkes im Zusammenhang mit *CACNA1C* wird als potenzieller pathophysiologischer Mechanismus bei der Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen diskutiert (Erk et al., 2014b). Die genauen biologischen Mechanismen und

molekularen Signalwege, die durch *CACNA1C* beeinflusst werden, sind aktuell nur rudimentär verstanden, können aber durch den Einsatz von Tiermodellen genauer untersucht werden.

## 1.2 Tiermodelle neuropsychiatrischer Störungen

Tiermodelle bieten eine gute Möglichkeit grundlegende biologische Mechanismen neuropsychiatrischer Störungen zu untersuchen und die Pathophysiologie dieser besser zu verstehen. Nagetiere, insbesondere Mäuse (lat. „*Mus musculus*“) und Ratten (lat. „*Rattus norvegicus*“), repräsentieren die am häufigsten verwendeten Modellorganismen im Bereich der biomedizinischen Grundlagenforschung der letzten Jahrzehnte (Ellenbroek und Youn, 2016). Die Interpretierbarkeit der Tiermodelle hängt maßgeblich von der Validität des jeweiligen Modells ab. Willner (1984) schlug die Unterscheidung dreier Hauptbereiche der Validität vor, die in der aktuellen Forschung von großer Relevanz sind (zur Übersicht siehe: Wöhr und Schwarting, 2010a; Kaiser und Feng, 2015). Es ist besonders wichtig, dass Tiermodelle behaviorale Veränderungen aufweisen, die durch hohe Übereinstimmung mit der menschlichen Symptomatik gekennzeichnet sind (Augenscheinvalidität). Moderne Diagnosesysteme, wie die Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD-10, World Health Organization, 2004) und das Diagnostische und Statistische Manual Psychischer Störungen 5 (DSM-5; American Psychiatric Association, 2013), ordnen Störungsbilder nach ihren beobachtbaren Symptomen ein, was die Wichtigkeit der Augenscheinvalidität von Tiermodellen hervorhebt. Zusätzlich sollte der Modellorganismus analog auf Substanzen reagieren, die zur Behandlung von Symptomen bei menschlichen Störungen verwendet werden (prädiktive Validität). Von ausgesprochener Relevanz ist, dass biologische Veränderungen, die beim Menschen festzustellen sind, zu vergleichbaren Symptomen im Modell führen (Konstruktvalidität). Somit ist die Konstruktvalidität besonders abhängig vom Verständnis der Ätiologie der Störungen, was im Hinblick auf das eingeschränkte Wissen über die Ätiologie neuropsychiatrischer Störungen als kritisch zu betrachten ist. Da neuropsychiatrische Störungen eine hohe Heritabilität aufweisen, ist die Identifizierung genetischer Risikofaktoren mittels GWAS ein entscheidender Schritt zur Steigerung der Konstruktvalidität (Kaiser und Feng, 2015). Die translationale Validität und der Nutzen eines Tiermodells erhöht sich mit einer Steigerung aller der drei genannten Hauptbereiche der Validität.

### 1.2.1 Verhaltenstest störungsrelevanter Phänotypen

Zur Erhebung behavioraler Phänotypen von Nagetieren, die als krankheitsrelevant angesehen werden können, stehen eine große Anzahl an standardisierter Verhaltenstests zur Verfügung (zur Übersicht siehe: Gould, 2009; Kumar et al., 2013; Wöhr und Scattoni, 2013; Ellenbroek und Youn, 2016). Ein weitverbreitetes Verfahren ist der Offenfeldtest (engl. „Open field test“; OF), der zur Messung der allgemeinen Aktivität und des Explorationsverhaltens von Nagetieren verwendet wird (Gould et al., 2009). Darüber hinaus lässt sich durch die Messung der verbrachten Zeit im Zentrum des OF gegenüber der Aufenthaltszeit in den geschützten Randbereichen das Risiko- bzw. Angstverhalten erheben (Seibenhener und Wooten, 2015). Das erhöhte Plus-Labyrinth (engl. „Elevated plus maze“; EPM) ist ein sehr häufig verwendeter Test zur Messung von Angstverhalten bei Nagetieren und greift ebenfalls auf die natürliche Aversion von Nagetieren gegenüber offener Bereiche zurück, d. h. die verbrachte Zeit in den offenen Armen des EPM wird als entgegengesetztes Maß der Angst gewertet (Walf und Frye, 2009; Kumar et al., 2013). Ein weiterer Test zur Messung von angstähnlichem Verhalten ist der Hell/Dunkel Test (engl. „Light/dark test“; LDT), der ebenfalls auf einem Annäherungs- und Vermeidungskonflikt zwischen dem Bestreben, neue Bereiche zu explorieren und einer Vermeidung heller und offener Bereiche basiert (Hascoët und Bourin, 2009a; Arrant et al., 2013).

Depressionsähnliches Verhalten bei Mäusen und Ratten wird häufig mittels des erzwungenen Schwimmtests (engl. „Forced swim tests“; FST) und des Schwanz-Suspensions-Tests (engl. „Tail suspension test“; TST) ermittelt (zur Übersicht siehe: Hascoët und Bourin, 2009b; O’Leary und Cryan, 2009; Castagné et al., 2011). Beide Tests basieren auf der Messung der Immobilität, wenn Nagetiere einer unausweichlichen Situation ausgesetzt sind. Es wird angenommen, dass diese Immobilität einen Zustand ähnlich der Hoffnungslosigkeit widerspiegelt. Während beim FST das Schwimmverhalten in einem Wassertank gemessen und bewegungsloses Schwimmen (engl. „Floating“) als Maßzahl der Verzweiflung fungiert (Can et al., 2011), wird beim TST die Dauer der Bewegungslosigkeit aufgezeichnet, wenn das Versuchstier über Kopf am Schwanz fixiert wird (Powell et al., 2011).

Wie bereits erwähnt, werden neuropsychiatrische Erkrankungen häufig von kognitiven Defiziten begleitet (Millan et al., 2012), daher sind auch translationale Paradigmen zur Messung der kognitiven Fähigkeiten von Bedeutung (zur Übersicht siehe: Vorhees und Williams, 2014; Hölter et al., 2015). Zur Messung des räumlichen Lernens und der Gedächtnisfähigkeit von Nagetieren ist beispielhaft das Morris-Wasserlabyrinth (engl. „Morris Water maze“; MWM) zu nennen. Die Versuchsanordnung besteht aus einem runden Becken, welches mit trübem Wasser

gefüllt und seitlich mit optischen Hinweisreizen versehen ist. Die Versuchstiere werden über mehrere Testtage darin trainiert, die Position einer Plattform, die sich nicht sichtbar unter der Wasseroberfläche befindet, zu finden und die räumliche Position zu memorieren. Als ein behaviorales Ergebnis wird die benötigte Zeit zum Erreichen der Plattform gemessen (Morris, 1981; Williams und Vorhees, 2006). Ein weiteres Verfahren zur Messung des räumlichen Arbeitsgedächtnis ist das von Olton und Samuelson (1976) entwickelte achtarmige Radialarmabyrinth (engl. „Radial arm maze“, RAM). Futterdeprivierte Tiere lernen über mehrere Durchläufe hinweg, an welchem Ende einer der Arme eine Futterbelohnung platziert wurde. Da neben dem Aufsuchen eines „korrekten“ Armes, also ein Arm mit Futter, auch das Betreten eines „falschen“ Armes, d. h. ohne Belohnung, aufgezeichnet wird, ist davon auszugehen, dass der RAM das Arbeitsgedächtnis misst, was mit dem MWM nicht ohne Weiteres möglich ist (Vorhees und Williams, 2014).

In Anbetracht der sozialen Defizite, die bei allen neuropsychiatrischen Störungen auftreten (Kennedy und Adolphs, 2012; Meyer-Lindenberg und Tost, 2012), ist eine Betrachtung des Sozialverhaltens von Nagetieren ein wichtiges Vorgehen, um krankheitsrelevante Phänotypen aufzudecken. Mit dem weit verbreiteten Ansatz zur Messung der sozialen Annäherung in einer Dreikammer-Box (engl. „Three-chambered social approach assay“) lässt sich die Soziabilität von Mäusen beurteilen, indem die Zeit gemessen wird, die ein Versuchstier in einer Seitenkammer mit einer fremden Maus oder in einer Seitenkammer mit einem neuartigen Objekt verbringt (Silverman et al., 2010). Auch bietet sich die Messung der direkten reziproken sozialen Interaktion zweier Versuchstiere unter Auswertung distinkter Verhaltensweisen an, wie beispielsweise anogenitales Riechen, Körperkontakt oder Fellpflege des Partners, um Veränderungen des Sozialverhaltens zu erheben (Silverman et al., 2010; Ferhat et al., 2016). Von Vorteil ist dabei eine Betrachtung des Sozialverhaltens über verschiedene Alterstufen hinweg. Der Spielkampf (engl. „Rough-and-tumble play“) juveniler Ratten ist für die Tiere nicht nur stark appetitiv (Vanderschuren et al., 2016), sondern auch wichtig für die Entwicklung des Gehirns und eines angemessenen Sozialverhaltens im Erwachsenenalter (Pellis und Pellis, 2007). Beispielsweise hat eine soziale Isolation von Ratten während der Adoleszenz, in der die Tiere besonders hohe Raten an Spiel zeigen (Panksepp, 1981), negative Effekte auf das Sozialverhalten der Tiere im adulten Alter (Seffer et al., 2015).

Die Verwendung von Ratten als Modellorganismus für die Untersuchung des Sozialverhaltens kann die translationale Validität der Tiermodelle erhöhen, da sie in hierarchischen Gruppen leben und mehr Sozialverhalten, aber weniger territoriales und aggressives Verhalten aufweisen als Mäuse (Ellenbroek und Youn, 2016; Homberg et al., 2017). Zudem haben Ratten ein

deutlich komplexeres Kommunikationsverhalten mittels sogenannter Ultraschallvokalisationen (USV), die ein wichtiges translationales Werkzeug zur Messung des Sozial- und Kommunikationsverhaltens sowie des Affektzustands von Nagetieren darstellen.

## **1.2.2 Ultraschallvokalisationen**

Ratten und Mäuse verfügen über die Fähigkeit, Rufe oberhalb der menschlichen Hörschwelle von ungefähr 20 kHz zu emittieren und wahrzunehmen. Die Rufe bieten eine gute Möglichkeit die Kommunikation und emotionale Zustände von Nagetieren zu untersuchen (zur Übersicht siehe: Brudzynski, 2013; Wöhr und Schwarting, 2013). USV von Ratten weisen deutlich komplexere Merkmale im Vergleich zu Mäusen auf (Homberg et al., 2017) und sind somit im Bereich der translationalen Forschung ein wichtiges Werkzeug zur Erforschung psychologischer Zustände der Tiere, die mit den bereits erwähnten Verhaltensparadigmen möglicherweise nicht erfasst werden können (Wöhr und Schwarting, 2013). So lassen sich insbesondere Defizite im Sozialverhalten bzw. der Kommunikation in Tiermodellen neuropsychiatrischer Erkrankungen aufdecken und die translationale Validität dieser Modelle weiter stärken (Wöhr und Schwarting, 2010a). USV lassen sich in Abhängigkeit von Entwicklungsstand, Umweltbedingungen und affektiven Zustand der Ratte anhand ihrer akustischen Parameter unterscheiden (Portfors, 2007; zur Übersicht siehe: Brudzynski, 2013; Wöhr und Krach, 2017). Es wird aktuell angenommen, dass Ratten drei distinkte Arten an USV, namentlich 40-kHz, 22-kHz und 50-kHz USV, emittieren. Kurz nach der Geburt bis zum Absetzen sind bei Jungtieren 40-kHz USV zu finden, wohingegen bei adulten Tieren 22-kHz und 50-kHz USV auftreten.

### ***1.2.2.1 Furchtinduzierte 22-kHz Ultraschallvokalisationen***

In aversiven Situationen emittieren juvenile und adulte Ratten 22-kHz USV (zur Übersicht siehe: Wöhr und Schwarting, 2010b). Diese USV zeichnen sich durch einen Frequenzbereich um 22 kHz, lange Rufzeiten von über 1000 ms und geringe Frequenzmodulation aus. 22-kHz sind mit einem Lautstärkepegel von 65-85 db deutlich lauter als die anderen USV Ruftypen (Wöhr et al., 2005; Brudzynski, 2013; Wöhr und Schwarting, 2013). Den 22-kHz USV wird eine affektive Komponente zugewiesen, da sie in aversiven Situationen, wie Konfrontation mit Fressfeinden (Blanchard et al., 1991), Kampf bzw. sozialer Unterlegenheit (Sales, 1972; Burgdorf et al., 2008), und während des Entzugs von Drogen, wie z. B. Kokain (Covington und Miczek, 2003), auftreten. Im Labor wird häufig die Furchtkonditionierung zur Induktion von 22-kHz USV verwendet (Borta et al., 2006; Wöhr und Schwarting, 2008a). Typischerweise korreliert die Emission von 22-kHz USV mit der Verhaltensstarre, welche als ein typisches

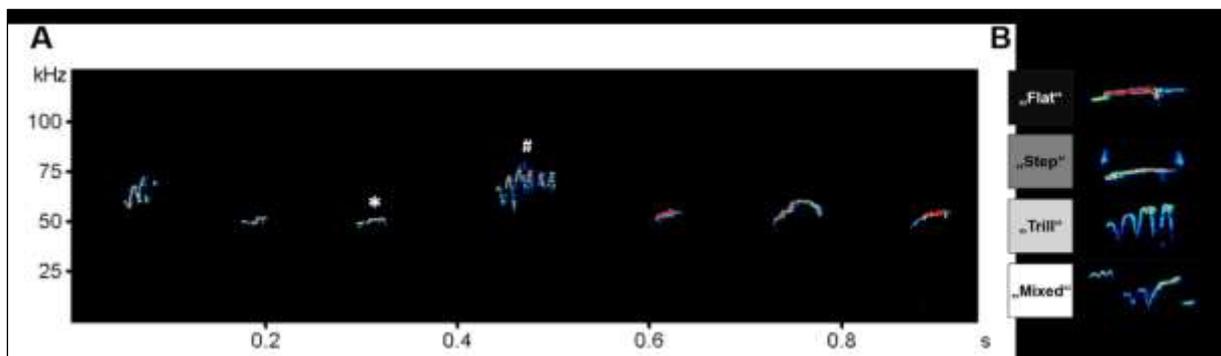
Angstmaß bei Ratten verwendet wird (Wöhr und Schwarting, 2008b, 2008a). Darüber hinaus zeichnen sich Ratten mit einer erhöhten Ängstlichkeit durch gesteigerte 22-kHz USV Rufraten im Vergleich zu weniger ängstlichen Vergleichstieren aus (Borta et al., 2006). Das Rufverhalten mittels 22-kHz USV ist nicht nur von individuellen Faktoren, sondern auch von diversen Umweltfaktoren abhängig. Beispielsweise zeigten Yee et al. (2012), dass bei adulten Ratten die 22-kHz USV Anzahl stark erhöht ist, wenn diese in ihrer Entwicklung verschiedenen Stressoren ausgesetzt waren. Auch die Aktivierung des mütterlichen Immunsystems mittels des Immunstimulans Polyinosinic-polycytidylic-Säure (poly I:C) während der Schwangerschaft sorgte für eine erhöhte 22-kHz USV Emission bei adulten Ratten (Yee et al., 2012b). In einem Angstkonditionierungsexperiment konnten Wöhr et al. (2005) demonstrieren, dass die Anzahl von 22-kHz USV im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Kurve mit der gesteigerten Fußschockintensität während einer Lernphase zunahm. Interessanterweise fanden die Autoren den gleichen Effekt in der Testphase, wenn der vorab konditionierte Stimulus ohne den dazugehörigen Schock präsentiert wurde, was darauf hindeutet, dass 22-kHz USV insbesondere den negativen affektiven Zustand des Versuchstieres anzeigen und weniger ein Indikator für Schmerzempfinden sind.

Eine weit verbreitete Hypothese lautet, dass 22-kHz USV zur Alarmierung von Artgenossen bei Gefahr dienen und dieser Ruftyp daher eine besondere Rolle bei der Kommunikation von Ratten spielt (zur Übersicht siehe: Brudzynski, 2013; Wöhr und Schwarting, 2013). Gestützt wird diese Hypothese durch frühere Studien von Blanchard et al. (1991), die die Funktion von 22-kHz USV in Gruppen von Ratten in einem naturalistischen und durchsichtigen Höhlensystem untersuchten. Die Autoren wiesen nach, dass die Emission von 22-kHz USV in Reaktion auf ein Raubtier, in diesem Falle eine Katze, hauptsächlich bei Anwesenheit von Artgenossen zu finden war. Dieser sog. Publikumseffekt (engl. „Audience effect“) auf die Emission von 22-kHz USV konnte jedoch nicht im Labor repliziert werden (Wöhr und Schwarting, 2008a). Playback-Experimente stützen weiter die Annahme, dass 22-kHz USV eine Alarmfunktion besitzen, da diese Rufe behaviorale Veränderungen, wie beispielsweise eine Inhibition der lokomotorischen Aktivität, verursachen (Endres et al., 2007; Wöhr und Schwarting, 2007).

#### ***1.2.2.2 Appetitive 50-kHz Ultraschallvokalisationen***

In positiven Situationen, wie Paarung (Thomas und Barfield, 1985; White et al., 1990), juvenilem Spielverhalten (Knutson et al., 1998; Lukas und Wöhr, 2015), und nach der Verabreichung von Psychostimulanzien, wie Amphetamin (AMPH; Burgdorf et al., 2001;

Engelhardt et al., 2017), emittieren juvenile und adulte Tiere 50-kHz USV, die in einem vergleichsweise breiten Frequenzbereich von 30 bis 90 kHz zu finden sind, wobei die meisten Rufe hauptsächlich zwischen 50 und 70 kHz auftreten (Abbildung 1A). Mit einer Rufdauer von meist unter 50 ms sind sie zudem im Vergleich zu den 22-kHz USV recht kurz (Wöhr und Schwarting, 2013). Im Allgemeinen scheint die Emission der 50-kHz USV einer großen interindividuellen Variabilität zu unterliegen, wenngleich die Rufraten intraindividuell betrachtet, recht stabil erscheinen (Schwarting et al., 2007), so dass angenommen wird, dass mittels 50-kHz USV charakterähnliche Unterschiede zwischen Versuchstieren gemessen werden können (Engelhardt et al., 2018).



**Abbildung 1:** 50-kHz Ultraschallvokalisationen. (A) Repräsentatives Spektrogramm von 50-kHz USV, die während der direkten wechselseitigen sozialen Interaktion von weiblichen adulten *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Ratten aufgenommen wurden. Zu erkennen ist eine deutliche Variabilität des Erscheinungsbildes individueller Rufe, die (B) eine Einordnung in verschiedene 50-kHz USV Subtyp zulässt (Pereira et al., 2014). \* kennzeichnet beispielhaft den Subtyp „Flat“, während # den Subtyp „Trill“ zeigt.

Die Funktion von 50-kHz USV wird seit längerem diskutiert und zwei unterschiedliche Annahmen haben sich herausgebildet, die aber nicht als gegensätzlich anzusehen sind. Eine Hypothese besagt, dass 50-kHz USV den positiven affektiven Zustand der Ratten widerspiegeln, da sie in appetitiven Situationen auftreten (Brudzynski, 2013; Wöhr und Schwarting, 2013; Wöhr, 2018). Der zweite Ansatz rechnet den 50-kHz USV eine wichtige kommunikative Komponente zu, da sie in vielen sozialen Kontexten auftreten und Annäherungsverhalten bei Ratten auslösen (Wöhr und Schwarting, 2007; Seffer et al., 2014; Wöhr, 2018).

#### 1.2.2.2.1 50-kHz USV: Hypothese zum positiven affektiven Zustand

Da 50-kHz USV in appetitiven Situationen auftreten, wird davon ausgegangen, dass sie einen positiven affektiven Zustand der Ratten widerspiegeln (zur Übersicht siehe: Brudzynski, 2013; Wöhr und Schwarting, 2013; Wöhr, 2018). Panksepp (2005) ging sogar soweit, diesen Ruftyp als „Lachen der Ratten“ zu bezeichnen und in 50-kHz USV einen evolutionären Vorläufer der menschlichen Freude zu sehen (Panksepp und Burgdorf, 2003). Bei juvenilen Tieren kann eine hohe Anzahl an appetitiven 50-kHz USV während des Spielkampfes zweier Jungtiere

beobachtet werden (Knutson et al., 1998; Lukas und Wöhr, 2015; Kisko et al., 2018). Nicht nur während des Spiels an sich, sondern auch in Erwartung von Spiel mit einem Artgenossen, emittieren juvenile Ratten eine hohe Anzahl an 50-kHz USV (Knutson et al., 1998), was die starke appetitive Komponente des innerartlichen Spielverhaltens bekräftigt.

Im Labor kann das juvenile Spielverhalten im heterospezifischen Spiel mittels sog. Kitzel-Experimente (engl. „Tickling“) verlässlich nachgestellt werden (zur Übersicht siehe: LaFollette et al., 2017). Das Kitzeln eines Versuchstieres durch einen menschlichen Versuchsleiter führt zu einem hohen Ausstoß von 50-kHz USV (Panksepp und Burgdorf, 2000; Wöhr et al., 2009). Insbesondere das Kitzeln dorsaler und ventraler Seiten des Körpers verursacht viele 50-kHz USV (Panksepp und Burgdorf, 2003; Schwarting et al., 2007; Ishiyama und Brecht, 2016). Auch zeigten Panksepp und Burgdorf (2003), dass Ratten, die eine hohe Emission von 50-kHz USV aufwiesen, das Kitzeln als besonders positiv empfanden, da diese Versuchstiere die Hand des Versuchsleiters in kürzester Zeit nach Beginn des Experiments aufsuchten. Die Autoren wiesen zudem nach, dass die reine Präsentation von Reizen, die mit dem „Tickling“ verbunden sind, z. B. die Hand des Versuchsleiters, bereits 50-kHz USV auslösten. Passenderweise scheinen angstausslösende und aversive Situationen, wie helles Weißlicht zur Beleuchtung bei Tickling-Experimenten (Ishiyama und Brecht, 2016) oder beim juvenilen Spielkampf (Knutson et al., 1998), die Produktion von 50-kHz USV zu verringern.

Ein weiterer Ansatz, um eine hohe Emission von 50-kHz USV hervorzurufen, ist die Verwendung von Psychostimulanzien (zur Übersicht siehe: Rippberger et al., 2015), wie AMPH oder Kokain (Barker et al., 2010; Natusch und Schwarting, 2010; Pereira et al., 2014; Engelhardt et al., 2017). Da AMPH bei gesunden Personen manieähnliche Symptome und bei Patienten mit BPD eine manische Episode hervorrufen kann, wird zudem auf translationaler Ebene diskutiert, ob AMPH-induzierte 50-kHz USV manieähnliche positive Zustände bei Ratten widerspiegeln (Rippberger et al., 2015). Unterstützt wird diese Annahme durch Befunde, dass Lithium, ein Phasenprophylaktikum zur Behandlung von BPD, die erhöhte Anzahl an 50-kHz USV nach AMPH Injektion reduzieren kann (Pereira et al., 2014; Wendler et al., 2016).

#### 1.2.2.2 50-kHz USV: Hypothese zur kommunikativen Funktion

Die kommunikative Funktion der 50-kHz USV wurde zunächst im Kontext der Paarung von Ratten studiert, wo 50-kHz USV eine bedeutsame Rolle bei der Kontaktaufnahme und -aufrechterhaltung im sexuellen Kontext einnehmen (Thomas und Barfield, 1985; Barfield und Thomas, 1986; White et al., 1990). Nachfolgende Studien fokussierten die kommunikative Funktion von 50-kHz USV in weiteren sozialen Kontexten und Wöhr (2018) diskutiert in seiner

ausführlichen Übersichtsarbeit die Rolle von 50-kHz USV als sozioaffektive Signale mit einer wichtigen kommunikativen Funktion, insbesondere als soziale Kontaktrufe. Gestützt wird diese Annahme beispielsweise durch eine Studie von Panksepp et al. (2002), die nachwies, dass adoleszente Ratten mehr Zeit mit einer erwachsenen Ratte verbrachten, wenn diese eine hohe Anzahl an 50-kHz USV emittierten, als mit Tieren, die vergleichsweise wenige 50-kHz USV ausstießen. Burgdorf et al. (2009) konnten außerdem basierend auf einem Zuchtansatz zeigen, dass Ratten, die spezifisch für eine geringe Emission von 50-kHz USV gezüchtet wurden, weniger Zeit mit einem Artgenossen verbrachten als Kontrolltiere, die aus einer klassischen Zucht stammten.

Weitere überzeugende Hinweise für die kommunikative Komponente von 50-kHz USV stammen aus der Untersuchung von 50-kHz USV während des juvenilen Spielverhaltens. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Emission von 50-kHz USV mit appetitiven Komponenten des juvenilen Spielkampfes, wie der dorsale Kontakt mit dem Artgenossen, korreliert war und bereits die Erwartung von Spiel mit einem Artgenossen 50-kHz USV bei den Ratten auslöste (Knutson et al., 1998). Des Weiteren wurde festgestellt, dass 50-kHz USV während des Spielkampfes als Spielsignale dienen und zur Aufrechterhaltung des spielerischen Kontakts beitragen (Himmler et al., 2014). Gestützt wird diese Annahme durch Kisko et al. (2015b, 2015a), die nach einer chirurgischen Devokalisierung von juvenilen Ratten eine starke Verringerung des Spielverhaltens verzeichneten.

Bei adulten Ratten lösen bereits olfaktorische Hinweisreize auf andere Ratten (Brudzynski und Pniak, 2002) und eine kurzzeitige Trennung von Artgenossen (Wöhr et al., 2008) die Emission von 50-kHz USV aus. Auch scheinen 50-kHz USV eine elementare Funktion bei der sozialen Interaktion von adulten Ratten zu besitzen, da 50-kHz USV vermutlich aggressives Verhalten verhindern (Kisko et al., 2015a), was nicht nur die Annahme stützt, dass 50-kHz USV sozialen Kontakt aufbauen und aufrechterhalten, sondern auch zur Steuerung sozialer Interaktionen beitragen.

Auch die akustische Präsentation von appetitiven 50-kHz USV in Playback-Studien (zur Übersicht siehe: Seffer et al., 2014) verursacht bei juvenilen und adulten Ratten Annäherungsverhalten in Richtung der Schallquelle, was die Funktion von 50-kHz USV als soziale Kontaktrufe stützt, wie mittels des von Schwarting und Wöhr entwickelten 50-kHz USV Playback-Paradigmas auf einem RAM gezeigt werden konnte (Wöhr und Schwarting, 2007, 2012; Kisko et al., 2018). Dieser experimentelle Ansatz bietet eine gute Möglichkeit, verschiedene Fragestellungen im Kontext der Kommunikation und des Sozialverhaltens von Ratten zu untersuchen. Exemplarisch konnte gezeigt werden, dass die behaviorale Antwort des

Empfängertieres von akustischen Parametern der 50-kHz USV abhängig ist, da Ratten auf 50-kHz USV und in geringerem Maße auf 50-kHz USV-Sinustöne, mit sozialem Annäherungsverhalten reagierten, während 22-kHz USV und Kontrollstimuli, wie weißes Rauschen, keine soziale Annäherung verursachten (Wöhr und Schwarting, 2007, 2012).

### ***1.2.2.3 Subtypen der 50-kHz Ultraschallvokalisationen***

Um die Funktion der appetitiven 50-kHz USV weiter zu ergründen, wurden unterschiedliche Ansätze zur Klassifikation der Rufe vorgeschlagen und eine Verknüpfung mit verschiedenen Verhaltensweisen durchgeführt (Burgdorf et al., 2008; Wright et al., 2010; Pereira et al., 2014). In einem ersten Ansatz verwendeten Burgdorf et al. (2008) eine zweiteilige Kategorisierung basierend auf der Frequenzmodulation, d. h. sie unterschieden zwischen 50-kHz USV mit einer konstanten Frequenz (engl. „Flat“) und frequenzmodulierten (FM) 50-kHz USV. Laut der Autoren können FM 50-kHz USV ebenfalls eine „Flat“-Komponente aufweisen, müssen aber entweder einen sog. Triller (engl. „Trill“) und/oder eine Stufenkomponente (engl. „Step“) enthalten. Insgesamt berichten Burgdorf et al. (2008), dass über 90 % der FM 50-kHz USV mindestens zwei oder mehr Komponenten besaßen. Interessanterweise waren die FM Rufe positiv mit appetitiven Verhaltensweisen während der Paarung und des Spielverhaltens korreliert, wohingegen „Flat“ Rufe nicht mit appetitiven Verhaltensweisen oder Belohnung assoziiert waren (Burgdorf et al., 2008).

In einer weiteren Studie unterschieden Wright et al. (2010) mittels umfangreicher Analysen, die auf verschiedenen strukturellen und akustischen Eigenschaften basierten, insgesamt 14 50-kHz USV Subtypen. Sie beschrieben die Subtypen vor allem auf Basis der Zusammensetzung verschiedener Komponenten, wie beispielsweise „Flat-Trill“ Rufe, und weiterer optischer Eigenschaften, z. B. umgekehrt u-förmig Rufe. Die Autoren zeigten, dass sich das Profil der Subtypen in Abhängigkeit vom sozialen Kontext und der Verabreichung von AMPH änderte. Beispielsweise produzierten Ratten in einer Dyade, d. h. zwei Tiere in direkter Interaktion miteinander, deutlich höhere Anteile an „Trill“ Rufen, als wenn diese Tiere getrennt untersucht wurden. Auch nahm das Verhältnis von „Trill“ Rufen nach der Injektion von AMPH im Vergleich zu Kochsalzlösung deutlich zu. Wright et al. (2010) analysierten zudem die akustischen Parameter, d. h. Dauer, Bandbreite und mittlere Spitzenfrequenz, der 14 Subtypen. Sie fanden stabile interindividuelle Unterschiede in der Anzahl der 50-kHz USV bzw. der Subtypen und in den akustischen Parametern. Die akustischen Parameter unter den Testbedingungen (sozial vs. getrennt bzw. AMPH vs. Kochsalz) unterschieden sich interessanterweise nur marginal.

Einen Mittelweg mit insgesamt vier Subtypen von 50-kHz USV (engl. „Flat“, „Step“, „Trill“ und „Mixed“; Abbildung 1B) wurde von Pereira et al. (2014) gewählt und in weiteren Studien wiederholt validiert (Wöhr et al., 2015; Engelhardt et al., 2017; Kisko et al., 2018, 2019). Die „Flat“ Rufe wurden in diesem Falle als Rufe mit einer einzigen Komponente sowie einer Änderung der Spitzenfrequenz unter 5 kHz spezifiziert. Auch steiler an- oder absteigende Rufe mit einer Komponente wurden den „Flat“ Rufen zugeordnet. Diese Einordnung entspricht somit den „Flat“ Rufen von Burgdorf et al. (2008) und Wright et al. (2010). Die Autoren gingen außerdem davon aus, dass FM 50-kHz USV basierend auf ihrer visuellen Struktur unterscheidbar sind und führten daher den „Step“ Subtype ein, der sich durch eine „Flat“ Komponente und mindestens einem überlappenden und höher bzw. tiefer liegenden kurzen „Flat“ Element auszeichnete. Der sog. „Trill“ Rufotyp wurde als ein einzelnes „zickzackförmiges“ Rufelement definiert. Alle FM 50-kHz USV, die nicht in eine der beiden o. g. Kategorien eingeordnet werden konnten, da diese z. B. eine „Trill“ und eine „Step“ Komponente aufwiesen, wurden zu den „Mixed“ Subtypen gezählt. Auch mit diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass nach der Injektion von AMPH das Profil der Subtypen in Richtung „Trill“ Rufe verschoben wird (Pereira et al., 2014).

Eine Annahme dieser Klassifikationsansätzen ist, dass bestimmte 50-kHz USV Subtypen mit spezifischen Verhaltensweisen assoziiert sind und Ratten diese in bestimmten Kontexten einsetzen. Es wurde vorgeschlagen, dass FM 50-kHz USV positiven Affekt, appetitives Verhalten und Belohnung widerspiegeln (Burgdorf et al., 2011), da vor allem „Trill“ Rufe wiederholt damit in der Verbindung gebracht wurden (Burgdorf et al., 2008; Wright et al., 2010; Wöhr et al., 2015). Gestützt wird diese Annahme durch ein Selbstverabreichungsparadigma, da sich Ratten Playback von FM 50-kHz USV selbst verabreichen, während dies bei „Flat“ Rufen nicht zu finden ist (Burgdorf et al., 2008).

Des Weiteren wurde für den „Flat“ Subtyp die Hypothese aufgestellt, dass dieser zum Herstellen von sozialem Kontakt dient, da „Flat“ Rufe bei Trennung von den Artgenossen verzeichnet wurden (Wöhr et al., 2008; Wright et al., 2010). Interessanterweise reagierten Ratten auch auf das Playback von 50-kHz Sinustönen mit Annäherungsverhalten, was Hinweise darauf liefert, dass die Frequenzmodulation der 50-kHz USV in diesem Kontext nicht als verhaltenssteuernd anzusehen ist (Wöhr und Schwarting, 2007). Detaillierte zeitliche Analysen von 50-kHz USV und Verhaltensweisen von Ratten lieferten weiterhin Hinweise, dass USV eine bedeutende Rolle bei der Regulierung des sozialen Verhaltens von Nagetieren spielen (Himmler et al., 2014; Burke et al., 2017, 2018; Kisko et al., 2018, 2019). Zum Beispiel ergab eine Studie von Burke et al. (2017), dass 50-kHz USV wichtig für die Koordination des

Spielverhaltens erwachsener männlicher Ratten waren und insbesondere USV mit einer flachen Komponente bedeutsam für die Vermeidung von aggressivem Verhalten sein könnten.

#### **1.2.2.4 Neurobiologie der Ultraschallvokalisationen**

Es wurden bereits diverse Experimente durchgeführt, um die neurobiologischen Prozesse der USV-basierten Kommunikation von Nagetieren zu untersuchen (Burgdorf et al., 2007; Brudzynski, 2013). Interessanterweise scheinen sich die gegenläufigen behavioralen Verhaltensmuster der furchtinduzierten 22-kHz und appetitiven 50-kHz USV ebenfalls in eigenständigen neuronalen Aktivierungsmustern des Rattengehirns widerzuspiegeln. Mittels eines immunohistochemischen Ansatzes zur Messung der frühen Genexpression (C-Fos) fanden Sadananda et al. (2008) nach der Präsentation von 22-kHz USV Playback einen Anstieg der Aktivität in Hirnregionen, wie der Amygdala und dem zentralen Höhlengrau, die an Angstreaktionen beteiligt sind (Canteras et al., 2010). Kongruent zu diesem Ergebnis wiesen Parsana et al. (2012) mittels Einzelzelleableitung eine erhöhte Aktivität der Amygdala nach dem Playback von 22-kHz USV nach. Die Autoren deckten zudem auf, dass appetitive 50-kHz USV die elektrophysiologische Aktivität der Amygdala reduzieren konnten. Begleitend dazu konnte nach der Präsentation von appetitiven 50-kHz USV eine erhöhte Aktivität im Nucleus accumbens (NAc; Sadananda et al., 2008; Pultorak et al., 2016), der insbesondere bei Belohnungsverarbeitung involviert ist (Salamone und Correa, 2012), und im ACC (Saito und Okanoya, 2017) gemessen werden. Kongruent dazu fanden Willuhn et al. (2014) durch Einsatz zyklischer Voltammetrie eine phasische Dopaminausschüttung im NAc, die zugleich mit sozialem Annäherungsverhalten korrelierte, in Reaktion auf 50-kHz USV Playback. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich die neuronalen Aktivierungsmuster, u. a. auf limbischer Ebene, mit den Annahmen zur Valenz der Rufstypen, d. h. appetitive versus aversiv, decken. Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen 22-kHz und 50-kHz USV und der adulten Neurogenese im Hippocampus hergestellt werden (Wöhr et al., 2009), wie in Kapitel 1.3.1 näher erläutert wird.

### **1.2.3 *Cacnalc* in Nagetiermodellen**

Der Einfluss einer *Cacnalc* Dysfunktion auf Phänotypen, die mit neuropsychiatrischen Erkrankungen assoziiert sind, wurde insbesondere in Mausmodellen (zur Übersicht siehe: Kabir et al., 2017c; Moon et al., 2018) untersucht. Ein großer Teil dieser Studien verwendete dazu einen Ansatz zur Gendeaktivierung (engl. „Knockout“). Es wurden konstitutive heterozygote *Cacnalc* (*Cacnalc*<sup>+/-</sup>) Mausmodelle untersucht und mit *Cacnalc* Wildtyp (*Cacnalc*<sup>+/+</sup>) Kontrolltiere verglichen (Dao et al., 2010; Lee et al., 2012; Zanos et al., 2015; Bavley et al.,

2017; Dedic et al., 2018). Im Allgemeinen sind homozyote (*Cacnal1c*<sup>-/-</sup>) Tiere nicht überlebensfähig (Seisenberger et al., 2000). Darüber hinaus gibt es ein Ca<sub>v</sub>1.2 TS Mausmodell mit einer Ca<sub>v</sub>1.2 Gain-of-function Mutation (Bader et al., 2011; Kabitzke et al., 2018).

In weiteren Studien wurden ein Knockout von *Cacnal1c* regionspezifisch (Moosmang et al., 2005; McKinney et al., 2008; White et al., 2008; Jeon et al., 2010; Lee et al., 2012; Kabir et al., 2017b, 2017a; Terrillion et al., 2017b), zellspezifisch (Temme et al., 2016; Völkening et al., 2017; Dedic et al., 2018) sowie während unterschiedlicher Entwicklungsstufen (Dedic et al., 2018) durchgeführt. Seit einigen Jahren wird ein vergleichsweise neues konstitutives *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodell verwendet (Braun et al., 2018, 2019; Kisko et al., 2018, 2019; Moon et al., 2018; Sykes et al., 2018b), um den Einfluss von *Cacnal1c* auf Endophänotypen neuropsychiatrischer Störungen genauer herauszuarbeiten.

### **1.2.3.1 *Cacnal1c* in Mausmodellen**

Diverse behaviorale Phänotypen und molekulare Signalwege, die im Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Störungen stehen, wurden in den präklinischen Mausmodellen untersucht (zur Übersicht siehe: Moon et al., 2018). Defizite des Sozialverhaltens sowie Stimmungs- und Emotionsänderungen, die sich häufig in Angst und Depression manifestieren, sind Kernmerkmale der o. g. Störungsbilder und der Einfluss von Ca<sub>v</sub>1.2 auf neuronale Mechanismen, die der Pathophysiologie der Störungen zugrunde liegen, z. B. Veränderungen des PFC-Amygdala-Hippocampus Netzwerkes, wurden in den Mausmodellen exploriert (zur Übersicht siehe: Kabir et al., 2016).

Bezüglich der *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Mäuse, die sich durch eine global reduzierte Expression von *Cacnal1c* auszeichnen, konnte ein erhöhter angstähnlicher Phänotyp bei weiblichen (Dao et al., 2010; Lee et al., 2012) und bei männlichen *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Mäusen ermittelt werden (Bader et al., 2011; Lee et al., 2012). Ein Knockout von *Cacnal1c* spezifisch im Vorderhirn und im PFC ging außerdem mit einer gesteigerten Ängstlichkeit der Versuchstiere einher, was eine wichtige Funktion der *Cacnal1c* Expression im Vorderhirn bei der Regulation von Angst vermuten lässt (Lee et al., 2012). Im Gegensatz dazu konnte beim Ca<sub>v</sub>1.2 TS Mausmodell, welches eine Gain-of-function Mutation von Ca<sub>v</sub>1.2 aufweist, keine Veränderung der Angstverhaltens gefunden werden (Bader et al., 2011), was darauf hindeutet, dass besonders ein Funktionsverlust von *Cacnal1c* ein angstähnliches Verhalten bedingt. Auf translationaler Ebene stehen die Befunde im Einklang mit verschiedenen Humanstudien, die erhöhte Angstwerte bei *CACNA1C* Risikoallelträgern fanden (Erk et al., 2010, 2014a; Pasparakis et al., 2015).

Weiterhin gibt es Hinweise, dass *Cacnalc* an der Regulation depressionsähnlichem Verhaltens beteiligt ist. Dao et al. (2010) berichteten in einer ersten Studien von einem antidepressiven Phänotypen bei *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Mäusen unter Verwendung des FST und TST, was in nachfolgenden Studien bestätigt werden konnte (Bavley et al., 2017; Kabir et al., 2017b; Dedic et al., 2018). Darüber hinaus genügt auch ein spezifischer Knockout von *Cacnalc* im adulten PFC (Kabir et al., 2017b) und in glutamatergen Neuronen des Vorderhirns während der Entwicklung (Dedic et al., 2018), um eine vergleichbare antidepressive Wirkung bei Mäusen zu erzielen.

Kognitive Beeinträchtigungen sind bei neuropsychiatrischen Störungen häufig komorbid zu finden (Millan et al., 2012) und verschiedene Studien konnten bereits einen Zusammenhang zwischen dem SNP rs1006737 und kognitiven Funktionen herstellen (Thimm et al., 2011; Zhang et al., 2012; Dietsche et al., 2014). Durch den Einsatz der verschiedenen Mausmodelle konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung von Cav1.2 bestimmte Formen des Gedächtnisses und Lernens beeinflusst. Im MWM, dessen Leistung stark vom Hippocampus abhängig ist, wurde nachgewiesen, dass *Cacnalc* Vorderhirn Knockout Mäuse und Kontrolltiere eine vergleichbare Leistung in der Akquisition und Konsolidierung der Plattformposition aufwiesen (White et al., 2008; Kabir et al., 2017a), während die *Cacnalc* Knockout Mäuse in einer 30 Tage späteren Nachuntersuchung durch ein signifikantes Gedächtnisdefizit gekennzeichnet waren (White et al., 2008). Passend dazu berichten Temme et al. (2016), dass neuronspezifische *Cacnalc* Knockout Mäuse keine Lernschwierigkeiten im MWM hatten. Durch eine Erschwerung der Aufgabe, wie das Entfernen von räumlichen Hinweisreizen, konnten diese *Cacnalc* Knockout Mäuse hingegen die Plattform schlechter finden. Gestützt werden die Befunde, dass eine verringerte Expression von *Cacnalc* mit Defiziten in erschwerten hippocampus-spezifischen kognitiven Aufgaben einhergeht, durch eine frühere Studie von Moosmang et al. (2005), welche zeigte, dass ein konditionaler *Cacnalc* Knockout im Hippocampus von Mäusen zu schweren Beeinträchtigungen des räumlichen Lernens führte. Ebenfalls geht ein Knockout von *Cacnalc* spezifisch in exzitatorischen Neuronen bei Mäusen mit einer verringerten kognitiven Performanz in einer Wasserlabyrinth-Aufgabe einher, die zudem von einer defizitären Langzeit-Potenzierung (LTP) im Hippocampus begleitet wird (Dedic et al., 2018). Bestärkt wird diese Annahme durch Bader et al. (2011), die im Cav1.2 TS Mausmodell, das sich durch eine Gain-of-function von Cav1.2 auszeichnet, eine normale Lernen- und Gedächtnisleistung fanden, aber auffällige Defizite beim Umkehrlernen (engl. „Reversal learning“; RL) im Vergleich zu Kontrolltieren nachwiesen.

Bezüglich des kontextuellen Angstlernens konnte nach einer Verringerung der *CacnalC* Expression eine intakte Angstkonditionierung gefunden werden (McKinney et al., 2008; Temme et al., 2016). Im Gegensatz zu der funktionsfähigen klassischen Angstkonditionierung berichten Jeon et al. (2010), dass bei Mäusen durch den Knockout von  $Ca_v1.2$  mittels eines viralen Vektors im ACC, der eine wichtige Rolle beim Angstlernen durch Beobachtung spielt (Debiec und Olsson, 2017), eine deutliche Beeinträchtigung des Beobachtungslernen zu finden war. Im Allgemeinen zeigten die ACC Knockout Mäuse ein vergleichbares Angstverhalten wie die Kontrolltiere, was darauf hindeutet, dass die neuronalen Grundlagen für das Beobachtungsangstlernen und angeborene Angst unterschiedlich sind (Jeon et al., 2010). Die bisherigen Ergebnisse deuten daraufhin, dass  $Ca_v1.2$  während des Angstlernens involviert und eine regionsspezifische funktionelle Analyse von  $Ca_v1.2$  von Vorteil ist.

Defizite im Sozialverhalten und der Kommunikationsfähigkeit lassen sich bei allen neuropsychiatrischen Störungen zu finden und gehören zu den Kernsymptomen der ASD (Kennedy und Adolphs, 2012). Mit dem weit verbreiteten Ansatz zur Messung der sozialen Annäherung in einer Dreikammer-Box (Silverman et al., 2010) konnte nachgewiesen werden, dass adulte männliche Mäuse, bei denen *CacnalC* regionsspezifisch im Vorderhirn ausgeschaltet wurde, keine Bevorzugung eines Artgenossen gegenüber einer leeren Kammer zeigten (Kabir et al., 2017a; Dedic et al., 2018). Eine Beeinträchtigung der Soziabilität wurde auch nach der Reduzierung der *CacnalC* Expression im PFC nachgewiesen (Kabir et al., 2017a), während die Verringerung der Expression von *CacnalC* im NAc keinen Einfluss auf das Sozialverhalten hatte, außer die Versuchstiere durchliefen ein Protokoll zur Induktion von Stress durch chronische soziale Niederlage (engl. „Chronic social defeat stress“; CSDS), was in einer verringerten sozialen Interaktionszeit resultierte (Terrillion et al., 2017b). Bei *CacnalC*<sup>+/-</sup> Mäusen wurden keine sozialen Defizite festgestellt (Bader et al., 2011; Dedic et al., 2018). Das  $Ca_v1.2$  TS Mausmodell wies in einer zeitlich verlängerten Version des Dreikammer-Box-Tests soziale Defizite auf (Bader et al., 2011). Während der typischen 10-minütigen Testung konnte hingegen kein Mangel an Soziabilität des  $Ca_v1.2$  TS Mausmodells gemessen werden (Bader et al., 2011; Kabitzke et al., 2018).

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen lässt sich daher feststellen, dass soziale Defizite insbesondere bei regionsspezifischen *CacnalC* Veränderungen, nicht aber bei *CacnalC*<sup>+/-</sup> Mäusen zu finden sind. An dieser Stelle ist es wichtig zu erwähnen, dass die Auswirkungen genetischer *CacnalC* Veränderungen auf Sozialverhalten und Kommunikation fast ausschließlich bei erwachsenen männlichen Mäusen untersucht wurden (Bader et al., 2011; Kabir et al., 2017a; Terrillion et al., 2017b; Dedic et al., 2018; Kabitzke et al., 2018). Dies steht

im Gegensatz zu den Bemühungen des National Institutes of Health (NIH), die Zahl der weiblichen Tiere in der präklinischen Forschung zu erhöhen (McCullough et al., 2014), um den bekannten geschlechterspezifischen Verzerrungseffekten entgegenzuwirken (Beery und Zucker, 2011). Besonders hervorzuheben ist, dass es diverse Hinweise auf geschlechtsspezifische Effekte der partiellen *Cacna1c* Deletion auf störungsrelevante Verhaltensweisen im Mausmodell gibt, da weibliche, aber nicht männliche *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Mäuse erhöhtes Angstverhalten, eine größere Dämpfung der AMPH-induzierten Hyperlokomotion und eine geringere Entwicklung erlernter Hilflosigkeit aufwiesen (Dao et al., 2010), was sich mit den geschlechtsspezifischen Effekten im Humanbereich deckt (Dao et al., 2010; Witt et al., 2014; Heilbronner et al., 2015; Takeuchi et al., 2018).

Bisher ist nur wenig über die Hirnmorphologie der *Cacna1c* Mausmodelle bekannt, was in Anbetracht der bildgebenden Studien, die eine Assoziation von *CACNA1C* und strukturellen Veränderungen des menschlichen Gehirns herstellen konnten, überraschend ist (Kempton et al., 2009; Wang et al., 2011a; Dietsche et al., 2014; Soeiro-de-Souza et al., 2017). Erste morphometrische Analysen konnten trotz einer verringerten hippocampalen Neurogenese (siehe: 1.3.2 Kapitel) keinen Einfluss von *Cacna1c* auf das Volumen des Hippocampus und verschiedenen Substrukturen bei den unterschiedlichen *Cacna1c* Knockout Mausmodellen feststellen (Lee et al., 2016; Temme et al., 2016). Weiterhin wurden beim *Ca<sub>v</sub>1.2* TS Mausmodell keine auffälligen Hirnveränderungen gefunden, auch wenn die Autoren eine geringfügige Vergrößerung der lateralen Ventrikel von *Ca<sub>v</sub>1.2* TS Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren berichten (Bett et al., 2012).

### **1.2.3.2 *Cacna1c* im Rattenmodell**

Die Verwendung von Ratten als Modellorganismus für störungsrelevante Verhaltensweisen kann zur Steigerung der translationalen Validität beitragen, da sie in hierarchischen Gruppen leben, ein ausgefeilteres Sozialverhalten aufweisen, aber dabei weniger territorial und aggressiv sind als Mäuse (Ellenbroek und Youn, 2016). Basierend auf dem Sprague-Dawley Rattenstamm wurden mittels des etablierten Protokolls von Geurts et al. (2009) *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten von der Firma SAGE Labs (heute Horizon Discovery Ltd, Cambridge, UK) unter Zuhilfenahme der Zinkfinger-Nukleasen Technologie generiert. Diese *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten tragen eine vier Basenpaare (bp) umfassende Deletion bei 460649-460652 bp in der genomischen Sequenz, was zu einem frühen Stoppcodon im sechsten Exon führt. Die partielle *Cacna1c* Depletion verursacht eine Reduktion des *Ca<sub>v</sub>1.2* Proteinspiegels um ca. 50 % im Gehirn von männlichen und weiblichen *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten im Vergleich zu *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Wurfgeschwistern (Kisko et al.,

2018, 2019; Sykes et al., 2018b). Die Verwendung von homozygoten *CacnalC* Ratten ist nicht möglich, da diese Tiere nicht überlebensfähig sind (Seisenberger et al., 2000).

Da es sich bei dem *CacnalC*<sup>+/-</sup> Rattenmodell um ein vergleichsweise neues Modell handelt, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nur wenig über den Phänotyp der Tiere bekannt. Bezüglich basaler Parameter wurde eine verzögerte Entwicklung des Körpergewichtes von juvenilen weiblichen *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten im Vergleich zu *CacnalC*<sup>+/+</sup> Wurfgeschwistern berichtet, was bei männlichen Tieren nicht festgestellt werden konnte (Kisko et al., 2018, 2019). Adulte *CacnalC*<sup>+/-</sup> und *CacnalC*<sup>+/+</sup> Ratten zeigten vergleichbare lokomotorische Aktivität in einem leeren Haltungskäfig und im Offenfeld (Sykes et al., 2018b), was sich mit den Ergebnissen deckt, dass die lokomotorische Aktivität während des Spielverhaltens von juvenilen Tieren nicht vom Genotyp beeinflusst wurde (Kisko et al., 2018, 2019). Auch auf repetitive und stereotype Verhaltensmuster, gemessen anhand der Eigenfellpflege (engl. „Self-grooming“) und des Drehverhaltens (engl. „Circling behavior“), konnte weiterhin kein Effekt des Genotyps bei juvenilen Versuchstieren festgestellt werden (Kisko et al., 2018, 2019).

Die ersten behavioralen Studien, die die Auswirkung einer *CacnalC* Haploinsuffizienz im *CacnalC*<sup>+/-</sup> Rattenmodell untersuchten, konzentrierten sich zunächst auf die kognitive Funktionsfähigkeit (Braun et al., 2018, 2019; Sykes et al., 2018b). In ihrer Studie berichten Sykes et al. (2018), dass männliche *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten eine Beeinträchtigung des RL, vor allem in der frühen Phase des Umlernens, im Vergleich zu *CacnalC*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren aufwiesen, was Hinweise auf eine verringerte behaviorale Flexibilität der *CacnalC*<sup>+/-</sup> Tiere lieferte. Im Kontrast dazu zeigten Braun et al. (2018), dass das RL bei *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten im Vergleich zu *CacnalC*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren nicht verändert war. Interessanterweise fanden die Autoren sogar positive Auswirkungen auf das räumliche Gedächtnis in Abhängigkeit des Geschlechts der Ratten, da beispielsweise weibliche *CacnalC*<sup>+/-</sup> Tiere weniger Fehler in der Lernphase begangen als weibliche *CacnalC*<sup>+/+</sup> Ratten.

In zwei weiteren Studien untersuchten Kisko et al. (2018, 2019) den Einfluss der *CacnalC* Haploinsuffizienz auf das juvenile Spielverhalten von Ratten, da diverse Hinweise auf soziale Defizite in den verschiedenen *CacnalC* Mausmodellen gefunden wurden. Hier zeigten sich abermals geschlechtsspezifische Effekte, da männliche *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten im Vergleich zu *CacnalC*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren eine signifikant verringerte Emission von 50-kHz USV während des Spiels aufwiesen, wohingegen das Spielverhalten nicht beeinflusst war (Kisko et al., 2018). Zu diesem Befund steht konträr, dass bei weiblichen *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten die 50-kHz USV Emission während des Spielverhaltens im Vergleich zu *CacnalC*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren nicht verändert war (Kisko et al., 2019). Das Spielverhalten hingegen zeigte sich jedoch stark erhöht, da weibliche

*Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Tiere vor allem mehr Niederdrückverhalten (engl. „Pinning“) als *Cacnal1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltiere zeigten. Das Ausmaß des Spielverhaltens weiblicher *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Ratten war interessanterweise sogar deutlich größer als das männlicher *Cacnal1c*<sup>+/+</sup> Ratten (Kisko et al., 2019). Darüber hinaus zeigten beide Geschlechter der *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Tiere ein verringertes soziales Annäherungsverhalten in Reaktion auf 50-kHz USV Playback im Vergleich zu *Cacnal1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren (Kisko et al., 2018, 2019).

Morphologische Hirnveränderungen wurden bis zum heutigen Zeitpunkt kaum im *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodell untersucht. Lediglich Moon et al. (2018) untersuchen die Größe des Gyrus dentatus des Hippocampus und fanden keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacnal1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren, auch wenn die adulte Neurogenese (siehe: Kapitel 1.3.2) verändert war. Weitere neurobiologische Messungen zeigten, dass eine partielle *Cacnal1c* Depletion *in vitro* mit einer erhöhten mitochondrialen Resistenz gegen oxidativen Stress assoziiert ist (Michels et al., 2018b, 2018a, 2019).

### 1.3 Neurogenese im adulte Gehirn

Als adulte Neurogenese wird der Prozess bezeichnet, bei dem neue Nervenzellen im erwachsenen Gehirn entstehen (zur Übersicht siehe: Kempermann, 2011a; Ming und Song, 2011; Kuhn et al., 2018). Diverse Studien deuten daraufhin, dass strukturelle und funktionelle Veränderungen des Hippocampus, wie eine hippocampale Volumenreduktion und eine verringerte adulte Neurogenese (Campbell et al., 2004; Lucassen et al., 2010), mit neuropsychiatrischen Störungen assoziiert sind. Daher wird eine veränderte adulte hippocampale Neurogenese (AHN) als gemeinsamer Mechanismus in der Pathophysiologie der mit *CACNA1C* assoziierten Störungsbilder diskutiert (Samuels und Hen, 2011; Kang et al., 2016; Toda et al., 2018).

Die Forschungsgeschichte inklusive der neuesten Erkenntnisse zur adulten Neurogenese sind von Kontroversen geprägt, wie Gage (2019) in seiner Übersichtsarbeit nachvollziehbar erläutert. Bevor Altman und Das (1965) erste Hinweise darauf lieferten, dass im postnatalen Hippocampus von Ratten neue Nervenzellen entstehen, bestand das vorherrschende Dogma der damaligen Zeit darin, dass Neurogenese auf die Entwicklung des embryonalen Gehirns beschränkt ist. Den Ergebnissen von Altman und Das (1965) wurden zum Zeitpunkt der Veröffentlichung wenig Aufmerksamkeit geschenkt und erst in den 1970er Jahren stützten weitere Befunde die Annahme der adulten Neurogenese in verschiedenen Hirnarealen, da Kaplan und Hinds (1977) Neurogenese im adulten Hippocampus von Ratten und Goldman und Nottebohm (1983) diese bei Vögeln nachweisen konnten. Ab den 1990er Jahren erlebte die

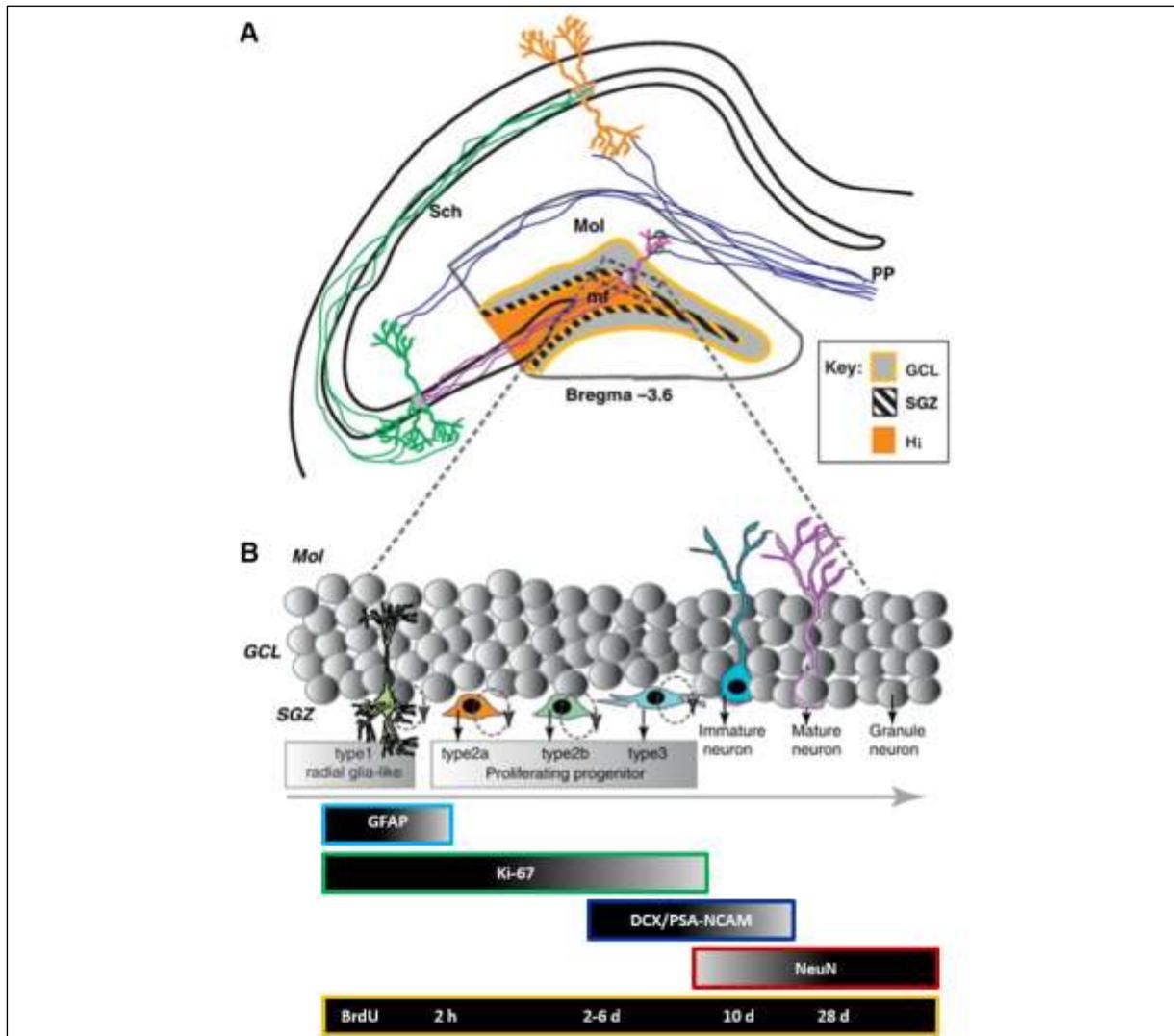
Forschung nach einer Reihe von Veröffentlichungen über adulte Neurogenese bei Menschen und nicht-menschliche Primaten (Cameron et al., 1993; Eriksson et al., 1998; Gould, 1999) einen erneuten Aufschwung. Es gilt seitdem als gesichert, dass adulte Neurogenese bei vielen Säugetieren in distinkten Hirnregionen, insbesondere in der subventrikulären Zone (SVZ) der seitlichen Ventrikel und im Hippocampus, während des Erwachsenenalters stattfindet (Kempermann et al., 2015; Kuhn et al., 2018; Gage, 2019). Ein Fokus der Forschung liegt auf der AHN, da diese an wichtigen kognitiven Funktionen wie Lernen, Gedächtnis, kognitiver Flexibilität und Emotionsprozessen beteiligt ist (Kempermann et al., 2015; Toda et al., 2018).

### **1.3.1 Adulte hippocampale Neurogenese**

Im adulten Hippocampus findet die Neurogenese im Bereich des Gyrus dentatus (engl. „Dentate gyrus“; DG) statt und ist ein komplexer mehrstufiger Entwicklungsprozess, der Proliferation, Zelldifferenzierung, Migration, Überleben und Integration neuronaler Zellen umfasst (zur Übersicht siehe: Toda et al., 2018). Basierend auf der Zellmorphologie und verschiedenen Markerproteinen lassen sich die Entwicklungsstufen der Zellen beschreiben, die über den Entwicklungsprozess hinweg aus der subgranulären Zone (SGZ) in die Granularzellschicht (engl. „Granule cell layer“; GCL) wandern (Ming und Song, 2005; Abbildung 2). Wie Kempermann et al. (2015) in ihrer Übersichtsarbeit beschreiben, entstehen radialgliaähnliche (engl. „Radial glia-like“) Stammzellen (Typ 1) in der SGZ, die sich dann vergleichsweise langsam zu intermediären Vorläuferzellen (Typ 2-3) entwickeln. Diese sich dann schnell teilenden Typ 2 Zellen weisen zunächst einen gliaähnlichen (Typ 2a) und anschließend einen neuronalen (Typ 2b) Phänotyp auf. Im nächsten Schritt reifen die Zellen zu Neuroblasten (Typ 3), verlassen den Zellzyklus und migrieren in die GCL. Nun treten diese unreifen Nervenzellen in ein postmitotisches Reifestadium ein und entwickeln sich zu exzitatorischen Granularzellen, deren Dendriten in die Molekularschicht (Mol) integriert werden. Die Axone dieser Granularzellen verbinden zudem mittels des sog. Moosfasertrakts (engl. „Mossy fiber pathway“) den DG mit dem CA3 Areal des Hippocampus (Abbildung 2A). Da normalerweise ca. 50 % dieser jungen hippocampalen Nervenzellen eine Woche nach ihrer Entstehung absterben (Pieper et al., 2010), lässt sich die AHN auch als ein Gleichgewicht zwischen Proliferation von Stammzellen und dem Überleben junger Neurone beschreiben.

Zur Untersuchung der AHN können diverse immunohistochemische Marker verwendet werden (zur Übersicht siehe: Kempermann, 2011b; von Bohlen und Halbach, 2011). Ein weit verbreiteter Ansatz ist die intraperitoneale (i. p.) Injektion des exogenen Markers Bromdesoxyuridin (5-Brom-2-desoxyuridin; BrdU) zur Identifikation von neu entstandenen

hippocampalen Zellen (Wojtowicz und Kee, 2006). BrdU ist ein Analogon des Thymidin und wird während der Synthese-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut (von Bohlen und Halbach, 2011). Je nach Forschungsfrage können die Anzahl der Injektionen, die Dosierung und die Dauer bis zur Entnahme des Hippocampus variiert werden, um unterschiedliche Entwicklungsstadien der Zellen zu ermitteln (Abbildung 2B).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der adulten hippocampalen Neurogenese bei Ratten. (A) Coronaler Schnitt durch den Hippocampus, der den DG (gelb/schwarz gestreifte + grau schattierte Region) hervorhebt. Der DG gliedert sich auf in die Mol (weiß), GCL (grau) und Hi (orange). Die SGZ (schwarz schraffierte) befindet sich zwischen GCL und Hi. Ein Neuron (lila) in der GCL wird in (B) vergrößert, um die Entwicklungsstufen neuronaler Stammzellen darzustellen. (B) Darstellung der GCL, um die Stadien der adulten Neurogenese zu verdeutlichen. Diverse endogene Marker der Proliferation, z. B. GFAP oder Ki-67, der Differenzierung, z. B. DCX, und der Reifung, z. B. NeuN, können in Kombination mit zeitlich abgestimmten BrdU-Injektionen zur Bestimmung des neuronalen Phänotyps und Entwicklungsstadiums von Zellen verwendet werden (angepasst nach Mandyam und Koob, 2012).

So markiert beispielsweise eine einmalige Verabreichung von BrdU eine Stunde vor der Hirnentnahme Zellen, die sich in frühen Phasen der Proliferation befinden (Pieper et al., 2010). Wählt man hingegen ein Vorgehen mit wiederholten Injektionen von BrdU über mehrere Tage hinweg, so wird eine Mischung aus Proliferation und unreifer Zellen gemessen, da bereits

wenige Tage nach der ersten BrdU Injektion die neuen Zellen Marker für unreife Neurone exprimieren (von Bohlen und Halbach, 2011). Wird das Intervall bis zur Gewinnung des Hippocampus auf mehrere Wochen verlängert, so zeigen BrdU<sup>+</sup> Zellen das Überleben hippocampaler neuronaler Vorläuferzellen an (Lee et al., 2016).

Des Weiteren gibt es diverse endogene Zellmarker zur Bestimmung der Stadien der AHN (Kempermann, 2011b; von Bohlen und Halbach, 2011; Abbildung 2B). Sehr frühe proliferative Prozesse können mittels des sauren Gliafaserproteins (engl. „Glial fibrillary acidic protein“; GFAP) identifiziert werden. Als breitere Marker der Proliferation dienen beispielsweise das Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA) und Kiel 67 (Ki-67), die beide teilende Zellen markieren können (von Bohlen und Halbach, 2011). In späteren Stufen der Proliferation (Stufe 2b-3) werden Doublecortin (DCX) und das polysialysierte neurale Zelladhäsionsmolekül (engl. „Polysialylated neural-cell-adhesion molecule“; PSA-NCAM) exprimiert. Beide Marker können die neuronale Zelldifferenzierung kennzeichnen (Kempermann et al., 2015). Da DCX und PSA-NCAM auch nach dem Austritt aus dem Zellzyklus hinweg während der postmitotischen Reifung exprimiert werden, können beide auch als Indikatoren für unreife (engl. „immature“) Neurone verwendet werden (von Bohlen und Halbach, 2011). Nach dem Austritt aus dem Zellzyklus beginnen die Nervenzellen das neuronspezifische Zellkernprotein (engl. „Neuron-specific nuclear protein“; NeuN) zu exprimieren, welches als der am häufigsten verwendete Marker für adulte Neurone gilt (Kempermann, 2011b).

Bei der Verwendung der Zellmarker sind verschiedene methodische Aspekte und Limitationen zu berücksichtigen. Zum einem ist die AHN ein transients Prozess und die Expressionsmuster der Marker weisen je nach Entwicklungsstufe Überlappungen auf, so dass nur bedingt der exakte Entwicklungsstand einer Zelle bestimmt werden kann. Zum anderen ist die neuronale Spezifität der Marker nicht immer gegeben, da beispielsweise der Zellzyklus-Marker PCNA keine Unterscheidung ermöglicht, ob PCNA<sup>+</sup> Zellen zur glialen oder neuronalen Zellpopulation gehören (von Bohlen und Halbach, 2011). Da die verfügbaren Marker Vor- und Nachteile haben, bietet sich eine Kombination mehrerer Marker an, um diese Herausforderungen zu bewältigen. Der aktuelle Goldstandard ist eine immunhistochemische Doppelmarkierung von Zellen durch BrdU in Kombination mit einem weiteren endogenen Marker, z. B. Ki-67 oder NeuN, um den Stand der Zellentwicklung oder den neuronalen Phänotyp der Zellen zu validieren (Kuhn et al., 2018).

### ***1.3.1.1 Verhalten und adulte hippocampale Neurogenese bei Nagetieren***

Mit Hilfe von Nagetierstudien konnte gezeigt werden, dass die AHN eine Rolle bei vielen krankheitsrelevanten behavioralen Phänotypen spielt, da die im adulten Alter entstandenen Neuronen einen signifikanten Einfluss auf kognitive Fähigkeiten sowie emotionales und soziales Verhalten haben (Gonçalves et al., 2016; Holmes, 2016; Anacker und Hen, 2017; Toda et al., 2018). An der Regulation der AHN sind eine Vielzahl an Faktoren beteiligt, wie Umwelteinflüsse, Wachstumsfaktoren, Glukokortikoide und Neurotransmitter (Toda et al., 2018). Negative Umweldbedingungen, wie soziale Isolation und unvorhersehbarer chronischer Stress (Stranahan et al., 2006; Czéh et al., 2007; de Andrade et al., 2013), verringern die AHN, während positive Umweltfaktoren, wie physische Aktivität und Umweltanreicherungen (van Praag et al., 1999a, 1999b; Brenes et al., 2016), die AHN erhöhen. Insbesondere das soziale Umfeld von Nagetieren kann die hippocampale Neurogenese beeinflussen (Gheusi et al., 2009; Lieberwirth und Wang, 2012).

Wie Holmes (2016) in einer Übersichtsarbeit erläutert, wird die AHN durch eine Vielzahl sozialer Manipulationen, wie soziale Isolation, soziale Konflikte und sozio-sexuelle Interaktionen, beeinflusst. In einer renommierten Studie von Lu et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass eine Isolationshaltung von Ratten die Proliferation von Zellen im Hippocampus verringerte. Spannenderweise konnte dieses Defizit durch eine nachfolgende Gruppenhaltung der Tiere wieder auf ein normales Niveau gebracht werden, was den Zusammenhang zwischen AHN und sozialer Interaktion verdeutlicht.

In einer aktuellen Studie von Anacker et al. (2018) konnten die Autoren zudem einen kausalen Zusammenhang zwischen AHN und sozialem Interaktionsverhalten von Mäusen nach CSDS herstellen, da die chemogenetische Hemmung der Neurogenese im DG eine robuste Vermeidung einer Stimulus-Maus in einem sozialen Interaktionstest verursachte. Gegenläufig dazu führte eine Steigerung der hippocampalen Neurogenese zu einer erhöhten Soziabilität der Mäuse (Anacker et al., 2018).

Im Kontext des Sozialverhaltens berichten Wöhr et al. (2009) ferner von einem Zusammenhang zwischen USV und AHN von Ratten. Die Autoren induzierten mittels „Tickling“ USV und fanden einen hoch positiven Zusammenhang zwischen Proliferation und der Anzahl an 50-kHz USV, während eine hoch negative Korrelation zwischen der Emission von 22-kHz USV und der Proliferation festgestellt wurde. Interessanterweise war die Proliferation spezifisch bei jenen Ratten deutlich erhöht, die die „Tickling“ Prozedur als besonders positiv empfanden, was an einer erhöhten Emission von 50-kHz USV der Tiere festgemacht wurde.

### **1.3.1.2 Funktionelle Längsachse der hippocampalen Neurogenese**

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass der Hippocampus entlang seiner Längsachse eine heterogene Struktur ist und die AHN entlang dieser dorso-ventralen Achse unterschiedliche Funktionen einnimmt (Fanselow und Dong, 2010), da Läsionen des dorsalen Hippocampus (dHC) Kognitionen und Lernen und Läsionen des ventralen Hippocampus (vHC) emotionales und soziales Verhalten verändern (Kheirbek und Hen, 2011; zur Übersicht siehe: Anacker und Hen, 2017). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass die antidepressive Wirkung von Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (engl. „Serotonin reuptake inhibitors“; SSRIs) nicht nur im Zusammenhang mit der Rate der AHN stehen (Santarelli et al., 2003; zur Übersicht siehe: Micheli et al., 2018), sondern Antidepressiva selektiv die AHN im vHC erhöhen, wie Banasr et al. (2006) nach einer wiederholten Gabe von Agomelatin, einem Melatonin-Rezeptor Agonisten und serotonergen 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor Antagonisten, berichten.

### **1.3.2 *Cacnalc* und adulte hippocampale Neurogenese**

Wie bereits erwähnt, diskutieren Kabir et al. (2016) eine Dysregulation des PFC-Amygdala-Hippocampus Netzwerkes bedingt durch *Cacnalc* Veränderungen als Grundlage für die Entstehung von neuropsychiatrischen Störungen. Da die AHN bereits mit vielen krankheitsrelevanten Phänotypen in Verbindung gebracht wurde (Toda et al., 2018), könnte eine veränderte Neurogenese zur Dysregulation des Netzwerkes beitragen. Die adulte Neurogenese respektive die verschiedenen Prozesse der Neurogenese werden von der Signalübertragung mittels Calcium reguliert (Toth et al., 2016). Der Ca<sub>v</sub>1.2 Kanal, der insbesondere im Hippocampus exprimiert wird (Schlick et al., 2010), scheint daher eine wichtige Funktion bei der Regulation der AHN einzunehmen, wie von Kabir et al. (2017c) ausführlich diskutiert wird. Pharmakologische Studien lieferten erste Hinweise darauf, dass eine Blockierung von LTCCs, beispielsweise mit dem Ca<sub>v</sub>1.2/1.3 Antagonist Nifedipin, die aktivitätsabhängige Proliferation (Zhu et al., 2012) und adulte Neurogenese im Hippocampus (Deisseroth et al., 2004) reduzierte.

Bei den unterschiedlichen *Cacnalc* Nagetiermodellen konnten neben veränderten behavioralen Phänotypen verringerte Proliferation und reduzierte Überlebensraten adulter Neurone im Hippocampus nachgewiesen werden (zur Übersicht siehe: Moon et al., 2018). In einer ersten Studie zeigten Lee et al. (2016), dass ein Vorderhin-spezifischer Knockout von *Cacnalc* bei Mäusen die Anzahl der unreifen Neuronen und das Überleben der neugeborenen hippocampalen Nervenzellen verringerte, wobei der Glukokortikoidspiegel der Versuchstiere nicht verändert war. In anderen Mausmodellen war die neuron-spezifische Deletion von

*Cacnalc* mit einer reduzierten Anzahl unreifer Neuronen (Temme et al., 2016) und die Deletion von *Cacnalc* auf astrozytenähnlichen (Typ-1) neuronalen Stammzellen mit einer reduzierten Zellproliferation bzw. neuronalen Zelldifferenzierung assoziiert (Völkening et al., 2017). Bei Ratten gibt es erste Hinweise darauf, dass *Cacnalc* die AHN verändert, da in einer Studie von Moon et al. (2018) von einer reduzierten Proliferationsrate bei männlichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten berichtet wird.

Die Ca<sub>v</sub>1.2 Expression scheint auf junge reife Neurone im Hippocampus beschränkt zu sein (Marschallinger et al., 2015) und Ca<sub>v</sub>1.2 ist nicht auf neuronalen Stammzellen zu finden (Deisseroth et al., 2004). Da *Cacnalc* nicht nur das Zellüberleben, sondern auch die Proliferation verändert, ist der genaue Mechanismus (zellautonom vs. nicht-autonom), wie *Cacnalc* die unterschiedlichen Stufen der Neurogenese beeinflusst, noch unklar (Lee et al., 2016; Völkening et al., 2017). Ein möglicher nicht-autonomer Mechanismus könnte durch den Wachstumsfaktor BDNF (engl. „Brain-derived neurotrophic factor“) vermittelt sein, da LTTCs als primäre Hauptquelle für Calcium-Ionen während der BDNF Synthese fungieren (Kabir et al., 2017c). Passend zu dieser Annahme berichten Lee et al. (2016), dass Vorderhin-spezifische *Cacnalc* Knockout Mäuse verringerte hippocampale BDNF Spiegel aufwiesen. Die Autoren zeigten auch, dass durch den Einsatz des neuroprotektiven Aminopropylcarbazols P7C3-A20 die AHN auf ein normales Niveau gebracht werden konnte, indem die hohe Sterblichkeitsrate hippocampaler junger Neuronen verringert wurde. Dieser therapeutische Effekt wurde aber unabhängig vom hippocampalen BDNF Spiegel erreicht, was darauf hindeutet, dass es alternative Therapiewege zur Wiederherstellung der Neurogenese gibt.

## 2 FRAGESTELLUNG UND HYPOTHESEN

Das Risikogen *CACNA1C* ist an der Ätiologie aller wichtigen neuropsychiatrischen Störungen, d. h. MDD, BPD, ASD und SCZ, beteiligt, wobei Frauen stärker von *CACNA1C* Mutationen betroffen sind als Männer. Diese Störungen zeichnen sich durch überlappende Symptombereiche aus, da insbesondere Defizite der sozialen Funktionsfähigkeit und Veränderungen des affektiven Zustands zu finden sind. Mittels Bildgebungsstudien wurde ein Zusammenhang zwischen *CACNA1C* und Veränderungen der Gehirnstruktur und -funktion aufgedeckt. Auf translationaler Ebene konnten abweichendes Sozialverhalten und verringerte AHN in *Cacnal1c* Nagetiermodellen nachgewiesen werden.

Ein Ziel dieser Dissertation war es, die Effekte einer *Cacnal1c* Haploinsuffizienz auf das Sozialverhalten des *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodells im Erwachsenenalter zu untersuchen, da im juvenilen Alter bereits ein verändertes Sozialverhalten gefunden wurde (Kisko et al., 2018, 2019). Basierend auf den geschlechtsspezifischen Effekten von *Cacnal1c* (Dao et al., 2010; Braun et al., 2018) wurde der Fokus in der vorgelegten Studie I auf das direkte reziproke soziale Interaktionsverhalten weiblicher *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacnal1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren gelegt. Neben einer umfangreichen Auswertung sozialer und nicht sozialer Verhaltensweisen wurde die Emission von 50-kHz USV detailliert bezüglich Ruftypen und akustischer Parameter ausgewertet, um den Einfluss von *Cacnal1c* auf die pro-soziale Kommunikation zu ermitteln. Außerdem wurde durch zeitliche Synchronisation Verhaltensweisen und 50-kHz USV verknüpft, um weitere Einblicke in Funktion von 50-kHz USV zu erhalten. *In Anbetracht der bekannten behavioralen Abweichungen wurde daher in Studie I erwartet, dass adulte weibliche Cacnal1c*<sup>+/-</sup> *Ratten ein verändertes Sozial- und Kommunikationsverhalten im Vergleich zu Cacnal1c*<sup>+/+</sup> *Kontrolltieren aufweisen.*

In Studie II wurde der Einfluss der *Cacnal1c* Haploinsuffizienz auf die adulte Neurogenese im Hippocampus untersucht. Die AHN wird als ein grundlegender Mechanismus in der Pathophysiologie neuropsychiatrischer Störungen diskutiert (Toda et al., 2018) und steht in einem direkten Zusammenhang zum Sozialverhalten von Nagetieren (Holmes, 2016; Anacker et al., 2018). In vorherigen Studien konnte eine verringerte AHN bei *Cacnal1c* Nagetiermodellen festgestellt werden (Moon et al., 2018). Die adulte Neurogenese ist ein Zusammenspiel aus Proliferation und Zellüberleben junger Nervenzellen, daher wurden diese Prozesse mit dem immunohistochemischen Marker BrdU und zwei endogenen Zellmarkern basierend auf einer immunfluoreszierenden Mehrfachfärbung in adulten weiblichen *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacnal1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren untersucht. Des Weiteren wurden volumetrische

Analysen des dorsalen Hippocampus und medialen präfrontalen Cortex erstellt, um den Einfluss von *Cacna1c* auf die Hirnanatomie zu ermitteln. *Beruhend auf den Befunden zur verringerten AHN in Cacna1c Nagetiermodellen wurde in Studie II erwartet, dass die Cacna1c Haploinsuffizienz zu einer verringerten hippocampalen Neurogenese sowie morphologischen Hirnveränderungen bei adulten weiblichen Ratten führt.*

### 3 PUBLIKATIONEN

#### Zusammenfassung der Publikationen

#### Studie I: Effects of *Cacnalc* haploinsufficiency on social interaction behavior and 50-kHz ultrasonic vocalizations in adult female rats

Redecker TM, Kisko TM, Schwarting RKW, Wöhr M (2019) Effects of *Cacnalc* haploinsufficiency on social interaction behavior and 50-kHz ultrasonic vocalizations in adult female rats. **Behav Brain Res** 367:35–52.

#### Zusammenfassung

Das Risikogen *CACNA1C* wurde wiederholt mit den wichtigsten neuropsychiatrischen Störungen in Verbindung gebracht. Interessanterweise konnten geschlechtsabhängige Effekte von *CACNA1C* Mutationen auf Prävalenz und psychologische Eigenschaften gefunden werden, so dass davon auszugehen ist, dass Frauen stärker von *CACNA1C* Veränderungen betroffen sind als Männer. Neuropsychiatrische Erkrankungen weisen neben hohen Komorbiditätsraten eine Überlappung vieler Symptombereiche auf, da insbesondere Defizite in der sozialen Funktionsfähigkeit häufig berichtet werden. Auch durch Verhaltensstudien an *Cacnalc* Nagetiermodellen konnten wiederholt Defizite des Sozialverhaltens und geschlechtsabhängige Effekte auf den behavioralen Phänotyp gefunden werden.

Die folgende Studie konzentrierte sich daher auf die Rolle von *Cacnalc* an der Regulation von Sozialverhalten und Kommunikation bei erwachsenen weiblichen heterozygoten (*Cacnalc*<sup>+/-</sup>) Ratten und Wildtypwurfgeschwistern (*Cacnalc*<sup>+/+</sup>). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die *Cacnalc* Haploinsuffizienz zu einer veränderten Kommunikation und leichten sozialen Defiziten während der direkten sozialen Interaktion von weiblichen Ratten führt. Detaillierte zeitliche Analysen zeigten eine deutliche Reduktion der Emission von 50-kHz USV während nicht-sozialer Verhaltensweisen, was auf einen allgemein reduzierten positiven Affektzustand der *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten hinweist. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Rolle von *Cacnalc* bei der Regulation von Verhaltensphänotypen, die im Zusammenhang mit neuropsychiatrischen Störungen stehen.

## **Studie II: *Cacna1c* haploinsufficiency lacks effects on adult hippocampal neurogenesis and volumetric properties of prefrontal cortex and hippocampus in female rats**

Redecker TM, Kisko TM, Schwarting RKW, Wöhr M (eingereicht Januar 2020) *Cacna1c* haploinsufficiency lacks effects on adult hippocampal neurogenesis and volumetric properties of prefrontal cortex and hippocampus in female rats. **Neurosci Lett.**

### **Zusammenfassung**

Das krankheitsübergreifende Risikogen *CACNA1C* ist an der Entstehung aller wichtigen neuropsychiatrischen Erkrankungen beteiligt, wobei Frauen oft stärker von *CACNA1C* Mutationen betroffen sind als Männer. Humane Bildgebungsstudien zeigten, dass *CACNA1C* Alterationen mit anatomischen und funktionellen Hirnveränderungen, wie vermindertes präfrontales Volumen, mikrostrukturelle Veränderungen im Hippocampus und verminderter hippocampaler Aktivität während Gedächtnisaufgaben, einhergehen.

Bei *Cacna1c* Mausmodellen wurden wiederholt krankheitsähnliche Verhaltensphänotypen und eine reduzierte adulte hippocampale Neurogenese, die in der Pathologie neuropsychiatrischer Störungen involviert ist, festgestellt. In dieser Arbeit wurde auf das kürzlich entwickelte *Cacna1c* Rattenmodell zurückgegriffen und es wurden zwei Untersuchungen durchgeführt, um die Auswirkungen der partiellen *Cacna1c* Depletion auf die Neurogenese und die volumetrischen Eigenschaften des Hippocampus und des präfrontalen Cortex bei erwachsenen weiblichen heterozygoten (*Cacna1c*<sup>+/-</sup>) Ratten und Wildtyp (*Cacna1c*<sup>+/+</sup>) Kontrolltieren zu erheben. Dazu wurden in Untersuchung 1 die Proliferation und das Überleben von adulten hippocampalen Zellen basierend auf einem 5-Bromdoxyuridin-Ansatz, der den neuronalen Phänotyp der gefärbten Zellen durch die Anwendung einer immunfluoreszierenden Mehrfachmarkierung sicherstellt, untersucht. In Untersuchung 2 wurde eine detaillierte volumetrische Analyse des dorsalen Hippocampus und des medialen präfrontalen Cortex unter Berücksichtigung der wichtigsten Substrukturen durchgeführt. Die Ergebnisse weisen auf ein vergleichbares Niveau der Zellproliferation und des Überlebens neuronaler Zellen bei *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren hin. Darüber hinaus wurden bei *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren vergleichbare Volumina des dorsalen Hippocampus und des medialen präfrontalen Cortex über diverse Substrukturen hinweg gefunden, was darauf hindeutet, dass eine *Cacna1c* Haploinsuffizienz keine signifikanten Auswirkungen auf diese Hirnstrukturen bei weiblichen Ratten hat.

## **Studie I**

**Titel:** Effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on social interaction behavior and 50-kHz ultrasonic vocalizations in adult female rats

**Autoren:** Redecker, Tobias M., Kisko, Theresa M., Schwarting, Rainer K.W., Wöhr, Markus

**Status:** online verfügbar seit dem 19. März 2018 (akzeptiert am 15. März 2019)

**Einreichung:** Behavioural Brain Research

**Impact Factor (2018):** 2,770



Contents lists available at ScienceDirect

Behavioural Brain Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbr](http://www.elsevier.com/locate/bbr)

## Research report

Effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on social interaction behavior and 50-kHz ultrasonic vocalizations in adult female ratsTobias M. Redecker<sup>a</sup>, Theresa M. Kisko<sup>a</sup>, Rainer K.W. Schwarting<sup>a,b</sup>, Markus Wöhr<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Department of Psychology, Philipps-Universität Marburg, Gutenbergstr. 18, D-35032 Marburg, Germany<sup>b</sup> Center for Mind, Brain, and Behavior (CMBB), Philipps-Universität Marburg, Hans-Meerwein-Str. 6, D-35032 Marburg, Germany

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Ca<sub>v</sub>1.2  
Calcium  
Social behavior  
Ultrasonic vocalizations  
Neuropsychiatric disorders

## ABSTRACT

The risk gene *CACNA1C* is strongly implicated in the etiology of all major psychiatric disorders, such as depressive disorder, bipolar disorder, autism spectrum disorder, and schizophrenia. These disorders feature high levels of comorbidity and share an overlap of symptoms; in particular, deficits in social functioning are common. Intriguingly, sex-dependent effects of *CACNA1C* single nucleotide polymorphisms on prevalence, health outcomes, and psychological traits have been reported, typically suggesting that women are more affected by *CACNA1C* mutations than men. In rodents, genetic modifications specifically targeting *Cacna1c* have repeatedly been linked to deficits in social behavior in male mice and rats but many studies neglect the sex-dependent effects observed in humans. Our study focused on the role of *Cacna1c* in regulating social behavior and communication in adult female rats. We compared social and non-social behavior together with concomitant emission of pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations (USV) associated with positive affect in constitutive heterozygous (*Cacna1c*<sup>+/-</sup>) rats to wildtype (*Cacna1c*<sup>+/+</sup>) littermate controls. Our results indicate that partial *Cacna1c* depletion leads to strongly reduced emission of 50-kHz USV and mild social deficits during female direct reciprocal social interaction. Detailed temporal analyses revealed most prominent reductions of 50-kHz USV during non-social behavior, suggesting that reduced positive affect occurs in a social context in *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats but is not specifically linked to social behavior. Finally, we observed increased self-grooming behavior in *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats, consistent with an autism-like phenotype. Our findings in rats thus support a role of *Cacna1c* in regulating behavioral phenotypes with relevance for several neuropsychiatric disorders.

## 1. Background

Epidemiological studies consistently report sex differences in the prevalence of all major neuropsychiatric disorders. For instance, women have higher rates of major depressive disorder (MDD) and bipolar disorder (BPD), while in men higher rates of autism spectrum disorder (ASD) and schizophrenia (SCZ) have been demonstrated [1–4]. These disorders, however, have common features as reflected in high levels of comorbidities and overlap of symptoms, such as deficits in social functioning [5,6]. Furthermore, it was suggested that genetic risk factors and specific biological pathways are shared between the major neuropsychiatric disorders [7,8].

Interestingly, there is evidence for sex-dependent effects of the

cross-disorder risk gene *CACNA1C*, which was previously associated with MDD, BPD, ASD, and SCZ [9–12]. For instance, higher prevalences of MDD and BPD [13,14] and reduced functional recovery from SCZ episodes [15] have been reported for female patients carrying a *CACNA1C* risk allele. Additionally, maladaptive psychological traits, such as hostility, have been found to be increased in female but not in male *CACNA1C* risk allele carriers [16]. Several *CACNA1C* single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified from genome-wide association studies (GWAS), with the intronic SNP rs1006737 being among the best replicated risk SNP for neuropsychiatric disorders (for review see: [17,18]). *CACNA1C* encodes the pore-forming alpha-1 subunit of the voltage-dependent L-type gate calcium channel Ca<sub>v</sub>1.2. By controlling depolarization-dependent calcium influx into the cell,

**Abbreviations:** AD, affective disorder; BPD, bipolar disorder; MDD, major depressive disorder; NIH, National Institute of Health; SCZ, schizophrenia; ASD, autism spectrum disorder; SNP, single-nucleotide polymorphism; GWAS, genome-wide association study; *Cacna1c*<sup>+/-</sup>, heterozygous *Cacna1c*; *Cacna1c*<sup>+/+</sup>, wildtype *Cacna1c*; PND, postnatal day; USV, ultrasonic vocalizations

\* Corresponding author at: Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Philipps-Universität Marburg, Gutenbergstr. 18, 35032 Marburg, Germany.

E-mail address: [markus.woehr@staff.uni-marburg.de](mailto:markus.woehr@staff.uni-marburg.de) (M. Wöhr).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.032>

Received 13 December 2018; Received in revised form 3 March 2019; Accepted 15 March 2019

Available online 19 March 2019

0166-4328/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Ca<sub>v</sub>1.2 thus plays a fundamental role in brain functioning through regulating neuronal excitability, synaptic plasticity, and gene expression. The biological mechanisms by which Ca<sub>v</sub>1.2 mediates neuropsychiatric phenotypes, however, are only rudimentarily understood, yet different molecular and biological pathways have been suggested [18,19].

On a functional level, multiple studies linked CACNA1C rs1006737 and other SNPs to changes in behavioral processes relevant for social functioning. For example, Pasparakis et al. [20] provided evidence that healthy male risk allele carriers display aberrant emotional processing represented by an increased startle response to negative pictures compared to controls. CACNA1C risk allele carriers also have lower verbal fluency resulting in aggravated language production on a semantic level [21] and altered social outgroup emotion processing reflected by a reduced activation of brain areas involved in facial affect recognition [22].

Due to their pronounced sociability, rodents, especially mice and rats, are commonly used model organisms to study social behaviors and underlying biological mechanisms. Previous results from mouse studies indicate that genetic *Cacna1c* modifications influence behaviors with relevance to social deficits seen in neuropsychiatric disorders [23–29]. For example, two independent experiments showed that a forebrain specific knockout of *Cacna1c* in adult male mice leads to reduced social approach behavior and increased anxiety-like behavior [25,28]. Surprisingly, these studies exclusively focused on male mice, despite the stronger effects of CACNA1C alterations in women compared to men and the efforts of the National Institute of Health (NIH) to balance the sex of animals in preclinical research [30]. In support of that view, evidence for sex-specific effects of partial *Cacna1c* depletion on disorder-relevant behaviors in mouse models has been provided. For instance, female, but not male, heterozygous *Cacna1c* mice display increased anxiety, greater attenuation of amphetamine-induced hyperlocomotion, and decreased development of learned helplessness [13].

Using rats as a model organism for studying social behavior may further enhance translational validity because they live in hierarchical groups, display higher levels of social behaviors, but are less territorial and aggressive than mice (for review see: [31]). Acoustic communication through ultrasonic vocalizations (USV) is an important aspect of rat social behavior. Juvenile and adult rats emit two distinct types of USV, namely 50-kHz and 22-kHz USV [32]. Specifically, 22-kHz USV occur in aversive situations like social defeat [33], confrontation with a predator [34], or fear conditioning [35] and 22-kHz USV are therefore believed to reflect negative affective states. In contrast, 50-kHz USV are thought to express positive affective states [36], also called “rat laughter” [37], because they are emitted in appetitive social and rewarding situations like social play [38,39], mating [40,41] or in response to the administration of psychostimulants, most notably amphetamine [42,43]. Besides being a readout for positive affective states, 50-kHz USV serve an important pro-social communicative function as demonstrated by playback studies where 50-kHz USV elicited social exploratory and approach behavior [42,44,45].

The first studies investigating the effects of partial *Cacna1c* depletion in a newly generated rat model focused on cognitive functioning [46,47]. Sykes et al. [46] detected impairments in reversal learning in heterozygous *Cacna1c* rats, suggesting increased behavioral inflexibility compared to control animals. In contrast, we showed that partial *Cacna1c* depletion did not affect reversal learning in rats and even had positive effects on spatial memory in a sex-specific manner [47]. At the neurobiological level, partial *Cacna1c* depletion was associated with reduced adult hippocampal neurogenesis [29] and increased mitochondrial resilience to oxidative stress in a cell culture approach [48]. However, very little is known about *Cacna1c* effects on social behavior in rats and, to our knowledge, no one has studied this topic in adult female rats. We have recently demonstrated that partial *Cacna1c* depletion in juvenile rats leads to sex-specific deficits in pro-social

communication and social play behavior, also known as rough-and-tumble play [49]. In males, emission of pro-social 50-kHz USV during rough-and-tumble play was reduced in heterozygous *Cacna1c* rats compared to their wildtype littermates, while play behavior was not affected by *Cacna1c* haploinsufficiency. Furthermore, male heterozygous *Cacna1c* rats displayed reduced social approach behavior initiated by 50-kHz USV playback. Importantly, however, different effects of *Cacna1c* haploinsufficiency were obtained in females [50]. Most notably, rough-and-tumble play behavior was strongly enhanced in female heterozygous *Cacna1c* rats. In fact, female heterozygous *Cacna1c* rats did not only display more social play behavior and higher levels of pinning behavior than female wildtype littermates but their levels were even higher than the ones seen in male wildtype littermates. Despite this, *Cacna1c* haploinsufficiency had no effect on 50-kHz USV emission during rough-and-tumble play in females and effects of social approach evoked by 50-kHz USV were weak. Together, this suggests that *Cacna1c* haploinsufficiency leads to sex-dependent alterations in the incentive value of playful social interactions in juvenile rats.

Given the sex-specific effects of CACNA1C mutations in humans and evidence from animal studies showing that *Cacna1c* modulates social behaviors in rodents, we decided to study the impact of *Cacna1c* haploinsufficiency on social behavior and communication in our recently generated *Cacna1c* rat model. In a direct reciprocal social interaction paradigm, we measured social and non-social behaviors together with concomitant emission of 50-kHz USV in adult female heterozygous *Cacna1c* rats and their female wildtype littermate controls. We hypothesized that a reduction of *Cacna1c* expression leads to alterations in their social behavior repertoire and changes in 50-kHz USV production.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and housing

Direct reciprocal social interaction, concomitant pro-social 50-kHz USV, and social dominance were assessed in female constitutive heterozygous rats (*Cacna1c*<sup>+/-</sup>, N = 40) and compared to female wildtype littermate controls (*Cacna1c*<sup>+/+</sup>, N = 40). *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats were generated using zinc finger technology by SAGE Labs (now Horizon Discovery Ltd, Cambridge, UK) on a Sprague-Dawley background [51]. Such *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats carry a 4 base pair (bp) deletion at 460649–460652 bp in genomic sequence resulting in an early stop codon in exon 6. Genotyping was performed on a 3130xl Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) as reported before [49,50], with the following primers: 5'-GCTGCTGAGCCCTTTA TTGG-3' (*Cacna1c* Cel-1 F) and 5'-CCTCCTGGATAGCTGCTGAC-3' (*Cacna1c* Cel-1 R). As shown in recent studies, brain Ca<sub>v</sub>1.2 protein levels are reduced by ~50% in male and female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats as compared to *Cacna1c*<sup>+/+</sup> littermates [49,50]. Homozygous *Cacna1c*<sup>-/-</sup> rats were not used since they are embryonically lethal.

A heterozygous breeding protocol was used to obtain offspring from both genotypes. To this aim, wildtype Sprague-Dawley females (Charles River, Sulzfeld, Germany) and male *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats were paired for breeding. Wildtype females were used because breeding efficacy is reduced in female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats [49]. Overall, N = 13 litters with N = 15.37 ± 0.71 pups were obtained, with equal sex (t<sub>12</sub> = 1:128; p = 0.281) and genotype (t<sub>12</sub> = 0.726; p = 0.482) ratios. In order to avoid litter effects, only litters with both genotypes were included in the experiments. Breeding was performed at the Department of Psychology, Philipps-Universität Marburg, Germany.

Approximately 2 weeks after pairing for breeding, females were individually housed and inspected daily for pregnancy and delivery. The day of birth was considered as postnatal day (PND) 0. After weaning on PND 21, rats were socially housed in groups of 4–6 with same-sex partners in polycarbonate Makrolon Type IV cages (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Germany; 58 × 38 × 20 cm, length × width, × height) under standard laboratory conditions

( $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and 40–70 % humidity) with free access to standard rodent chow and water. Rats were identified by paw tattoo, using non-toxic animal tattoo ink (Ketchum permanent tattoo inks green paste, Ketchum Manufacturing Inc., Brockville, Canada). The ink was inserted subcutaneously through a 30 gauge hypodermic needle tip into the center of the paw on PND  $5 \pm 1$ .

## 2.2. General overview

Direct reciprocal social interaction and concomitant pro-social 50-kHz USV were assessed in female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> littermate controls on PND 135–138. On two consecutive days, pairs of rats were allowed to socially interact for 10 min with each other. Rats were paired either with same- or different-genotype non-littermate partners using a counter-balanced design to control for social experience between test days. Thus, on day 1, half of the animals had a same-genotype partner, i.e. *Cacna1c*<sup>+/+</sup> and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> or *Cacna1c*<sup>+/-</sup> and *Cacna1c*<sup>+/-</sup>, and on the subsequent day a different-genotype partner, i.e. *Cacna1c*<sup>+/+</sup> and *Cacna1c*<sup>+/-</sup> and vice versa. This resulted in the following experimental dyads: WT&WT, WT&HET, and HET&HET. Alongside of social and non-social behaviors, the number of 50-kHz USV, 50-kHz USV subtypes, and their acoustic parameters were measured. Moreover, a detailed temporal analysis of USV and specific (non-) social behaviors was performed. The tube test of social dominance was performed directly before and after each 10 min test session. Also, body weight was measured but did not differ between genotypes (*Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats:  $284.80 \pm 3.59$  g; *Cacna1c*<sup>+/+</sup> rats:  $279.18 \pm 4.39$  g;  $t_{78} = 0.991$ ,  $p = 0.325$ ).

Behavioral experiments were carried out during the light phase of a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 06:00 h). Testing was performed under red light illumination (28 lx). Rats were handled for three consecutive days prior to behavioral testing in a standardized way for 5 min. Naive rats were used for direct reciprocal social interaction and rats had no prior experience with behavioral assays, except elevated plus-maze (PND 114–137; data not shown). Behavioral analysis was performed by experienced observers blind to genotypes.

## 2.3. Direct reciprocal social interaction

On two consecutive days, pairs of female rats were allowed to socially interact for 10 min in an, at first, unfamiliar observation arena (35 x 35 cm, with Plexiglas walls, cleaned before testing with 1% acetic acid solution; floor covered with 1 cm of fresh bedding). To achieve a sufficient level of social motivation, subject rats were individually housed the night prior testing in a Makrolon type III cage (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Germany;  $27 \times 15 \times 43$  cm, length x width, x height).

## 2.4. Recording of social interaction behavior

For behavioral analyses, a digital camera system (ABUS, Wetter, Germany; cameras: "Nadelöhr Super Mini Kamera"; video capture device: "4 Kanal Digitalrekorder") was centrally arranged in the front side of the observation arena. Before both testing days, the fur of the animals was tagged with commercial markers to ensure discrimination in the subsequent video analysis.

## 2.5. Analysis of social interaction behavior

Behavioral measures (Table 1) obtained during direct reciprocal social interaction were scored individually for each animal and organized into the following major categories: social behaviors, aggressive behaviors, and non-social behaviors. Analysis was performed by an experienced observer using The Observer XT 11 (Noldus, Wagenigen, The Netherlands). For the category social behaviors (green), the duration or number of single behaviors, namely sniffing, following, social

grooming, crawling over/under, and physical contact, was determined. The category aggressive behaviors (orange) comprised the duration or number of the single behaviors boxing, piloerection, tail wiggling, and attack behavior. The category non-social behaviors (blue) consisted of the duration or number of the single behaviors self-grooming, rearing, and digging. For the major category social behaviors, a subcategory active social behaviors (light green) was created by including sniffing, following, social grooming, and crawling over/under. First, all (sub-) categories and single behaviors were compared at the dyadic level, i.e. the duration or number of behaviors of both animals were added up in each dyad. Second, single social and non-social behaviors were evaluated in WT&HET dyads on the individual level to provide an insight into genotype differences within mixed genotype dyads. Data was pooled over both test days.

## 2.6. Recording of pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations

An UltraSoundGate Condenser CM16 microphone (Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) sensitive to frequencies of 15–180 kHz (flat frequency response between 25 and 140 kHz;  $\pm 6$  dB), placed centered 40 cm above the floor of the observation arena, was used for USV recordings over the entire 10 min of social interaction. The microphone was connected via an UltraSoundGate 416H USB audio device (Avisoft Bioacoustics) to a personal computer, where acoustic data were recorded with a sampling rate of 250 kHz in 16-bit format (recording range: 0–125 kHz) by Avisoft RECORDER USGH (Avisoft Bioacoustics). Start of behavioral recording was acoustically labeled by a beep signal to synchronize audio and video recordings.

## 2.7. Analysis of pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations

For acoustical analysis, recordings were transferred to Avisoft SASLab Pro (version 5.2.09; Avisoft Bioacoustics). High-resolution spectrograms (frequency resolution: 488 Hz; time resolution: 0.512 ms) were obtained through a fast Fourier transformation (512 FFT length, 100% frame, Hamming window and 75%-time window overlap). Detection of USV emitted by rats during direct reciprocal social interaction on both test days was performed by an experienced observer, who manually counted the numbers of USV in 20 s time bins. USV with peak frequencies higher than 32 kHz were considered as 50-kHz USV and USV emitted within a frequency range of 18–32 kHz and call durations longer than 300 ms were labeled as 22-kHz USV [52]. If two USV elements were at least 10 ms apart, two independent USV were counted [49]. Based on previous studies on 50-kHz USV, a detailed analysis of 50-kHz-USV was performed during the first day of direct reciprocal social interaction for all experimental dyads and on the second test day for same-genotype dyads, i.e. WT&WT and HET&HET [42,49,52]. The following parameters were determined: call duration, peak frequency, frequency modulation, and peak amplitude. Peak frequency and peak amplitude were derived from the average spectrum of the entire call. The extent of frequency modulation was defined as the difference between the lowest and the highest peak frequency within each call.

## 2.8. Subtype classification of 50-kHz ultrasonic vocalizations

In addition, the shapes of 50-kHz USV were determined and 50-kHz USV emitted during the first day of direct reciprocal social interaction were classified into flat, step, trill, and mixed 50-kHz USV subtypes based on previously established [53] and repeatedly validated criteria [42,49,52]. Moreover, atypical 50-kHz USV with peak frequencies below 32 kHz and/or long call durations higher than 150 ms were determined. Finally, the occurrence of overlapping 50-kHz USV, i.e. when both animals were emitting 50-kHz USV simultaneously, were included in the detailed analysis.

### 2.9. Detailed temporal analyses

For linking behavioral events and 50-kHz USV, detailed temporal analyses for all experimental dyads were performed for the first day of direct reciprocal social interaction by means of high-resolution ethograms using The Observer XT (Noldus, Wageningen, The Netherlands). Additionally, same-genotype dyads, i.e. WT&WT and HET&HET, were analyzed for the second test day. The representative ethograms were modified by manually adding genotype and a time reference. A red relative-time indicator used by The Observer XT and subsequently copied into the image export was used to match 50-kHz USV and behaviors. Due to technical problems and missing start signals three dyads of each condition had to be excluded from the detailed temporal analysis of the first test day.

### 2.10. Tube test of social dominance

All animals were tested in a tube test for social dominance before and after the direct reciprocal social interaction assay. Both animals of each dyad were placed head first at opposite ends of a transparent acrylic tube (6 cm inner diameter, 44.5 cm length). Four matches were performed. A match was counted as a defeat when an animal left the tube with all four paws. Matches longer than one min were declared as a draw. Data was analyzed and presented for WT&HET dyads to show genotype differences in social dominance.

### 2.11. Statistical analysis

For comparing pro-social 50-kHz USV between dyads, analysis of variances (ANOVAs) for repeated measurements with the between-subject factor genotype (G) and the within-subject factor day (D) or minute (M) were calculated. Acoustic characteristics of 50-kHz USV were compared using ANOVAs with the between-subject factor genotype (G). The proportion of 50-kHz USV subtypes and their corresponding acoustic features were analyzed by ANOVAs for repeated measurements with the between-subject factor genotype (G) and the within-subject factor subtype (S). Genotype differences within distinct 50-kHz USV subtypes were evaluated by ANOVAs with the between-subject factor genotype (G). To examine direct reciprocal social interaction behaviors on dyadic level, first ANOVAs for repeated measurements with the between-subject factor genotype (G) and the within-subject factor category (C) were calculated. Subsequently, ANOVAs for repeated measurements with the between-subject factor genotype (G) and the within-subject factor behavior (B) were applied for all single social and non-social behaviors. Genotype-dependent effects within single behaviors were examined using ANOVAs with the between-subject factor genotype (G). Social and non-social behaviors on the individual level in WT&HET dyads were analyzed by means of paired t-tests (one-tailed), while tube test behaviors were analyzed using paired t-tests (two-tailed). For a detailed temporal analysis, 50-kHz USV emission rates during social and non-social behaviors were analyzed by an ANOVA for repeated measurements with the between-subject factor genotype (G) and the within-subject factor subtype (S). Because of a low number of subjects ( $N < 10$ ) 50-kHz USV emission rates during categorical and single social and non-social behaviors were subsequently analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis *H*-test, which is approximated by a  $\chi^2$  distribution, with the between-subject factor genotype (G), followed by post-hoc Mann-Whitney-U-test with Bonferroni-Holm corrections to control for multiple testing. Partner-dependency of direct reciprocal social interaction was analyzed using two-way ANOVAs with the between-subject factors partner's genotype (P) and day (D). ANOVAs were followed by post-hoc t-tests when appropriate. All post-hoc tests were performed by using Bonferroni corrections to control for alpha error accumulation. All ANOVAs for repeated measurements were Greenhouse-Geisser-corrected if a violation of sphericity was detected. For statistically significant outcomes, the

effect size Cohen's *d* and the suggested interpretations ( $d = 0.2$  small;  $d = 0.5$  medium, and  $d = 0.8$  large) were included [54]. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. A *p*-value of  $< 0.05$  was considered statistically significant and a *p*-value of  $< 0.10$  was considered to show a trend.

## 3. Results

In the present experiment, we investigated the effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on direct social reciprocal interaction behavior and pro-social 50-kHz USV associated with positive affect in adult female rats by comparing constitutive heterozygous *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats ( $N = 40$ ) to wildtype *Cacna1c*<sup>+/+</sup> littermate controls ( $N = 40$ ). Dyads including either *Cacna1c*<sup>+/+</sup> and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> (WT&WT;  $N = 10$ ), *Cacna1c*<sup>+/+</sup> and *Cacna1c*<sup>+/-</sup> (WT&HET;  $N = 20$ ), or *Cacna1c*<sup>+/-</sup> and *Cacna1c*<sup>+/-</sup> (HET&HET;  $N = 10$ ) animals were tested on two consecutive days.

### 3.1. Pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations

During direct reciprocal social interaction, the total number of 50-kHz USV emitted on both test days differed between experimental dyads ( $G: F_{2,37} = 6.243, p = 0.005$ ; Fig. 1A). Dyads including *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats emitted fewer 50-kHz USV than dyads including only *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls. Specifically, more 50-kHz USV were emitted by WT&WT dyads than WT&HET dyads ( $p = 0.033, d = 0.707$ ) and HET&HET dyads ( $p = 0.002, d = 1.168$ ), while 50-kHz USV emission did not differ between WT&HET and HET&HET dyads ( $p = 0.465$ ). This pattern was consistently seen across both test days ( $D: F_{1,37} = 0.093, p = 0.762$ ;  $G \times D: F_{2,37} = 0.270, p = 0.765$ ; Supplementary Fig. S1). When performing a detailed analysis of the time course of 50-kHz USV emission, genotype differences were further found to be stable ( $G: F_{1,2} = 6.387, p = 0.003$ ), with 50-kHz USV emission declining over the 10 min of social interaction ( $M: F_{5,64,434.57} = 14.409, p < 0.001$ ) irrespective of genotype ( $G \times M: F_{11,29,434.57} = 1.290, p = 0.225$ ; Fig. 1B; for representative spectrograms, see Fig. 1C). Of note, in total, only four 22-kHz USV in one WT&HET dyad were detected, with no genotype differences evident ( $F_{2,77} = 0.494, p = 0.612$ ; data not shown). Therefore, 22-kHz USV were not further analyzed.

Together, this shows that dyads including female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats emitted fewer 50-kHz USV during direct reciprocal social interaction and that the genotype differences remained stable over the 10 min of social interaction and across test days.

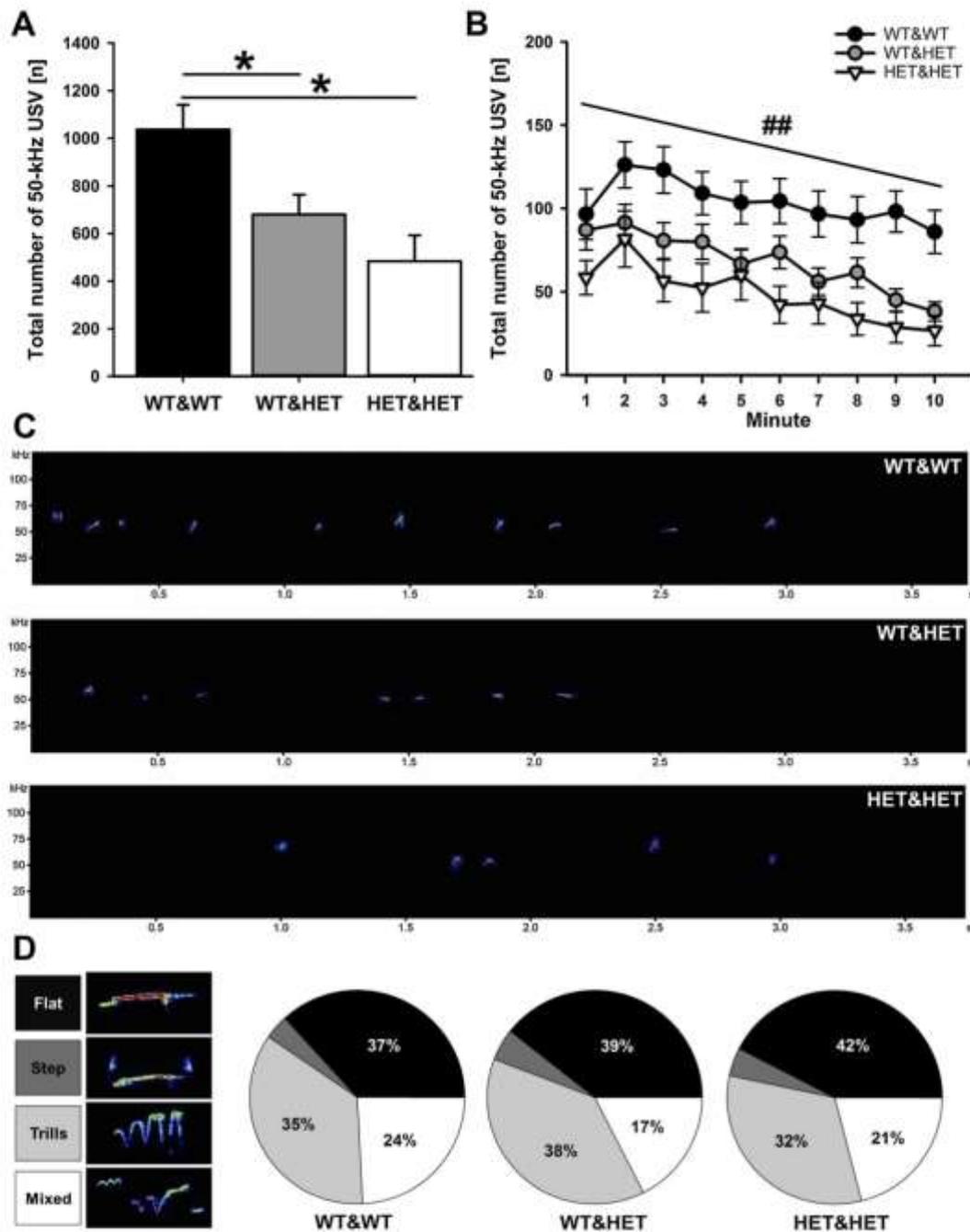
### 3.2. Subtype prevalence of 50-kHz ultrasonic vocalizations

We additionally performed a subtype classification of 50-kHz USV emitted during the first day of direct reciprocal social interaction (Fig. 1D). This classification revealed that certain 50-kHz USV subtypes were clearly more prevalent than others ( $S: F_{1,73,63.89} = 70.619, p < 0.001$ ), with flat and trill 50-kHz USV being the most frequent subtypes. However, the proportion of subtypes did not differ between experimental dyads ( $G: F_{1,37} = 1.276, p = 0.291$ ) and no significant interaction was detected ( $G \times S: F_{3,45,63.89} = 0.321, p = 0.837$ ).

Together, this indicates that the ratio of 50-kHz USV subtypes did not differ between experimental dyads. It can thus be concluded that dyads including female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats displayed a general reduction of 50-kHz USV emission during direct reciprocal social interaction in the absence of prominent genotype effects on 50-kHz USV subtype prevalence.

### 3.3. Acoustic characteristics of 50-kHz ultrasonic vocalizations

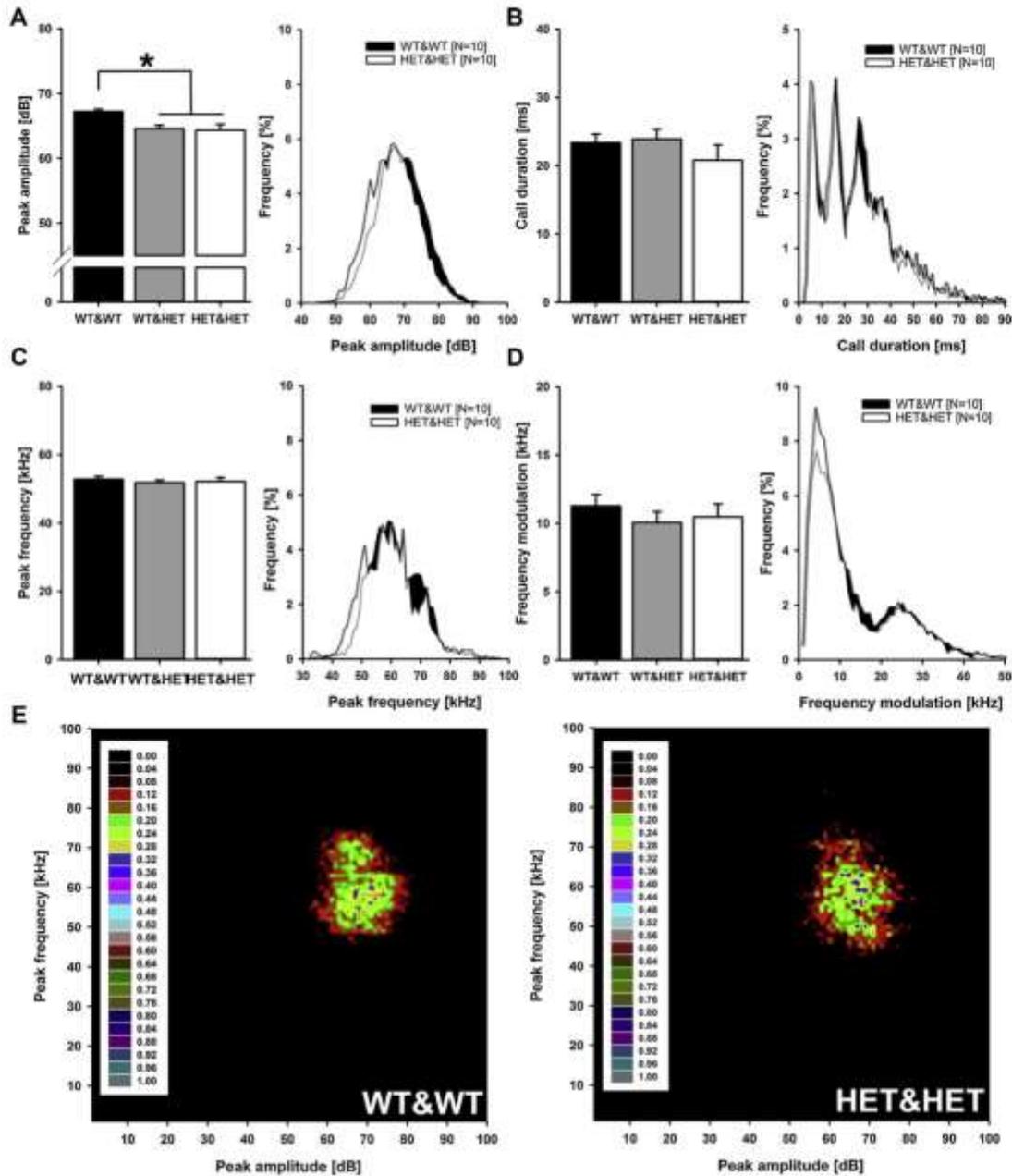
Concomitant with divergent 50-kHz USV emission rates, detailed analyses of acoustic parameters of 50-kHz USV emitted during the first day of direct reciprocal social interaction revealed differences between genotypes. Most notably, peak amplitude of 50-kHz USV differed



**Fig. 1.** Number of 50-kHz USV emitted by WT&W, WT&HET, and HET&HET dyads during direct reciprocal social interaction. (A) Total number of 50-kHz USV during 10 min of direct reciprocal social interaction in WT&WT (black bar; N = 20), WT&HET (grey bar; N = 40), and HET&HET (white bar; N = 20) dyads. (B) Time course of 50-kHz USV for the 10 min testing period. (C) Representative spectrograms of 50-kHz USV recorded during direct reciprocal social interaction of WT&WT, WT&HET, and HET&HET dyads. (D) Pie charts depicting the proportion of the different subtypes, i.e. flat (black), step (dark grey), trill (light grey), and mixed (white) 50-kHz USV emitted by WT&WT (N = 10), WT&HET (N = 20), and HET&HET (N = 10) dyads during day 1 of direct reciprocal social interaction. Data are represented as mean  $\pm$  SEM; \* p < 0.050 vs. WT&WT control dyads; \*\* p < 0.001 change over 10 min.

between experimental dyads (G:  $F_{2,37} = 5.441$ ,  $p = 0.008$ ; Fig. 2A). Specifically, the peak amplitude of 50-kHz USV emitted by WT&WT dyads was higher than the peak amplitude of WT&HET ( $p = 0.014$ ,  $d = 1.299$ ) and HET&HET ( $p = 0.022$ ,  $d = 1.312$ ) dyads, while there was no difference between WT&HET and HET&HET dyads ( $p > 0.999$ ). The decrease in peak amplitude shown in WT&HET and

HET&HET dyads was due to a gradual reduction in the occurrence of 50-kHz USV with high peak amplitudes, i.e. a shift in the entire unimodal distribution of peak amplitudes towards lower values (Fig. 2A), replicating our findings in juvenile *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats [49]. Call duration (G:  $F_{2,37} = 0.892$ ,  $p = 0.419$ ; Fig. 2B), peak frequency (G:  $F_{2,37} = 0.300$ ,  $p = 0.743$ ; Fig. 2C), and frequency modulation (G:



**Fig. 2.** Acoustic parameters of 50-kHz USV emitted by WT&WT, WT&HET, and HET&HET dyads during direct reciprocal social interaction. (A) Peak amplitude and histogram of peak amplitude (in decibel [dB]), (B) call duration and histogram of call duration (in milliseconds [ms]), (C) peak frequency and histogram of peak frequency (in kilohertz [kHz]), and (D) frequency modulation and histogram of frequency modulation (in kilohertz [kHz]) of 50 kHz USV emitted by female WT&WT (black; N = 10), WT&HET (grey; N = 20) and HET&HET (white; N = 10) dyads during day 1 of direct reciprocal social interaction. Note: Histograms show results only for WT&WT and HET&HET dyads for the sake of clarity. (E) 50-kHz USV clusters. Density plots illustrating the distribution of individual 50-kHz USV depending on peak frequency (in kilohertz [kHz]) and peak amplitude (in decibel [dB]) emitted by female WT&WT and HET&HET dyads. Color coding reflects frequencies as percentages. Density plots were created by including ~9000 50-kHz USV emitted by WT&WT controls dyads and ~4000 50-kHz USV emitted by female HET&HET dyads. Data are represented as mean ± SEM; \* p < 0.050 vs. WT&WT control dyads.

$F_{2,37} = 0.468$ ,  $p = 0.630$ ; Fig. 2D) were not affected by genotype. The distribution of call durations was characterized by three sharp peaks present irrespective of genotype (Fig. 2B). Regarding frequency modulation, a bimodal distribution was evident and two distinct call clusters were identified (Fig. 2D). The majority of calls was characterized by a frequency modulation between 1 and 10 kHz, while another cluster of calls had a frequency modulation between 20 and 30 kHz, yet

clustering was not affected by genotype. Moreover, 50-kHz USV showed a comparable unimodal distribution in terms of peak frequency, typically between 50 and 70 kHz, irrespective of genotype (Fig. 2E). A second cluster of 50-kHz USV characterized by substantially higher peak frequencies between 70 and 90 kHz recently described by Kisko et al. [49] in juvenile male rats was not detected in the present experiment. (for more in-depth information on 50-kHz USV clusters, see

**Table 1**

Would it be possible to make the description column a bite wider so that some if not all the descriptions fit into one line? That would look better, my coauthors feel, and safe space. Description and color coding of single behaviors and corresponding (sub-) categories. (For interpretation of the references to colour in this table, the reader is referred to the web version of this article.)

Single Behaviors	Description	Category	
		Subcategory	
Sniffing	One animal sniffs the anogenital area, head, nose, and flanks regions of the partner	Active social behaviors	Social behaviors
Following	One animal moves in the direction of or pursuing the partner while the partner is moving away		
Social grooming	One animal licks and nibbles the partner's pelage		
Crawling over/under	One animal approaches the flank side of the partner rat and retains close body contact as it crawls over or under the opponent		
Physical contact	One animal touches its partner passively without any clear sign of other social behaviors		
Boxing	One animal stands on its hind legs and pushes or paws the partner with its front legs and paws		Aggressive behaviors
Piloerection	Animal's fur standing up		
Tail rattling	Animal whips its tail from side to side		
Attack behavior	Animal shows biting attacks to lower flanks and dorsum or pushes the partner aside		
Self-grooming	Animal grooms its own body		Non-social behaviors
Rearing	Animal rears on its hind legs		
Digging	Animal digs up and scatters the bedding with nose or forepaws		

**Table 2**

Acoustic parameters of 50-kHz USV subtypes.

Acoustic parameters		Flat	Step	Trill	Mixed
Peak amplitude [dB]	Overall	65.22 ± 0.43	63.60 ± 0.57 <sup>#</sup>	66.41 ± 0.39 <sup>*,+</sup>	63.57 ± 0.40 <sup>*,#</sup>
	WT&WT	67.50 ± 0.42	64.13 ± 0.48 <sup>#</sup>	68.18 ± 0.50 <sup>+</sup>	65.33 ± 0.52 <sup>*,#</sup>
	WT&HET	64.77 ± 0.51 <sup>*</sup>	62.95 ± 0.69 <sup>#</sup>	65.71 ± 0.61 <sup>*,+</sup>	62.81 ± 0.49 <sup>*,#</sup>
	HET&HET	63.83 ± 1.02 <sup>+</sup>	64.45 ± 2.16	65.92 ± 0.56 <sup>(*)</sup>	63.21 ± 0.99
Call duration [ms]	Overall	19.30 ± 1.01	26.20 ± 1.35 <sup>#</sup>	22.30 ± 0.60 <sup>(*)</sup>	34.00 ± 1.24 <sup>*,+</sup>
	WT&WT	19.40 ± 1.34	25.70 ± 1.44 <sup>#</sup>	21.40 ± 1.08 <sup>+</sup>	33.30 ± 1.35 <sup>*,+</sup>
	WT&HET	20.80 ± 1.60	27.50 ± 2.05 <sup>#</sup>	23.00 ± 0.80 <sup>+</sup>	35.00 ± 2.21 <sup>*,+</sup>
	HET&HET	16.30 ± 1.92	23.40 ± 3.83	21.70 ± 1.54	32.70 ± 1.99 <sup>*,+</sup>
Peak frequency [kHz]	Overall	55.02 ± 0.57	59.17 ± 0.85 <sup>#</sup>	61.50 ± 0.59 <sup>*,+</sup>	63.05 ± 0.53 <sup>*,+</sup>
	WT&WT	55.84 ± 0.89	59.30 ± 0.91 <sup>#</sup>	61.91 ± 0.82 <sup>#</sup>	63.71 ± 0.60 <sup>*,+</sup>
	WT&HET	55.23 ± 0.79	58.75 ± 1.37 <sup>(#)</sup>	60.43 ± 0.88 <sup>#</sup>	62.58 ± 0.92 <sup>*,+</sup>
	HET&HET	53.75 ± 1.40	59.99 ± 2.28	63.29 ± 1.21 <sup>#</sup>	63.28 ± 0.94 <sup>#</sup>
Frequency modulation [kHz]	Overall	4.72 ± 0.14	19.47 ± 0.52 <sup>#</sup>	9.62 ± 0.35 <sup>*,+</sup>	24.19 ± 0.42 <sup>*,+</sup>
	WT&WT	4.84 ± 0.17	19.40 ± 0.65 <sup>#</sup>	9.55 ± 0.52 <sup>*,+</sup>	24.47 ± 0.57 <sup>*,+</sup>
	WT&HET	4.77 ± 0.24	19.72 ± 0.83 <sup>#</sup>	9.23 ± 0.52 <sup>*,+</sup>	24.01 ± 0.67 <sup>*,+</sup>
	HET&HET	4.50 ± 0.21	18.95 ± 1.32 <sup>#</sup>	10.53 ± 0.76 <sup>*,+</sup>	24.26 ± 0.99 <sup>*,+</sup>

Data are represented as means ± SEM. \* p < 0.050 vs. WT&WT control dyads within subtype; (#) p < 0.100 vs. WT&WT control dyads within subtype. # p < 0.050 vs. Flat; (##) p < 0.100 vs. Flat. + p < 0.050 vs. Step; (++) p < 0.100 vs. Step. † p < 0.050 vs. Trill; (††) p < 0.100 vs. Trill. Note: The prevalence of subtypes differed between dyads, resulting in different numbers per cell.

density plots in Supplementary Fig. S2). Comparable patterns were detected for acoustic parameters of 50-kHz USV emitted during the second day of direct reciprocal social interaction (Supplementary Fig. S3).

We additionally analyzed the acoustic parameters of each 50-kHz USV subtype emitted during the first day of direct reciprocal social interaction (Table 2), which was similarly performed before in wildtype rats [55,56]. Across all experimental dyads, peak amplitude differed between 50-kHz USV subtypes (S:  $F_{1,50,48,4} = 18.863$ ,  $p < 0.001$ ), with trill 50-kHz USV showing the highest peak amplitude. Mixed 50-kHz USV had the longest call duration (S:  $F_{1,90,55,96} = 68.316$ ,  $p < 0.001$ ), highest peak frequency (S:  $F_{1,62,50,13} = 53.710$ ,  $p < 0.001$ ), and the most pronounced frequency modulation (S:  $F_{2,13,65,90} = 668.031$ ,

$p < 0.001$ ) compared to the other 50-kHz USV subtypes. Similar patterns were observed when exclusively focusing on WT&WT dyads, where trill 50-kHz USV showed likewise the highest peak amplitude in comparison to the other 50-kHz USV subtypes (S:  $F_{3,27} = 27.248$ ,  $p < 0.001$ ). Within WT&WT dyads, mixed 50-kHz USV had again the longest call duration (S:  $F_{3,27} = 74.028$ ,  $p < 0.001$ ), the highest peak frequency (S:  $F_{3,27} = 39.312$ ,  $p < 0.001$ ), and the highest level of frequency modulation (S:  $F_{3,27} = 490.391$ ,  $p < 0.001$ ) compared to the other 50-kHz USV subtypes. In fact, the pattern was consistent across all experimental dyads and we did not obtain evidence for prominent interactions between experimental dyad and acoustic features of the 50-kHz USV subtypes, i.e. peak amplitude (GxS:  $F_{3,10,48,04} = 0.910$ ,  $p = 0.446$ ), call duration (GxS:  $F_{3,80,58,86} = 0.840$ ,  $p = 0.500$ ), peak

frequency (GxS:  $F_{3,23,50.13} = 0.670$ ,  $p = 0.585$ ), and frequency modulation (GxS:  $F_{4,25,65.90} = 0.386$ ,  $p = 0.829$ ). Our results stand therefore in line with previous studies showing that trill 50-kHz USV exhibit higher peak frequencies than flat and step 50-kHz USV subtypes even though they focused on different rat strains [55,56]. However, in our hands, mixed 50-kHz USV had the longest call duration, highest peak frequency, and the most pronounced frequency modulation compared to all other 50-kHz USV subtypes, yet this mixed 50-kHz USV subtype was not included as a separate subtype in the previous studies [55,56].

Together, it can thus be concluded that the reduction of 50-kHz USV emission during direct reciprocal social interaction seen in dyads including female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats was paralleled by a reduction in peak amplitudes of 50-kHz USV.

### 3.4. Direct reciprocal social interaction on dyadic level

Next, we focused on social and non-social behaviors on dyadic level to gain a better understanding of the effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on these behaviors during direct reciprocal social interaction (Table 1). Across all experimental dyads, the category non-social behaviors was most prevalent, followed by social behaviors, mostly active social behaviors, while aggressive behaviors occurred rarely (C:  $F_{1,45,111.37} = 645.831$ ,  $p < 0.001$ ). Importantly, however, the occurrence of social and non-social behaviors was clearly dependent on experimental dyads (G:  $F_{2,77} = 3.912$ ,  $p = 0.024$ ; GxG:  $F_{2,89,111.37} = 2.320$ ,  $p = 0.081$ ).

At the categorical level, social behaviors were not affected by genotype and the time engaged in social behaviors was similar in the three experimental dyads (G:  $F_{2,77} = 1.738$ ,  $p = 0.183$ ; Fig. 3A). Moreover, no evidence for differences in the subcategory active social behaviors was obtained (G:  $F_{2,77} = 2.148$ ,  $p = 0.124$ ; Fig. 3B). There was a trend for genotype differences in aggressive behaviors (G:  $F_{2,77} = 2.910$ ,

$p = 0.060$ ; Fig. 3C) but due to very low levels of aggression this category was not further analyzed. This indicates that the genotype effect on the occurrence of social and non-social behaviors at the categorical level was primarily driven by differences between experimental dyads in non-social behaviors (G:  $F_{2,77} = 3.242$ ,  $p = 0.044$ ). In fact, behaviors in the category non-social behaviors were reduced in HET&HET dyads, as compared to WT&WT dyads ( $p = 0.040$ ,  $d = 0.746$ ; WT&WT vs. WT&HET:  $p = 0.280$ ; WT&HET vs. HET&HET:  $p = 0.677$ ; Fig. 3D).

At the level of single social behaviors, however, a different pattern was evident. While the occurrence of most single social behaviors varied consistently across experimental dyads (B:  $F_{1,60,123.25} = 118.069$ ,  $p < 0.001$ ), the prevalence of others was clearly affected by genotype in a rather specific manner (G:  $F_{2,77} = 1.738$ ,  $p = 0.183$ ; GxB:  $F_{3,20,123.25} = 3.114$ ,  $p = 0.026$ ). In fact, the social behaviors sniffing (G:  $F_{2,77} = 0.896$ ,  $p = 0.412$ ; Fig. 4A), following (G:  $F_{2,77} = 2.125$ ,  $p = 0.126$ ; Fig. 4B), social grooming (G:  $F_{2,77} = 1.485$ ,  $p = 0.233$ ; Fig. 4C), and the number of crawling over/under (G:  $F_{2,77} = 0.488$ ,  $p = 0.616$ ; not shown) were not affected by genotype. However, experimental dyad had a prominent effect on the time spent in physical contact (G:  $F_{2,77} = 3.568$ ,  $p = 0.033$ ). HET&HET pairs engaged more in physical contact than WT&WT ( $p = 0.077$ ) and WT&HET dyads ( $p = 0.049$ ,  $d = 0.610$ ; WT&WT vs. WT&HET:  $p > 0.999$ ; Fig. 4D). This indicates that, although the genotype effect on social behavior was moderate and experimental dyads did not differ in the overall level of time engaged in social behaviors, the prevalence of single social behaviors was affected, most notably physical contact.

Much stronger genotype effects, however, were obtained at the level of single non-social behaviors. Despite the fact that the occurrence of most single non-social behaviors varied systematically across experimental dyads (B:  $F_{1,54,118.60} = 459.106$ ,  $p < 0.001$ ), their prevalence was strongly affected by genotype (G:  $F_{2,77} = 3.210$ ,  $p = 0.046$ ; GxB:  $F_{3,08,118.60} = 16.552$ ,  $p < 0.001$ ). Specifically, the duration spent self-

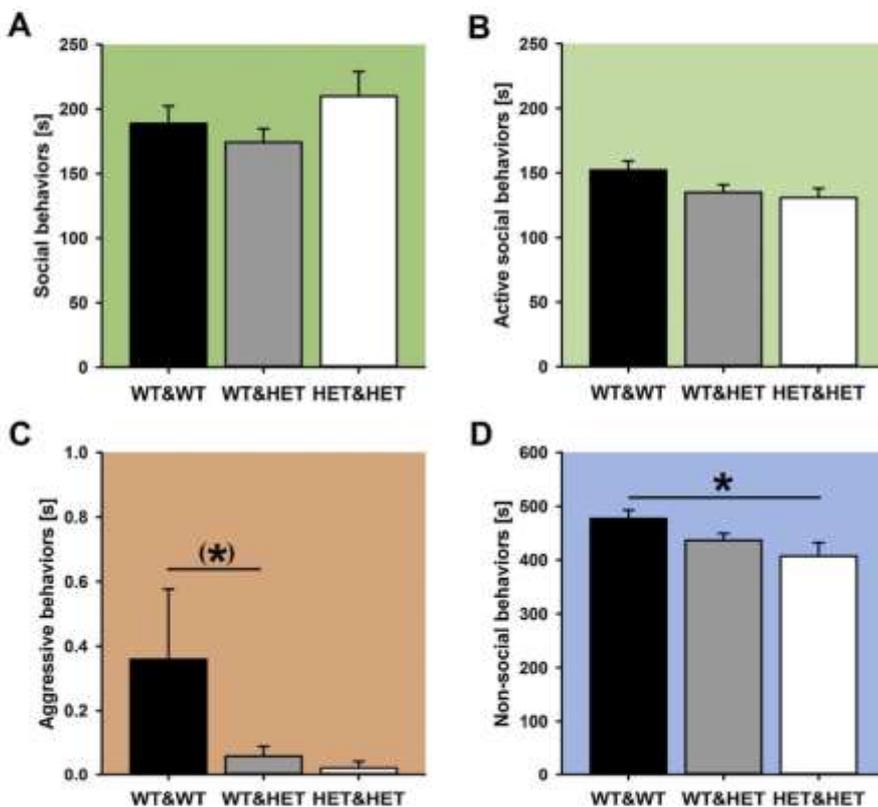
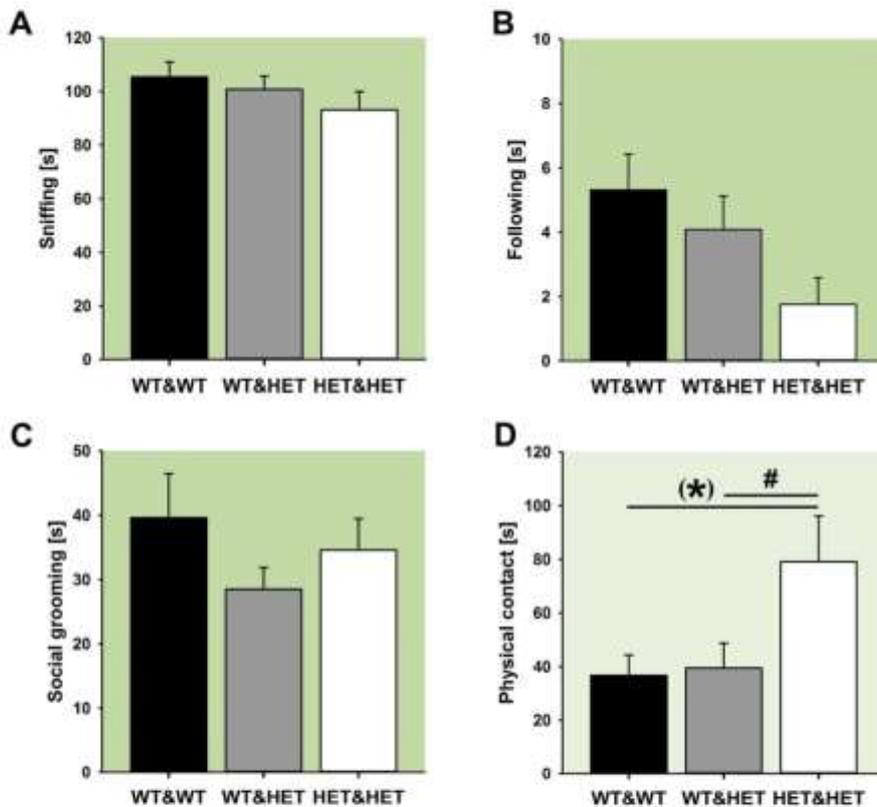


Fig. 3. Duration of categorical behaviors in WT&WT, WT&HET, and HET&HET dyads on dyadic level. (A) Duration of social behaviors, (B) duration of active social behaviors, (C) duration of aggressive behaviors, and (D) duration of non-social behaviors in WT&WT (black bar; N = 20), WT&HET (grey bar; N = 40), and HET&HET (white bar; N = 20) dyads. Data are represented as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.050$  vs. WT&WT control dyads; (\*)  $p < 0.100$  vs. WT&WT control dyads.



**Fig. 4.** Duration of single social behaviors in WT&WT, WT&HET, and HET&HET dyads on dyadic level. (A) Duration of sniffing, (B) duration of following, (C) duration of social grooming, and (D) duration of physical contact in WT&WT (black bar; N = 20), WT&HET (grey bar; N = 40), and HET&HET (white bar; N = 20) dyads. Data are represented as mean ± SEM; \*  $p < 0.050$  vs. WT&WT control dyads; (\*)  $p < 0.100$  vs. WT&WT control dyads; #  $p < 0.050$  vs. WT&HET dyads.

grooming was affected by genotype (G:  $F_{2,77} = 9.229$ ,  $p < 0.001$ ), with HET&HET dyads engaging more in self-grooming than WT&WT ( $p < 0.001$ ,  $d = 1.184$ ) and WT&HET ( $p = 0.003$ ,  $d = 0.841$ ) dyads, while the latter did not differ ( $p = 0.515$ ; Fig. 5A). Also, the number of rearings was affected by genotype (G:  $F_{2,77} = 12.224$ ,  $p < 0.001$ ). HET & HET dyads showed a decreased number of rearings compared to WT&WT ( $p < 0.001$ ,  $d = 1.538$ ) and WT&HET ( $p = 0.002$ ,  $d = 0.598$ ) dyads, while there were no differences between WT&WT and WT&HET dyads ( $p = 0.105$ ; Fig. 5B). Moreover, the time spent digging was influenced by genotype (G:  $F_{2,77} = 7.947$ ,  $p = 0.001$ ), with HET&HET ( $p = 0.002$ ,  $d = 1.101$ ) and WT&HET ( $p = 0.002$ ,  $d = 0.939$ ) dyads digging less compared to WT&WT control dyads. There were no differences in digging time between HET&HET and WT&HET dyads ( $p > 0.999$ ; Fig. 5C).

Together, similar levels of social behaviors at dyadic level were detected, although physical contact was enhanced in adult female dyads including *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats, as compared to *Cacna1c*<sup>+/+</sup> control dyads. Interestingly, most prominent effects became apparent during non-social behaviors, i.e. dyads including *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats showed more self-grooming, though less rearing and digging behavior, compared to *Cacna1c*<sup>+/+</sup> control dyads.

### 3.5. Detailed temporal analyses of 50-kHz ultrasonic vocalizations and behaviors

In an additional exploratory approach, we further aimed at obtaining new insights into the temporal synchronization of individual components of the behavioral repertoire and the emission of 50-kHz USV. A detailed temporal analysis revealed that most 50-kHz USV were emitted during social behaviors, as evidenced by elevated 50-kHz USV emission rates during social behaviors compared to non-social behaviors, consistently across all experimental dyads (B:  $F_{1,71} = 33.537$ ,

$p < 0.001$ ), i.e. WT&WT ( $t_{17} = 3.390$ ,  $p = 0.003$ ), WT&HET ( $t_{37} = 3.655$ ,  $p = 0.001$ ), and HET&HET ( $t_{17} = 3.170$ ,  $p = 0.006$ ) dyads. Moreover, 50-kHz USV emission differed between experimental dyads (G:  $F_{2,71} = 3.646$ ,  $p = 0.031$ ; GxB:  $F_{2,71} = 0.632$ ,  $p = 0.535$ ). Specifically, genotype effects on the emission of 50-kHz USV during social behaviors were obtained (G:  $H_2 = 6.510$ ,  $p = 0.039$ ; Fig. 6A), with WT&WT dyads emitting more 50-kHz USV than HET&HET dyads ( $p = 0.045$ ,  $d = 0.633$ ) and WT&HET dyads displaying an intermediate phenotype (WT&WT vs. WT&HET:  $p = 0.214$ ; WT&HET vs. HET&HET:  $p = 0.214$ ). This can be explained by genotype differences during following (G:  $H_2 = 10.562$ ,  $p = 0.005$ ) and, partially, sniffing (G:  $H_2 = 5.335$ ,  $p = 0.069$ ). WT&WT dyads emitted more 50-kHz USV during following than WT&HET ( $p = 0.006$ ,  $d = 0.463$ ) and HET&HET dyads ( $p = 0.048$ ,  $d = 0.734$ ), while levels in WT&HET and HET&HET dyads were almost equal ( $p = 0.759$ ). In contrast, the emission of 50-kHz USV during social grooming (G:  $H_2 = 1.464$ ,  $p = 0.481$ ), physical contact (G:  $H_2 = 3.027$ ,  $p = 0.220$ ), and crawling over/under (G:  $H_2 = 0.244$ ,  $p = 0.885$ ; not shown) did not differ between experimental dyads.

Surprisingly, most prominent differences between experimental dyads were seen for 50-kHz USV emitted during non-social behaviors (G:  $H_2 = 11.416$ ,  $p = 0.003$ ; Fig. 6A). While engaging in non-social behaviors, WT&WT dyads emitted more 50-kHz USV than HET&HET dyads ( $p = 0.001$ ,  $d = 1.051$ ), with WT&HET dyads displaying an intermediate phenotype (WT&WT vs. WT&HET:  $p = 0.056$ ; WT&HET vs. HET&HET:  $p = 0.068$ ). This effect was driven by particularly prominent differences between experimental dyads during self-grooming (G:  $H_2 = 12.592$ ,  $p = 0.002$ ), rearing (G:  $H_2 = 10.003$ ,  $p = 0.007$ ), and digging (G:  $H_2 = 8.245$ ,  $p = 0.016$ ). Specifically, during self-grooming, WT&WT dyads emitted more 50-kHz USV than HET&HET dyads ( $p = 0.001$ ,  $d = 1.127$ ), with WT&HET dyads again showing an intermediate phenotype (WT&WT vs. WT&HET:  $p = 0.710$ ; WT&HET vs.

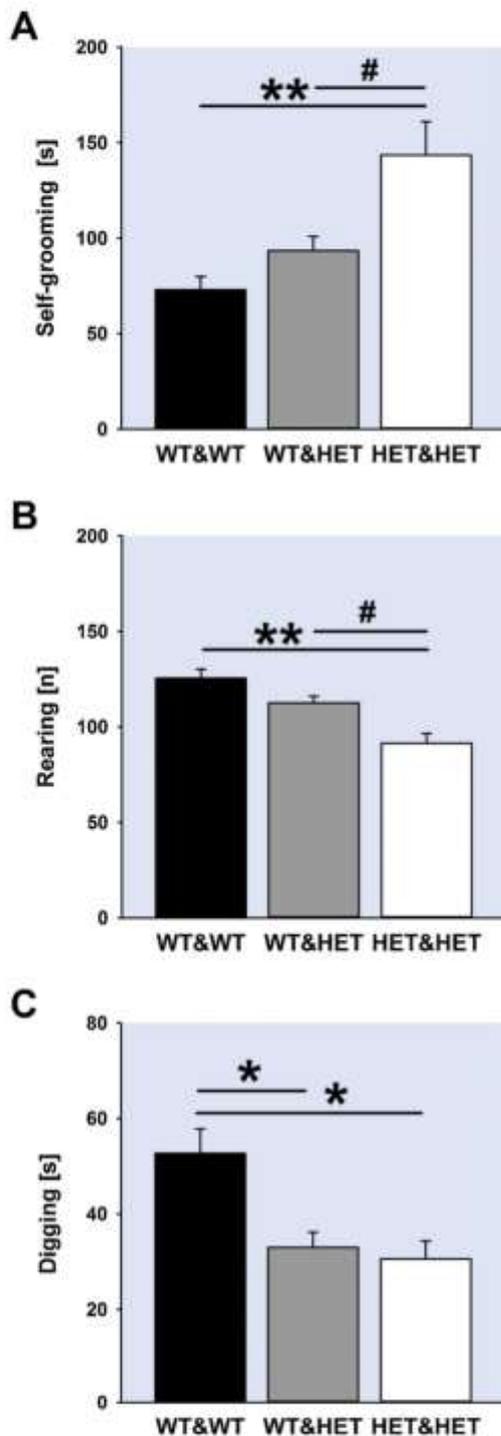


Fig. 5. Duration or number of single non-social behaviors in WT&WT, WT&HET, and HET&HET dyads on dyadic level. (A) Duration of self-grooming, (B) number of rearing, and (C) duration of digging in WT&WT (black bar;  $N = 20$ ), WT&HET (grey bar;  $N = 40$ ), and HET&HET (white bar;  $N = 20$ ) dyads. Data are represented as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.050$  vs. WT&WT control dyads. \*\*  $p < 0.001$  vs. WT&WT control dyads. #  $p < 0.050$  vs. WT&HET dyads.

HET&HET:  $p = 0.030$ ,  $d = 0.640$ ). The same pattern was present for rearing. WT&WT dyads emitted more 50-kHz USV than HET&HET dyads during rearing ( $p = 0.003$ ,  $d = 0.985$ ), while WT&HET dyads tended to differ in 50-kHz USV emission rates from the other experimental dyads (WT&WT vs. WT&HET:  $p = 0.088$ ; WT&HET vs. HET&HET:  $p = 0.099$ ). During digging, comparable results were obtained, with WT&WT dyads emitting more 50-kHz USV than the other experimental dyads (WT&WT vs. WT&HET:  $p = 0.044$ ,  $d = 0.441$ ; WT&WT vs. HET&HET:  $p = 0.009$ ,  $d = 0.893$ ; for representative ethograms of WT&WT dyads and HET&HET dyads, see Fig. 6B and C, respectively). A detailed temporal analysis of the second test day revealed comparable patterns of 50-kHz USV emission during social and non-social behaviors (Supplementary Fig. S3).

Together, our detailed temporal analysis revealed that the majority of 50-kHz USV were emitted during social behaviors. Despite this and the fact that genotype effects on 50-kHz USV emission were evident during both social and non-social behaviors, however, most prominent genotype effects were seen during non-social behaviors as indicated by a reduced number of 50-kHz USV seen in dyads including *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats during self-grooming, rearing, and digging.

### 3.6. Single social and non-social behaviors on individual level in WT&HET dyads

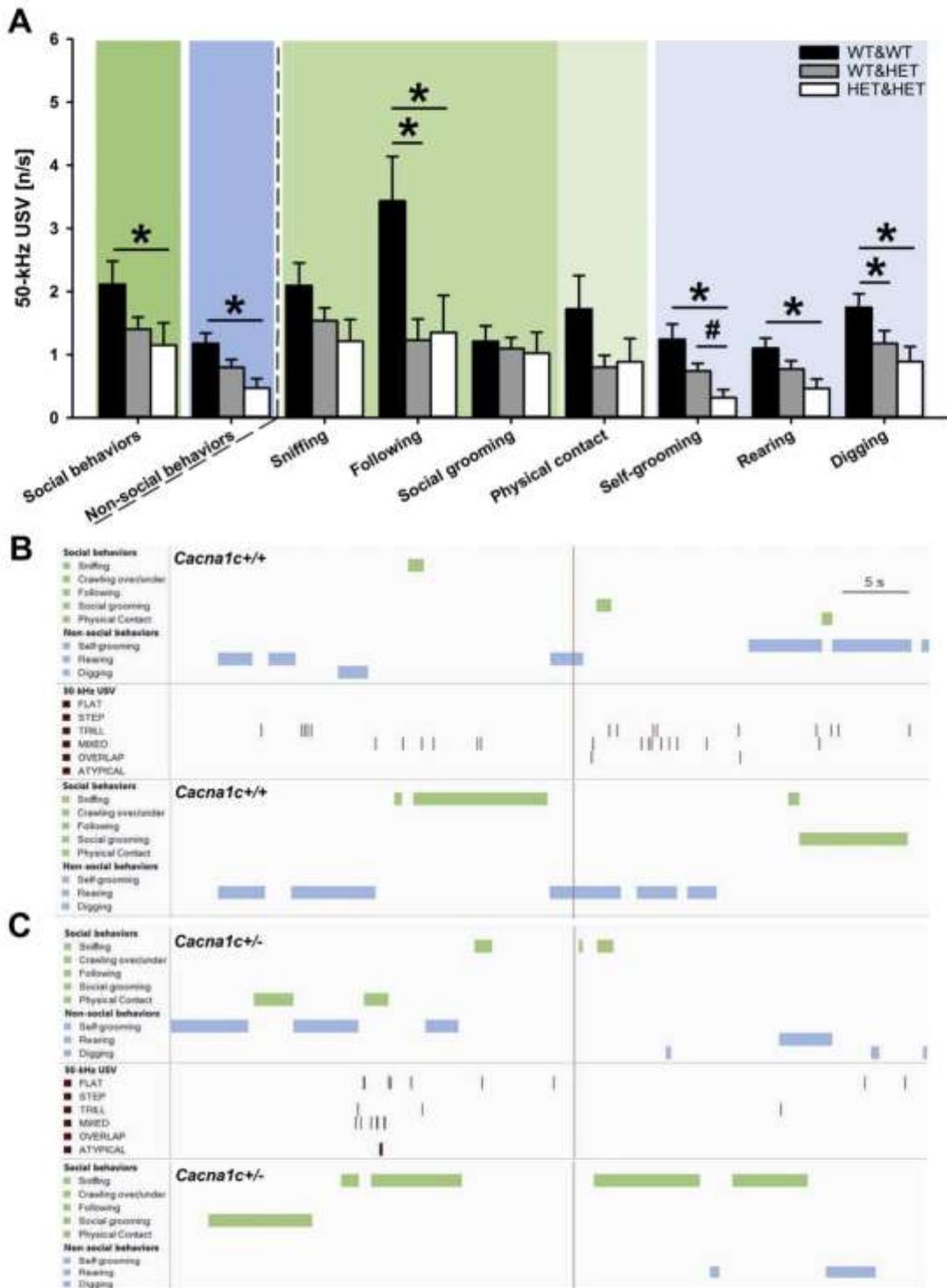
Furthermore, we individually analyzed the behavior of *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls in WT&HET dyads to gain a detailed insight into genotype effects on single social and non-social behaviors. While socially interacting with a *Cacna1c*<sup>+/-</sup> partner, *Cacna1c*<sup>+/+</sup> animals spent more time sniffing the partner than *Cacna1c*<sup>+/-</sup> animals sniffing them ( $t_{39} = 2.114$ ,  $p = 0.021$ ,  $d = 0.434$ ; Fig. 7A). This indicates that the *Cacna1c*<sup>+/-</sup> partners were extensively sniffed by *Cacna1c*<sup>+/+</sup> animals, yet that *Cacna1c*<sup>+/-</sup> partners did not reciprocate. There were no genotype differences in terms of following ( $t_{39} = 0.273$ ,  $p = 0.394$ ; Fig. 7B), social grooming ( $t_{39} = 0.536$ ,  $p = 0.298$ ; Fig. 7C), crawling over/under ( $t_{39} = 1.267$ ,  $p = 0.107$ ; not shown), and physical contact ( $t_{39} = 0.648$ ,  $p = 0.260$ ; Fig. 7D).

Consistent with the dyadic level, more pronounced genotype effects were again seen in non-social behaviors. *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls showed an increased number of rearings ( $t_{39} = 3.023$ ,  $p = 0.002$ ,  $d = 0.721$ ; Fig. 7E) and spent more time digging ( $t_{39} = 2.319$ ,  $p = 0.013$ ,  $d = 0.486$ ; Fig. 7F) compared to *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats. Interestingly, *Cacna1c*<sup>+/-</sup> animals tended to display increased self-grooming while interacting with *Cacna1c*<sup>+/+</sup> partners ( $t_{39} = 1.628$ ,  $p = 0.056$ ; Fig. 7G), replicating increased self-grooming behavior in HET&HET dyads (Fig. 5A). While there was no difference in the tube test when performed before direct reciprocal social interaction ( $t_{39} = 0.534$ ,  $p = 0.596$ ), *Cacna1c*<sup>+/-</sup> animals won more often than *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls in the tube test after interacting with each other ( $t_{39} = 2.648$ ,  $p = 0.012$ ; Fig. 7H).

Together, *Cacna1c*<sup>+/-</sup> partners were extensively sniffed by *Cacna1c*<sup>+/+</sup> animals, yet *Cacna1c*<sup>+/-</sup> partners did not reciprocate but tended to display increased self-grooming while interacting with *Cacna1c*<sup>+/+</sup> partners.

### 3.7. Partner-dependency of direct reciprocal social interaction

To test whether social behaviors displayed by individual animals were dependent on their partner's genotype, we took advantage of our repeated measures design and compared behavioral changes across the two consecutive test days in *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> littermate controls. In *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls, the influence of the partner's genotype was absent and social behaviors were not affected by their partner's genotype between test days (P:  $F_{1,76} = 0.051$ ,  $p = 0.822$ ; D:  $F_{1,76} = 0.204$ ,  $p = 0.653$ ; Px D:  $F_{1,76} = 0.002$ ,  $p = 0.967$ ; Fig. 8A). In addition, single social behaviors, i.e. following (P:  $F_{1,76} = 0.232$ ,  $p = 0.631$ ; D:  $F_{1,76} = 1.023$ ,  $p = 0.315$ ; Px D:  $F_{1,76} = 0.510$ ,  $p = 0.477$ ;



**Fig. 6.** Social and non-social behaviors and concomitant emission of 50-kHz USV during direct reciprocal social interaction. (A) 50-kHz USV emission during social behaviors, non-social behaviors and single behaviors (sniffing, following, social grooming, physical contact, self-grooming, rearing, and digging) with 50-kHz USV being presented for WT&WT (black bar; N = 9), WT&HET (grey bar; N = 19), and HET&HET (white bar; N = 9) dyads. (B) Representative ethograms of WT&W dyads and (C) HET&HET dyads showing single behaviors of both animals with concomitant 50-kHz USV emission. Single social behaviors (green) and non-social behaviors (blue) of individual animals are depicted, together with 50-kHz USV subtypes (red) of this dyad for the entire 10 min of direct reciprocal social interaction on day 1. Data are represented as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.050$  vs. WT&WT dyads. #  $p < 0.050$  vs. WT&HET dyads.

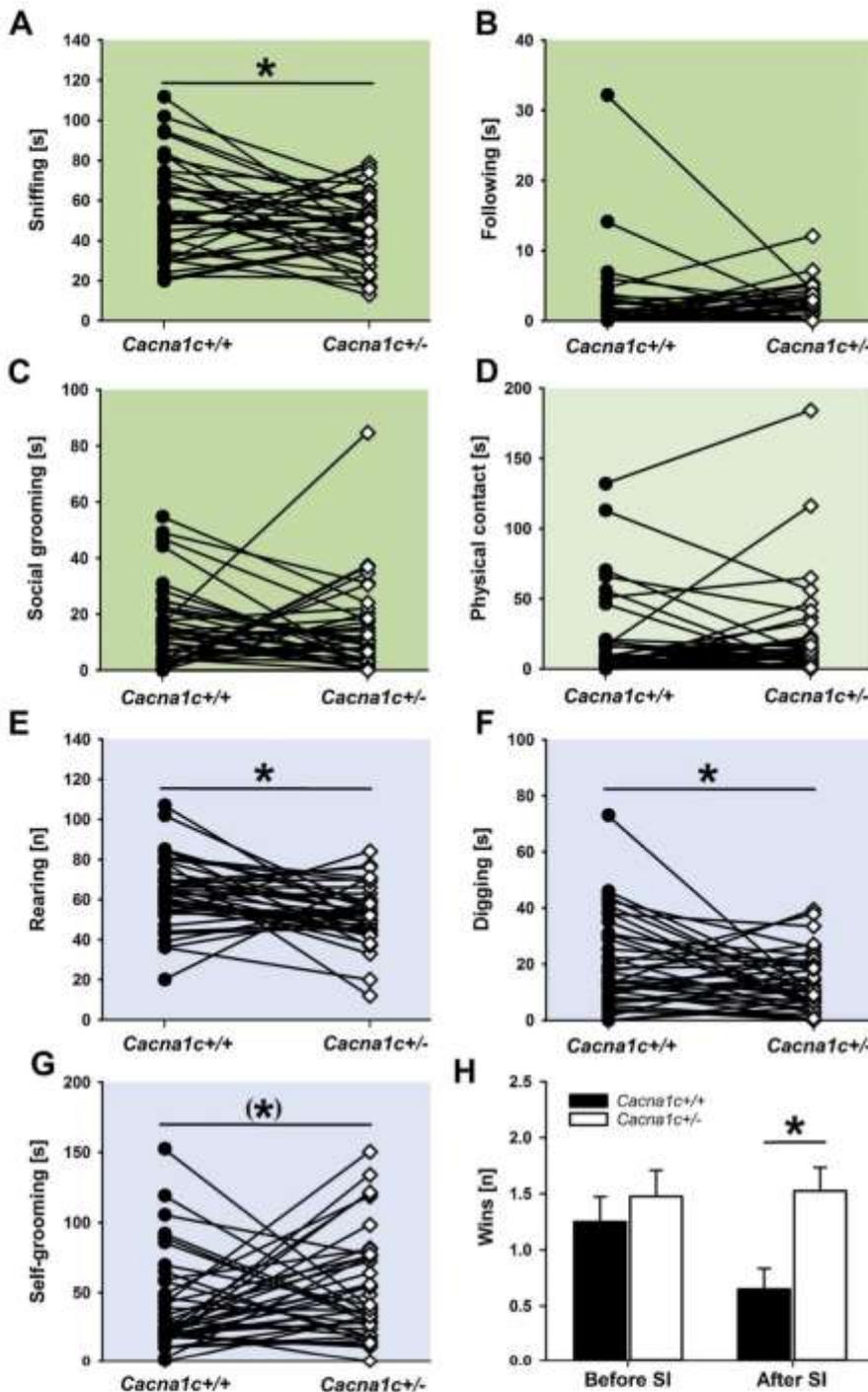
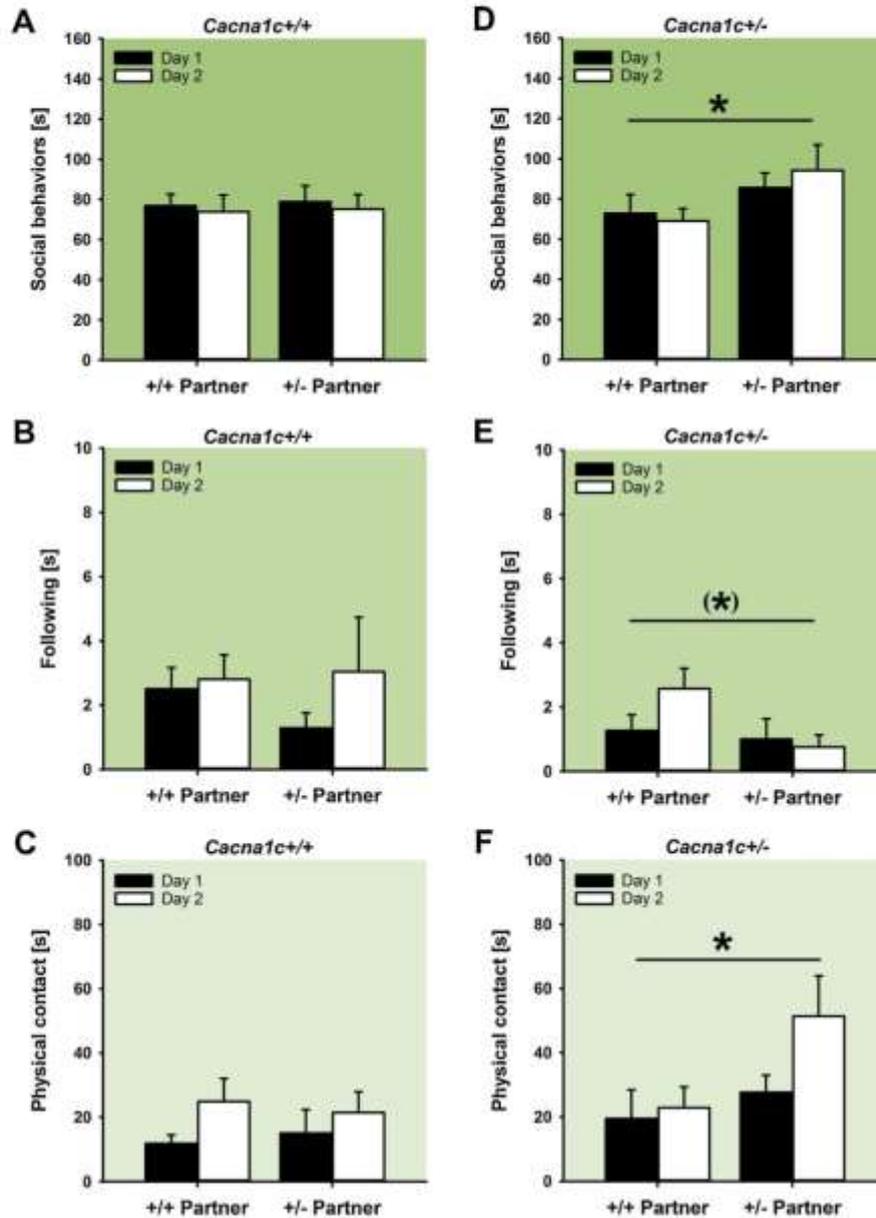


Fig. 7. Duration or number of single social and non-social behaviors on individual level and tube test results of *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls in WT&HET dyads. (A) Duration of sniffing, (B) duration of following, (C) duration of social grooming, (D) duration of physical contact, (E) number of rearing, (F) duration of digging, and (G) duration of self-grooming of *Cacna1c*<sup>+/-</sup> (black circle; N = 40) and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> (white diamond; N = 40) control rats. (H) Number of wins in the tube test before and after direct reciprocal social interaction (SI). Data are represented as mean ± SEM; \* p < 0.050 vs. *Cacna1c*<sup>+/+</sup> control animals; (\*) p < 0.100 vs. *Cacna1c*<sup>+/+</sup> control animals.

Fig. 8B), physical contact (P:  $F_{1,76} = 0.001$ ,  $p = 0.984$ ; D:  $F_{1,76} = 2.487$ ,  $p = 0.119$ ; PxD:  $F_{1,76} = 0.291$ ,  $p = 0.591$ ; Fig. 8C), sniffing (P:  $F_{1,76} = .195$ ,  $p = 0.660$ ; D:  $F_{1,76} = 7.514$ ,  $p = 0.008$ ; PxD:  $F_{1,76} = 0.540$ ,  $p = 0.465$ ; not shown), social grooming (P:  $F_{1,76} = 1.298$ ,  $p = 0.258$ ; D:  $F_{1,76} = 1.168$ ,  $p = 0.283$ ; PxD:  $F_{1,76} = 2.189$ ,  $p = 0.143$ ; not shown), and crawling over/under (P:  $F_{1,76} = 0.043$ ,  $p = 0.836$ ; D:  $F_{1,76} = 2.760$ ,  $p = 0.101$ ; PxD:  $F_{1,76} = 0.173$ ,  $p = 0.679$ ; not shown) were likewise not affected by the partner's genotype.

Intriguingly, however, social behaviors displayed by *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats were dependent on their partner's genotype (P:  $F_{1,76} = 4.158$ ,  $p = 0.045$ ), while neither a main effect of test day (D:  $F_{1,76} = 0.068$ ,  $p = 0.795$ ) nor a significant interaction was detected (PxD:  $F_{1,76} = 0.443$ ,  $p = 0.508$ ; Fig. 8D). *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats showed enhanced levels of social behaviors when interacting with a same-genotype partner, yet reduced levels when confronted with a *Cacna1c*<sup>+/+</sup> control. This pattern was driven by the time spent in physical contact (P:  $F_{1,76} = 4.382$ ,  $p = 0.040$ ; D:  $F_{1,76} = 2.388$ ,  $p = 0.126$ ; PxD:



**Fig. 8. Partner-dependency of direct reciprocal interaction behavior.** (A) and (D) duration of the category social behaviors, (B) and (E) duration of following, (C) and (F) duration of physical contact in *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls (N = 40) and *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats (N = 40), respectively, dependent on the partner's genotype for the first (black bar) and the second test day (white bar). Data are represented as mean ± SEM; \* p < 0.050 main effect partner's genotype; (\*) p < 0.100 main effect partner's genotype.

$F_{1,76} = 1.335$ ,  $p = 0.251$ ; Fig. 8E). *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats spent more time physically close to a same-genotype partner than a *Cacna1c*<sup>+/+</sup> control. Contrary to the pattern shown before, *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats tended to show a reduction of following when interacting with a same-genotype partner (P:  $F_{1,76} = 3.707$ ,  $p = 0.058$ ; D:  $F_{1,76} = 0.949$ ,  $p = 0.333$ ; PxD:  $F_{1,76} = 2.045$ ,  $p = 0.157$ ; Fig. 8F). Other single behaviors were not affected by partner's genotype, including sniffing (P:  $F_{1,76} = 0.018$ ,  $p = 0.894$ ; D:  $F_{1,76} = 8.505$ ,  $p = 0.005$ ; PxD:  $F_{1,76} = 0.505$ ,  $p = 0.479$ ; not shown), social grooming (P:  $F_{1,76} = 1.153$ ,  $p = 0.286$ ; D:  $F_{1,76} = 8.306$ ,  $p = 0.005$ ; PxD:  $F_{1,76} = 0.011$ ,  $p = 0.917$ ; not shown), and crawling over/under (P:  $F_{1,76} = 0.026$ ,  $p = 0.873$ ; D:  $F_{1,76} = 5.832$ ,  $p = 0.018$ ; PxD:  $F_{1,76} = 3.136$ ,  $p = 0.081$ ; not shown).

Together, these results indicate that *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats change their social behaviors depending on their partner's genotype, while *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls do not vary their behavior and retain their response pattern irrespective of the partner's genetic status.

#### 4. Discussion

The *CACNA1C* risk gene has been implicated in the etiology of all major neuropsychiatric disorders [7] and sex-dependent effects of SNPs within *CACNA1C* have been identified, with potentially stronger effects in women [13,14]. While relevant pathomechanisms are still not well understood, there is striking evidence that Ca<sub>v</sub>1.2 channels play a key

role in various brain processes in humans and rodents, ultimately resulting in behavioural impairments, e.g. social functioning (for review see: [19]). In rodents, genetic modifications specifically targeting *Cacna1c* have been repeatedly linked to deficits in social behavior [25,28] and first studies confirmed sex-dependent effects in humans [13,14]. Based on our recent findings of sex-specific effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on rough-and-tumble play behavior and concomitant emission of pro-social 50-kHz USV in juvenile rats [49,50], we expected to find altered social behavior and/or 50-kHz USV in adult female rats.

In line with our hypothesis, we detected reduced emission of pro-social 50-kHz USV during direct reciprocal social interaction in adult female dyads including a *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rat, as compared to *Cacna1c*<sup>+/+</sup> control dyads. This reduction was consistently seen across both test days. Moreover, the peak amplitude of 50-kHz USV emitted by adult female dyads including a *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rat was lower. Other acoustic features and the ratio of 50-kHz USV subtypes, however, did not differ between experimental dyads.

Our detailed temporal analyses showed that pro-social 50-kHz USV were primarily emitted during social behaviors. Consistently across all experimental dyads, 50-kHz USV emission rates were highest during social behaviors compared to non-social behaviors. Moreover, at the dyadic level, similar levels of social behaviors were seen in all experimental dyads, with the exception of enhanced physical contact in adult female dyads including a *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rat, as compared to *Cacna1c*<sup>+/+</sup> control dyads. At the individual level, in mixed WT&HET dyads, *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls spent more time sniffing *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats than vice versa. Remarkably, *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats showed dominance over *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls after social interaction in the tube test. In addition, we were able to show that *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats but not *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls change their social behavior based on their partner's genotype.

Surprisingly, however, most robust genotype differences were seen during non-social behaviors. Dyads including a *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rat showed increased self-grooming compared to *Cacna1c*<sup>+/+</sup> control dyads, while rearing and digging behavior was reduced. Detailed temporal analyses further revealed that dyads including *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats emitted fewer 50-kHz USV during social and especially non-social behaviors.

We wish to emphasize, however, that our detailed temporal analyses aimed at obtaining new insights into the temporal synchronization of individual components of the behavioral repertoire and the emission of 50-kHz USV was exploratory in nature and bear the risk of alpha-error accumulation. This is also true for our subtype classification of 50-kHz USV and the determination of their acoustic features. Replications in independent samples appear therefore warranted. To this aim, we performed the same analyses not only for the first but also the second day of direct reciprocal social interaction, where each rat was exposed to a novel partner. In this initial effort, we obtained evidence indicating that the temporal synchronization of individual components of the behavioral repertoire and the emission of 50-kHz USV is relatively stable (Supplementary Fig. S3). This is also true for the acoustic parameters of 50-kHz USV (Supplementary Fig. S3). Finally, we wish to note that similar results were obtained by parametric and non-parametric statistical analyses (Supplementary Table 1).

Our findings of reduced emission of 50-kHz USV in adult female dyads including a *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rat are at variance with our previous results in juvenile female *Cacna1c* haploinsufficient rats [50]. In juvenile females, partial *Cacna1c* depletion was associated with strongly enhanced rough-and-tumble play behavior, although *Cacna1c* haploinsufficiency had no effect on 50-kHz USV emission. A pattern similar to our present findings, however, was obtained in juvenile male *Cacna1c* haploinsufficient rats [49]. In juvenile males, 50-kHz USV emission during rough-and-tumble play was reduced in *Cacna1c* haploinsufficient rats, yet this reduction was not associated with alterations in rough-and-tumble play behavior. Likewise, reduced peak amplitude of 50-kHz USV appears to be stable across development. Specifically, during rough-and-tumble play, dyads consisting of juvenile male

*Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats emitted fewer 50-kHz USV with lower amplitude compared to dyads including *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls [49]. Regarding 50-kHz USV subtypes, we detected the same ratio of flat, step, trill, and mixed 50-kHz USV in all experimental dyads. The most frequent 50-kHz USV subtypes were flat and trill, followed by mixed, while step 50-kHz USV were less detected. Similar ratios of 50-kHz USV subtypes were evident in juvenile male *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls [49] and this might be a general pattern because Wright et al. [56] found that dyads of male rats emitted high proportions of flat and trill 50-kHz USV during direct reciprocal social interaction as well. However, while the prevalence of 50-kHz USV subtypes appears to be similar in both sexes and across developmental stages, 50-kHz USV clustering might be affected by sex and/or developmental stage. For instance, we recently described two 50-kHz USV clusters depending on their peak frequency [49]. The first cluster was characterized by peak frequencies between 50 and 70 kHz. This cluster was evident in the present experiment in adult female rats as well. However, a second cluster of 50-kHz USV characterized by substantially higher peak frequencies between 70 and 90 kHz recently described by Kisko et al. [49] in juvenile male rats was not detected in the present experiment.

There is convincing evidence that the emission of 50-kHz USV is involved in the regulation of social behaviors in rats (for review see: [57]). For instance, rats selectively bred for low levels of 50-kHz USV displayed less contact time in a social contact paradigm compared to control animals, as shown by Burgdorf et al. [58]. Moreover, young rats spent more time with adult rats emitting high levels than with animals emitting low levels of 50-kHz USV [59]. Evidence from devocalization studies demonstrating reduced play behavior in pairs of devocalized rats further support the notion that 50-kHz USV play an important role as socio-affective communicative signals [60]. Finally, playback studies, using 50-kHz USV to reliably elicit social approach behavior in rats, underline the important communicative function of 50-kHz USV and suggest that they serve as social contact calls to maintain and/or (re)establish social proximity (for review see [44]).

In dyads including a *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rat, one might therefore expect that the reduced number of pro-social 50-kHz USV, together with the change in peak amplitude, leads to prominent alterations in the social behavior repertoire and an overall reduction in social behaviors. In fact, our detailed temporal analyses showed that 50-kHz USV were primarily emitted during social behavior, irrespective of genotype. This underlines evidence obtained in previous temporal analyses in mice and rats [49,61–63], and supports the notion that ultrasonic communication plays a significant role in regulating rodent social behavior. For instance, a study by Burke et al. [64] yielded information that 50-kHz USV were important in coordinating play behavior of adult male rats, and, especially, specific 50-kHz USV were critical for preventing aggressive behavior. Moreover, Ferhat et al. [63] linked specific social behavior of female-female adult social interactions to ultrasonic communication in a genetic mouse model for ASD, providing evidence that genetically modified mice vocalize less when being engaged in physical contact compared to wildtype controls.

Contrary to this assumption, however, we measured similar levels of social behaviors in all three experimental dyads, contrasting the salient difference in pro-social 50-kHz USV emission. A more detailed evaluation of single social behaviors at dyadic level even revealed an enhanced duration of physical contact in adult female dyads including a *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rat, as compared to *Cacna1c*<sup>+/+</sup> control dyads.

At the individual level, in mixed WT&HET dyads, we detected only subtle genotype differences. Interestingly, *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls spent more time sniffing *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats than vice versa. Sniffing is one of the most frequent behaviors in the rich behavioral repertoire of rats [65,66] and olfactory cues are used by rats to obtain information on partner rats, such as health status [67]. While it is difficult to tell whether this alteration in sniffing behavior is linked to the prominent genotype difference in the emission of 50-kHz USV, it is obvious that the strong reduction in 50-kHz USV emission in *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats had

no or only minor effects on their social behavior. This is surprising in light of substantial evidence supporting the view that 50-kHz USV play a key role in regulating social behavior [57].

This said, it is in line with our previous results in juvenile male *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats, where we did not find any prominent genotype effects on social play behavior although the same pattern of reduced 50-kHz USV emission in dyads including *Cacna1c*<sup>+/-</sup> was clearly evident [49]. We suggested therefore that *Cacna1c* haploinsufficiency leads to a reduction in the incentive value of playful social interactions in juvenile male rats and that this is reflected in lower 50-kHz USV emission rates. In fact, 50-kHz USV, also called “rat laughter” [37], are assumed to express positive affective states because they occur in appetitive situations, such as social play [38,39], mating [40,41], or in response to drugs of abuse, especially amphetamine [42,43]. Additionally, social interaction is highly rewarding for rats as shown by conditioned place preference paradigms [68].

Together, this suggests that the strong reduction in 50-kHz USV emission shown by dyads including a *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rat has no or only minor effects on their social behavior and that this reduction is most likely the consequence of genotype-dependent alterations in affective state during direct reciprocal social interaction. The view that *Cacna1c* haploinsufficiency leads to reduced incentive value of social interactions is supported by our previous findings in juvenile male and female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats, where social play appears to be less rewarding [49,50]. We therefore propose that this pattern continues to adult age due to the 50% reduction of 50-kHz USV specifically detected in dyads including *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats compared to *Cacna1c*<sup>+/+</sup> control dyads. This finding highlights the importance of 50-kHz USV analysis as a sensitive tool to reveal genotype-dependent alterations in affective state during direct reciprocal social interaction in rats.

Rats live in groups and establish social hierarchies. The tube test is a commonly used paradigm to investigate social hierarchy in rodents. Studies confirmed that the genetic background of rats can influence social dominance [69–71]. Our results indicate that, in mixed genotype dyads, *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats showed dominance over *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls after social interaction. Interestingly, we found supporting results in juvenile female rats during rough-and-tumble play behavior with *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats displaying more pinning behavior than *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls [50]. Based on these findings, it appears that female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats are more socially dominant than their *Cacna1c*<sup>+/+</sup> littermates. However, similar to previous experiments focusing on female social interactions, aggressive behaviors were almost absent in our study [65,66]. In addition, we demonstrated that *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats changed their social behaviors based on the genotype of the partner rat whereas *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls retained the same behavioral patterns. As shown in an early experiment, rodents can sense the genotype of partners [72]. Interestingly, *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats displayed more social behaviors when interacting with a same-genotype partner, while they reduced their social behaviors when interacting with a different-genotype partner. This might reflect a preference in *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats for same-genotype partners.

Strikingly, however, most robust genotype differences were seen during non-social behavior. Dyads including a *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rat displayed a prominent increase in self-grooming compared to *Cacna1c*<sup>+/+</sup> control dyads, while the number of rearing and time spent digging was reduced. We also found large genotype effects on 50-kHz USV emission during non-social behaviors. Specifically, the number of 50-kHz USV was reduced in dyads including *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats during non-social behaviors, particularly self-grooming and rearing, compared to *Cacna1c*<sup>+/+</sup> control dyads, once again indicating reduced positive affect rather than communicative deficits in *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats compared to their littermate controls.

At the individual level, in mixed WT&HET dyads, comparable patterns became apparent with *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats showing reduced rearing and digging but, partially, increased self-grooming compared to *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls. Self-grooming is commonly used to investigate

stereotypies and repetitive patterns of behavior in rodents (for review see: [73]), and several mouse and rat models for ASD display increased self-grooming behavior (for review see [74,75]). In contrast to our current findings, we did not detect any differences in self-grooming and other non-social behaviors, like rearing, in juvenile male and female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and their littermate controls [49,50]. This might suggest that repetitive self-grooming emerges later in development in *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats, as seen in some rodent models for ASD. However, no stereotypies, such as self-grooming [24,76] and marble-burying [23], were detected in heterozygous *Cacna1c* mice.

Our current results of deficits in pro-social 50-kHz ultrasonic communication and mild alterations of social behaviors in adult female rats are partly in line with previous mouse studies. For instance, in the widely used three-chambered social approach assay [74], it has been shown that adult male forebrain *Cacna1c* null mutant mice did not prefer a conspecific mouse [25,28]. Impaired sociability has also been demonstrated after *Cacna1c* knockdown in the prefrontal cortex [28] but not in the nucleus accumbens [27]. On the contrary, no social deficits were found in *Cacna1c* heterozygous mice [23,25]. A Timothy syndrome (TS) mouse model, which is recapitulating a gain-of-function mutation in the Ca<sub>v</sub>1.2 channel, displayed only social deficits in a prolonged three-chambered assay [23], while this model did not show a lack of sociability during the typical 10 min testing [23,24]. Intriguingly, the TS mouse model displayed normal levels of direct reciprocal social interaction behavior although *Cacna1c* mutant animals spent more time in close proximity with each other compared with wildtype controls [24], consistent with our results of increased physical contact. It thus appears that social deficits were only evident in brain side-specific *Cacna1c* null mutant but not in heterozygous mice, whereas in rats even partial *Cacna1c* depletion was sufficient to exert behavioral alterations. However, it is important to mention that effects of genetic *Cacna1c* modifications on social behavior and communication have almost solely been assessed in adult male mice [23–28], contrasting the NIH efforts to increase the number of female animals in preclinical research when appropriate [30]. Of note, we made no attempt to generate constitutive *Cacna1c* null mutant rats because it was reported that constitutive *Cacna1c* null mutant mice are not viable [77].

As yet, very little is known about sex-dependent *Cacna1c* effects on social behavior in rodents, which is surprising as the variability of various traits, including measures for behavior, neurochemistry, or electrophysiology, does not appear to be higher in female than in male rats [78]. In an initial study, Dao et al. [13] highlighted sex-specific effects of *Cacna1c*, obtaining results that female, but not male, heterozygous mice exhibited increased anxiety and decreased risk-taking behavior in several paradigms. Regarding the genetic *Cacna1c* rat model, we provided evidence that *Cacna1c* regulates in particular socio-affective communication in adult female rats, matching the sex-dependent effects of *CACNA1C* genotypes seen in humans.

In humans, studies obtained evidence for sex-specific associations of *CACNA1C* SNPs and neuropsychiatric disorders with stronger effects towards females [13–16,79]. For instance, Heilbronner et al. [15] found that female carriers of the SNP rs10774035, a proxy SNP for rs1006737, showed impaired functional recovery from SCZ episodes, contrasting the beneficial effects of this SNP on functional outcomes detected in men. Moreover, *CACNA1C* seems to have sex-specific effects on psychological traits, as shown by Takeuchi et al. [16], who provided evidence that SNP rs1024582, which is tightly linked to SNP rs1006737, was associated with increased hostility, concomitant with reduced activity in frontolimbic regions during a working memory task in female but not male healthy subjects. Interestingly, female risk allele carriers also exhibited reduced intrapersonal emotional intelligence and increased harm avoidance, both highly relevant for appropriate social functioning. However, it should be noted that Strohmaier et al. [79] found mostly opposite effects, with male risk carriers of SNP rs1006737 showing higher emotional lability and lower resilience, contrasting female risk carriers who displayed stronger resilience.

## 5. Conclusion

In conclusion, our work shows for the first time that partial *Cacna1c* depletion in adult female rats results in reduced levels of pro-social 50-kHz USV emitted during the direct reciprocal social interaction assay. Interestingly, social behaviors were only mildly affected by genotype and 50-kHz USV emission was reduced while rats engaged in social and, most prominently, non-social behaviors. Together, this suggests reduced positive affect in female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats compared to their *Cacna1c*<sup>+/+</sup> littermate controls in a social context, although reduced positive affect is not specifically linked to social behavior. Additionally, we provide evidence for increased repetitive behaviors in female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats with relevance for ASD. Our study supports the role of *Cacna1c* in regulating socio-affective communication in adult female rats with relevance for neuropsychiatric disorders like MDD, ASD, BPD, and SCZ.

## Ethics approval and consent to participate

All procedures were conducted in accordance with the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and the relevant local or national rules and regulations of Germany and were subject to prior authorization by the local government (MR 20/35 Nr. 19/2014; Tierschutzbehörde, Regierungspräsidium Gießen, Germany).

## Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

## Funding

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to R.S. (DFG SCHW 559/14-1 and SCHW 559/14-2) and M.W. (DFG WO 1732/4-1 and WO 1732/4-2).

## Authors contributions

MW and TR conceived the study; TR and TK performed the experiments; TR analyzed the data; TR and MW wrote the manuscript; RS and MW acquired funding. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgments

The authors wish to thank Moria Braun, Ingmar Conell, Sophia Estel, Jens Hensen, Christine Hohmeyer, Gunnar Lemmer, Rebekka Obermeier, Marcella Rietschel, Özge Sungur, and Stephanie Witt for their help in this project.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.032>.

## References

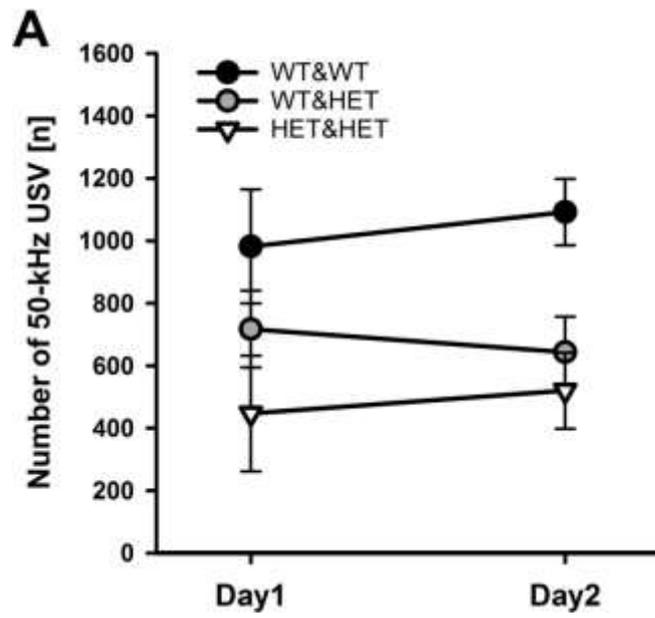
- [1] N.R. Eaton, K.M. Keyes, R.F. Krueger, S. Balsis, A.E. Skodol, K.E. Markon, B.F. Grant, D.S. Hasin, An invariant dimensional liability model of gender differences in mental disorder prevalence: evidence from a national sample, *J. Abnorm. Psychol.* 121 (2012) 282–288, <https://doi.org/10.1037/a0024780>.
- [2] Z. Steel, C. Marnane, C. Iranpour, T. Chey, J.W. Jackson, V. Patel, D. Silove, The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980–2013, *Int. J. Epidemiol.* 43 (2014) 476–493, <https://doi.org/10.1093/ije/dyu038>.
- [3] A.K. Halladay, S. Bishop, J.N. Coenstantino, A.M. Daniels, K. Koenig, K. Palmer, D. Messinger, K. Pelphrey, S.J. Sanders, A.T. Singer, J.L. Taylor, P. Szatmari, Sex and gender differences in autism spectrum disorder: summarizing evidence gaps and identifying emerging areas of priority, *Mol. Autism* 6 (2015) 36, <https://doi.org/10.1186/s13229-015-0019-y>.
- [4] K.M. Abel, R. Drake, J. Goldstein, Sex differences in schizophrenia, *Int. J. Soc. Psychiatry* 22 (2010) 417–428, <https://doi.org/10.3109/09540261.2010.515205>.
- [5] D.P. Kennedy, R. Adolphs, The social brain in psychiatric and neurological disorders, *Trends Cogn. Sci.* 16 (2012) 559–572, <https://doi.org/10.1016/j.tics.2012.09.006>.
- [6] A. Meyer-Lindenberg, H. Tost, Neural mechanisms of social risk for psychiatric disorders, *Nat. Neurosci.* 15 (2012) 663–668, <https://doi.org/10.1038/nn.3083>.
- [7] Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis, *Lancet* 381 (2013) 1371–1379, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62129-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62129-1).
- [8] M.J. Gandal, J.R. Haney, N.N. Parikhshak, V. Leppa, G. Ramaswami, C. Hartl, A.J. Schork, V. Appadurai, A. Buil, T.M. Werge, C. Liu, K.P. White, S. Horvath, D.H. Geschwind, Shared molecular neuropathology across major psychiatric disorders parallels polygenic overlap, *Science* 359 (2018) 693–697, <https://doi.org/10.1126/science.1260469>.
- [9] M.A.R. Ferreira, M.C. O'Donovan, Y. Meng, I.R. Jones, D.M. Ruderfer, L. Jones, J. Fan, G. Kirov, R.H. Perlis, E.K. Green, J.W. Smoller, D. Grozeva, J. Stone, I. Nikolov, K. Chambert, M.L. Hamsberg, V.L. Nimgaonkar, V. Moskvina, A.E. Thase, S. Caesar, G.S. Sachs, J. Franklin, K. Gordon-Smith, K.G. Ardlie, S.B. Gabriel, C. Fraser, B. Blumenstiel, M. Defelice, G. Breen, M. Gill, D.W. Morris, A. Elkin, W.J. Muir, K.A. McGhee, R. Williamson, D.J. MacIntyre, A.W. MacLean, D. St Clair, M. Robinson, M. Van Beck, A.C.P. Pereira, R. Kandiaswamy, A. McQuillin, D.A. Collier, N.J. Bass, A.H. Young, J. Lawrence, I. Nicol Ferrier, A. Anjorin, A. Farmer, D. Curtis, E.M. Scolnick, P. McGuffin, M.J. Daly, A.P. Corvin, P.A. Holmans, D.H. Blackwood, H.M. Gurling, M.J. Owens, S.M. Purcell, P. Sklar, N. Craddock, Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder, *Nat. Genet.* 40 (2008) 1056–1058, <https://doi.org/10.1038/ng.209>.
- [10] I. Splawski, K.W. Timothy, L.M. Sharpe, N. Decher, P. Kumar, R. Bloise, C. Napolitano, P.J. Schwartz, R.M. Joseph, K. Condouris, H. Tager-Flusberg, S.G. Priori, M.C. Sanguinetti, M.T. Keating, Ca<sub>v</sub>1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder (including arrhythmia and autism), *Cell* 119 (2004) 19–31, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.011>.
- [11] M. Nyegaard, D. Demontis, L. Foldager, A. Hedemand, T.J. Flint, K.M. Sørensen, P.S. Andersen, M. Nordentoft, T. Werge, C.B. Pedersen, D.M. Hougaard, P.B. Mortensen, O. Mors, A.D. Bargham, CACNA1C (rs1006737) is associated with schizophrenia, *Mol. Psychiatry* 15 (2010) 1119–1121, <https://doi.org/10.1038/mp.2009.69>.
- [12] E.K. Green, D. Grozeva, I. Jones, L. Jones, G. Kirov, S. Caesar, K. Gordon-Smith, C. Fraser, L. Forty, E. Russell, M.L. Hamsberg, V. Moskvina, I. Nikolov, A. Farmer, P. McGuffin, P.A. Holmans, M.J. Owen, M.C. O'Donovan, N. Craddock, The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia, *Mol. Psychiatry* 15 (2010) 1016–1022, <https://doi.org/10.1038/mp.2009.49>.
- [13] D.T. Dao, P.B. Mahon, X. Cai, C.E. Kovacsics, R.A. Blackwell, M. Arad, J. Shi, P.P. Zandi, P. O'Donnell, J.A. Knowles, M.M. Weisman, W. Coryell, W.A. Scheftner, W.B. Lawson, D.F. Levinson, S.M. Thompson, J.B. Potash, T.D. Gould, Mood disorder susceptibility gene CACNA1C modifies mood-related behaviors in mice and interacts with sex to influence behavior in mice and diagnosis in humans, *Biol. Psychiatry* 68 (2010) 801–810, <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.019>.
- [14] S.H. Witt, N. Kleindienst, J. Frank, J. Treutlein, T. Mühleisen, F. Degenhardt, M. Jungkuntz, B. Krumm, S. Gichon, A. Tadic, N. Dahmen, C.E. Schwarze, B. Schott, L. Dietl, M.M. Nöthen, A. Molascher, K. Lieb, S. Roepke, D. Rajescu, M. Rietschel, C. Schmahl, M. Bohus, Analysis of genome-wide significant bipolar disorder genes in borderline personality disorder, *Psychiatr. Genet.* 24 (2014) 262–265, <https://doi.org/10.1097/YPG.0b0000000000000060>.
- [15] U. Heilbroener, D. Malzahn, J. Strohmaier, S. Maier, J. Frank, J. Treutlein, T.W. Mühleisen, A.J. Forstner, S.H. Witt, S. Gichon, P. Falkai, M.M. Nöthen, M. Rietschel, T.G. Schulze, A common risk variant in CACNA1C supports a sex-dependent effect on longitudinal functioning and functional recovery from episodes of schizophrenia-spectrum but not bipolar disorder, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25 (2015) 2262–2270, <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.09.012>.
- [16] H. Takeuchi, H. Tomita, Y. Taki, Y. Kikuchi, C. Ono, Z. Yu, R. Nouchi, R. Yokoyama, Y. Kotozaki, S. Nakagawa, A. Sekiguchi, K. Iizuka, S. Hanawa, T. Araki, C.M. Miyachi, K. Sakaki, T. Nozawa, S. Ikeda, S. Yokota, D. Magistro, Y. Sassa, R. Kawashima, A common CACNA1C gene risk variant has sex-dependent effects on behavioral traits and brain functional activity, *Cereb. Cortex* (2018) 1–9, <https://doi.org/10.1093/cercor/bby189>.
- [17] S. Heyes, W.S. Pratt, E. Rees, S. Dahimene, L. Ferron, M.J. Owen, A.C. Dolphin, Genetic disruption of voltage-gated calcium channels in psychiatric and neurological disorders, *Prog. Neurobiol.* 134 (2015) 36–54, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.002>.
- [18] Z.D. Kabir, A. Martínez-Rivera, A.M. Rajadhyaksha, From gene to behavior: L-type calcium channel mechanisms underlying neuropsychiatric symptoms, *Neurotherapeutics* 14 (2017) 588–613, <https://doi.org/10.1007/s13311-017-0532-0>.
- [19] Z.D. Kabir, A.S. Lee, A.M. Rajadhyaksha, L-type Ca<sup>2+</sup> channels in mood, cognition and addiction: integrating human and rodent studies with a focus on behavioural endophenotypes, *J. Physiol.* 594 (2016) 5823–5837, <https://doi.org/10.1111/jphys.270673>.
- [20] E. Pasparakis, E. Koiliari, C. Zourarakis, E.-M. Tzapakis, P. Roussos, S.G. Giakoumaki, P. Bitsios, The effects of the CACNA1C rs1006737 A/G on affective startle modulation in healthy males, *Eur. Psychiatry* 30 (2015) 492–498, <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2015.03.004>.

- [21] A. Krug, V. Nieratschker, V. Markov, S. Krach, A. Jansen, K. Zerres, T. Eggemann, T. Stöcker, N.J. Shah, J. Treutlein, T.W. Mühleisen, T. Kircher, Effect of CACNA1C rs1006737 on neural correlates of verbal fluency in healthy individuals, *Neuroimage* 49 (2010) 1831–1836, <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.09.028>.
- [22] J.T. Krauthelm, B. Straube, U. Dannowski, M. Pyka, H. Schneider-Hassloff, R. Drexler, A. Krug, J. Sommer, M. Rietschel, S.H. Witt, T. Kircher, Outgroup emotion processing in the vACC is modulated by childhood trauma and CACNA1C risk variant, *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 13 (2018) 341–348, <https://doi.org/10.1093/scn/nyy004>.
- [23] P.L. Bader, M. Faizi, L.H. Kim, S.F. Owen, M.R. Tadross, R.W. Alfa, G.C.L. Bett, R.W. Tsien, R.L. Rasmussen, M. Shamloo, Mouse model of Timothy syndrome recapitulates triad of autistic traits, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108 (2011) 15432–15437, <https://doi.org/10.1073/pnas.1112667108>.
- [24] P.A. Kabitzke, D. Brunner, D. He, P.A. Fazio, K. Cox, J. Sutphen, L. Thiede, E. Sabath, T. Haanania, V. Alexandrov, R. Rasmussen, W. Spooner, A. Ghosh, P. Feliciano, B. Biemans, M. Benedetti, A.L. Clayton, Comprehensive analysis of two Shank3 and the Cacna1c mouse models of autism spectrum disorder, *Genes Brain Behav.* 17 (2018) 4–22, <https://doi.org/10.1111/gbb.12405>.
- [25] N. Dedic, M.L. Pöhlmann, J.S. Richter, D. Mehta, D. Czamara, M.W. Metzger, J. Dine, B.T. Bedenk, J. Hartmann, K.V. Wagner, A. Jurik, L.M. Almlj, A. Lori, S. Moosmang, F. Hofmann, C.T. Wojtak, G. Rammes, M. Eder, A. Chen, K.J. Ressler, W. Wurst, M.V. Schmidt, E.B. Binder, J.M. Deussing, Cross-disorder risk gene CACNA1C differentially modulates susceptibility to psychiatric disorders during development and adulthood, *Mol. Psychiatry* 23 (2018) 533–543, <https://doi.org/10.1038/mp.2017.133>.
- [26] D. Jeon, S. Kim, M. Chetana, D. Jo, H.E. Ruley, S.-Y. Lin, D. Rabah, J.-P. Kinet, H.-S. Shin, Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels in ACC, *Nat. Neurosci.* 13 (2010) 482–488, <https://doi.org/10.1038/nn.2504>.
- [27] C.E. Terrillon, T.C. Francis, A.C. Pache, M.K. Lobo, T.D. Gould, Decreased nucleus accumbens expression of psychiatric disorder risk gene Cacna1c promotes susceptibility to social stress, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 20 (2017) 428–433, <https://doi.org/10.1093/ijnp/nyw112>.
- [28] Z.D. Kabir, A. Che, D.K. Fischer, R.C. Rice, B.K. Rizzo, M. Byrne, M.J. Glass, N. V. De Marco Garcia, A.M. Rajadhyaksha, Rescue of impaired sociability and anxiety-like behavior in adult cacna1c-deficient mice by pharmacologically targeting eIF2 $\alpha$ , *Mol. Psychiatry* 22 (2017) 1096–1109, <https://doi.org/10.1038/mp.2017.124>.
- [29] A.L. Moon, N. Haan, L.S. Wilkinson, K.L. Thomas, J. Hall, CACNA1C Association With Psychiatric Disorders, Behavior, and Neurogenesis, *Schizophr. Bull.* 44 (2018) 958–965, <https://doi.org/10.1093/schbul/sby096>.
- [30] L.D. McCullough, G.J. de Vries, V.M. Miller, J.B. Becker, K. Sandberg, M.M. McCarthy, NIH initiative to balance sex of animals in preclinical studies: generative questions to guide policy, implementation, and metrics, *Biol. Sex Differ.* 5 (2014) 15, <https://doi.org/10.1186/s13293-014-0015-5>.
- [31] B. Ellenbroek, J. Youn, Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Dis. Model. Mech.* 9 (2016) 1079–1087, <https://doi.org/10.1242/dmm.026120>.
- [32] M. Wöhr, R.K.W. Schwarting, Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation, *Cell Tissue Res.* 354 (2013) 81–97, <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1607-9>.
- [33] R.A. Kroes, J. Burgdorf, N.J. Otto, J. Panksepp, J.R. Moskal, Social defeat, a paradigm of depression in rats that elicits 22-kHz vocalizations, preferentially activates the cholinergic signaling pathway in the periaqueductal gray, *Behav. Brain Res.* 182 (2007) 290–300, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.03.022>.
- [34] R.J. Blanchard, D.C. Blanchard, R. Aguilana, S.M. Weiss, Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems, *Physiol. Behav.* 50 (1991) 967–972, [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90423-1](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90423-1).
- [35] M. Wöhr, R.K.W. Schwarting, Ultrasonic calling during fear conditioning in the rat: no evidence for an audience effect, *Anim. Behav.* 76 (2008) 749–760, <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.04.017>.
- [36] S.M. Brudzynski, Ehotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats, *Curr. Opin. Neurobiol.* 23 (2013) 310–317, <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.014>.
- [37] J. Panksepp, Affective consciousness: core emotional feelings in animals and humans, *Conscious. Cogn.* 14 (2005) 30–80, <https://doi.org/10.1016/j.concog.2004.10.004>.
- [38] M. Lukas, M. Wöhr, Endogenous vasopressin, innate anxiety, and the emission of pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations during social play behavior in juvenile rats, *Psychoneuroendocrinology* 56 (2015) 35–44, <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.03.005>.
- [39] B. Knutson, J. Burgdorf, J. Panksepp, Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats, *J. Comp. Psychol.* 112 (1998) 65–73, <https://doi.org/10.1037/0735-7036.112.1.65>.
- [40] D.A. Thomas, R.J. Barfield, Ultrasonic vocalization of the female rat (*Rattus norvegicus*) during mating, *Anim. Behav.* 33 (1985) 720–725, [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(85\)90002-6](https://doi.org/10.1016/0003-3472(85)90002-6).
- [41] N.R. White, R. Cagliano, A.U. Moises, R.J. Barfield, Changes in mating vocalizations over the ejaculatory series in rats (*Rattus norvegicus*), *J. Comp. Psychol.* 104 (1990) 255–262, <https://doi.org/10.1037/0735-7036.104.3.255>.
- [42] K.-A. Engelhardt, E. Fuchs, R.K.W. Schwarting, M. Wöhr, Effects of amphetamine on pro-social ultrasonic communication in juvenile rats: implications for mania models, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 27 (2017) 261–273, <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2017.01.003>.
- [43] J. Burgdorf, B. Knutson, J. Panksepp, S. Ikemoto, Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats, *Behav. Neurosci.* 115 (2001) 940–944, <https://doi.org/10.1037/0735-7044.115.4.940>.
- [44] D. Seffer, R.K.W. Schwarting, M. Wöhr, Pro-social ultrasonic communication in rats: insights from playback studies, *J. Neurosci. Methods* 234 (2014) 73–81, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.01.023>.
- [45] M. Wöhr, R.K.W. Schwarting, Ultrasonic communication in rats: can playback of 50-kHz calls induce approach behavior? *PLoS One* 2 (2007) e1365, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001365>.
- [46] L. Sykes, J. Haddon, T.M. Lancaster, A. Sykes, K. Azzouni, N. Ihssen, A.L. Moon, T.-C.E. Lin, D.E. Linden, M.J. Owen, M.C. O'Donovan, T. Humby, L.S. Wilkinson, K.L. Thomas, J. Hall, Genetic variation in the psychiatric risk gene CACNA1C modulates reversal learning across species, *Schizophr. Bull.* 1–9 (2018), <https://doi.org/10.1093/schbul/sby146>.
- [47] M.D. Braun, T.M. Kisko, D.D. Vecchia, R. Andreatini, R.K.W. Schwarting, M. Wöhr, Sex-specific effects of Cacna1c haploinsufficiency on object recognition, spatial memory, and reversal learning capabilities in rats, *Neurobiol. Learn. Mem.* 155 (2018) 543–555, <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.05.012>.
- [48] S. Michels, G.K. Ganjam, H. Martins, G.M. Schrott, M. Wöhr, R.K.W. Schwarting, C. Cuijse, Downregulation of the psychiatric susceptibility gene Cacna1c promotes mitochondrial resilience to oxidative stress in neuronal cells, *Cell Death Discov.* 4 (54) (2018), <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0061-6>.
- [49] T.M. Kisko, M.D. Braun, S. Michels, S.H. Witt, M. Rietschel, C. Cuijse, R.K.W. Schwarting, M. Wöhr, Cacna1c haploinsufficiency leads to pro-social 50-kHz ultrasonic communication deficits in rats, *Dis. Model. Mech.* 11 (2018), <https://doi.org/10.1242/dmm.034116>.
- [50] T.M. Kisko, M.D. Braun, S. Michels, S.H. Witt, M. Rietschel, C. Cuijse, R.K.W. Schwarting, M. Wöhr, Sex-dependent effects of Cacna1c haploinsufficiency on juvenile social play behavior and pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats, *Genes Brain Behav.* (2018) e12552, <https://doi.org/10.1111/gbb.12552>.
- [51] A.M. Geurts, G.J. Cost, Y. Freyvert, B. Zeitler, J.C. Miller, V.M. Choi, S.S. Jenkins, A. Wood, X. Cui, X. Meng, A. Vincent, S. Lam, M. Michalkiewicz, R. Schilling, J. Fockler, S. Kalloway, H. Weiler, S. Ménoret, I. Anegón, G.D. Davis, L. Zhang, E.J. Rebar, P.D. Gregory, F.D. Urmov, H.J. Jacob, R. Buelow, Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases, *Science* 325 (2009), <https://doi.org/10.1126/science.1172447> 433–433.
- [52] M. Wöhr, H. Ripplberger, R.K.W. Schwarting, M.M. van Gaalen, Critical involvement of 5-HT2C receptor function in amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats, *Psychopharmacology (Berl.)* 232 (2015) 1817–1829, <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3814-9>.
- [53] M. Pereira, R. Andreatini, R.K.W. Schwarting, J.C. Bienes, Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania? *Psychopharmacology (Berl.)* 231 (2014) 2567–2577, <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3413-1>.
- [54] J. Cohen, *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2. ed., Lawrence Erlbaum, Hillsdale, NJ, 1988.
- [55] J. Burgdorf, R.A. Kroes, J.R. Moskal, J.G. Pfaus, S.M. Brudzynski, J. Panksepp, Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback, *J. Comp. Psychol.* 122 (2008) 357–367, <https://doi.org/10.1037/a0012889>.
- [56] J.M. Wright, J.C. Gourdon, P.B.S. Clarke, Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context, *Psychopharmacology (Berl.)* 211 (2010) 1–13, <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1859-y>.
- [57] M. Wöhr, Ultrasonic communication in rats: appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations as social contact calls, *Behav. Ecol. Sociobiol. (Print)* 72 (14) (2018), <https://doi.org/10.1007/s00265-017-2427-9>.
- [58] J. Burgdorf, J. Panksepp, S.M. Brudzynski, M.C. Beinfeld, H.C. Cromwell, R.A. Kroes, J.R. Moskal, The effects of selective breeding for differential rates of 50-kHz ultrasonic vocalizations on emotional behavior in rats, *Dev. Psychobiol.* 51 (2009) 34–46, <https://doi.org/10.1002/dev.20343>.
- [59] J. Panksepp, N. Gordon, J. Burgdorf, Empathy and the action-perception resonances of basic socio-emotional systems of the brain, *Behav. Brain Sci.* 25 (2001) 43–44, <https://doi.org/10.1017/S0146525X0247001X>.
- [60] T.M. Kisko, B.T. Himmler, S.M. Himmler, D.R. Euston, S.M. Pellis, Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? II. Evidence from the effects of deactivation, *Behav. Processes* 111 (2015) 25–33, <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.11.011>.
- [61] C.J. Burke, T.M. Kisko, D.R. Euston, S.M. Pellis, Do juvenile rats use specific ultrasonic calls to coordinate their social play? *Anim. Behav.* 140 (2018) 81–92, <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2018.03.019>.
- [62] A.O. Sungur, L. Stemmler, M. Wöhr, M.R. Rust, Impaired object recognition but normal social behavior and ultrasonic communication in Cofilin1 mutant mice, *Front. Behav. Neurosci.* 12 (2018) 1–11, <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00025>.
- [63] A.-T. Ferhat, N. Torquet, A.-M. Le Sourd, F. de Chaumont, J.-C. Olivo-Marin, P. Faure, T. Bourgeron, E. Ey, Recording mouse ultrasonic vocalizations to evaluate social communication, *J. Vis. Exp.* (2016) 1–12, <https://doi.org/10.3791/53971>.
- [64] C.J. Burke, T.M. Kisko, S.M. Pellis, D.R. Euston, Avoiding escalation from play to aggression in adult male rats: the role of ultrasonic calls, *Behav. Processes* 144 (2017) 72–81, <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2017.09.014>.
- [65] F. Ferdman, R.P. Murmu, J. Bock, K. Braun, M. Leschem, Weaning age, social isolation, and gender, interact to determine adult explorative and social behavior, and dendritic and spine morphology in prefrontal cortex of rats, *Behav. Brain Res.* 180 (2007) 174–182, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.03.011>.
- [66] S. Seigūda, J.C. Neill, Efficacy of antipsychotics to reverse phencyclidine-induced social interaction deficits in female rats—a preliminary investigation, *Behav. Brain*

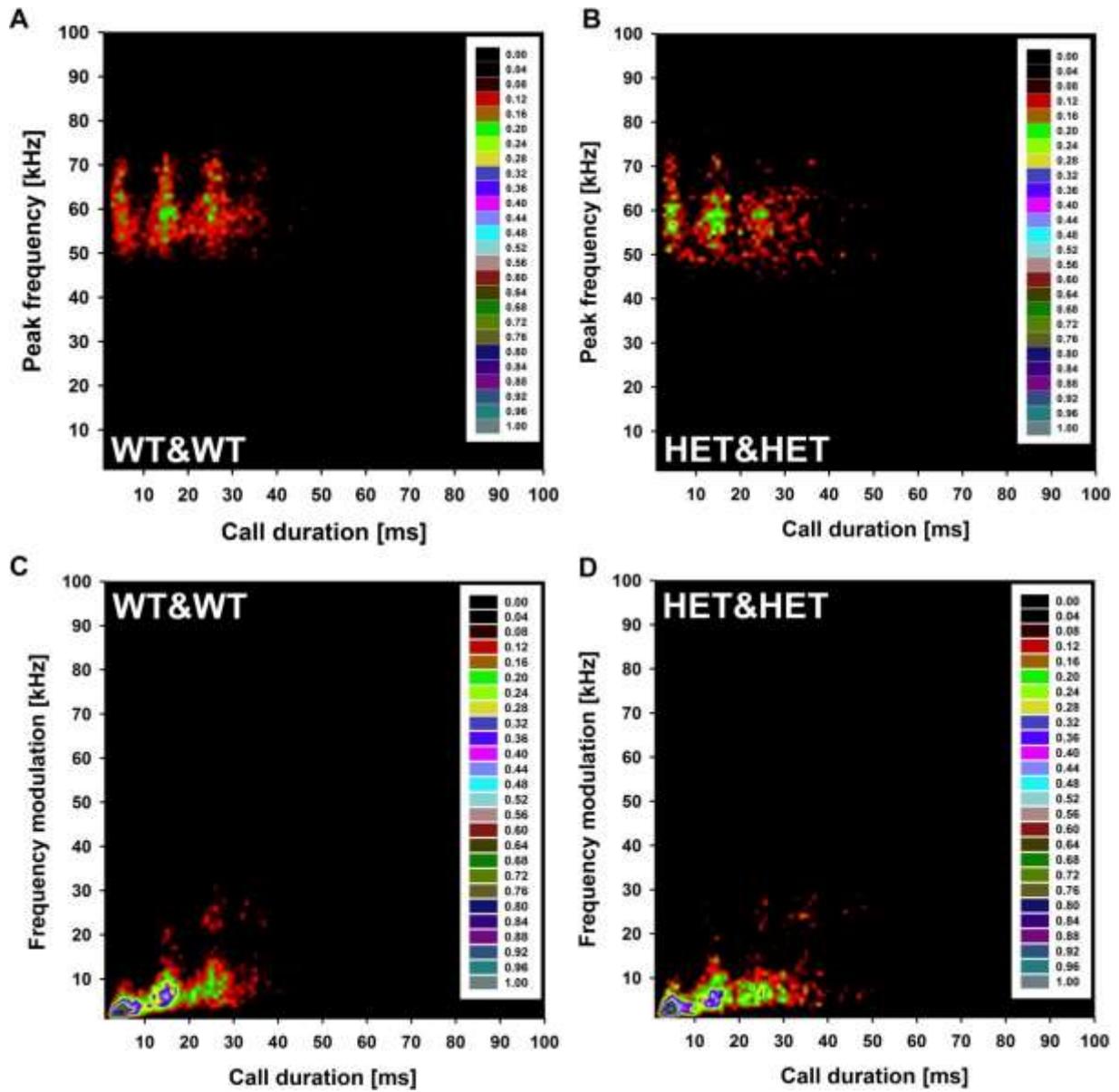
- Res. 187 (2008) 499–494, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.012>.
- [67] H. Arakawa, K. Arakawa, T. Deak, Sickness-related odor communication signals as determinants of social behavior in rat: a role for inflammatory processes, *Horm. Behav.* 57 (2010) 330–341, <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.01.002>.
- [68] G. Zernig, B.S. Pinheiro, Dyadic social interaction inhibits cocaine-conditioned place preference and the associated activation of the accumbens corridor, *Behav. Pharmacol.* 26 (2015) 580–594, <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000167>.
- [69] F. Wang, J. Zhu, H. Zhu, Q. Zhang, Z. Lin, H. Hu, Bidirectional control of social hierarchy by synaptic efficacy in medial prefrontal cortex, *Science* 334 (2011) 693–697, <https://doi.org/10.1126/science.1209951>.
- [70] K. Saxena, J. Webster, A. Hallas-Potts, R. Mackenzie, P.A. Spooner, D. Thomson, P. Kind, S. Chatterji, R.G.M. Morris, Experiential contributions to social dominance in a rat model of fragile-X syndrome, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285 (2018), <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0294> 20180294.
- [71] A.S. Garfield, M. Cowley, F.M. Smith, K. Moorwood, J.E. Stewart-Cox, K. Gilroy, S. Baker, J. Xia, J.W. Dulley, L.D. Harst, L.S. Wilkinson, A.R. Isles, A. Ward, Distinct physiological and behavioural functions for parental alleles of imprinted *Grb10*, *Nature* 469 (2011) 534–538, <https://doi.org/10.1038/nature09651>.
- [72] S. Lemington, Social preferences for partners carrying 'good genes' in wild house mice, *Anim. Behav.* 31 (1983) 325–333, [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(83\)80050-5](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(83)80050-5).
- [73] M. Wöhr, M.L. Scattoni, Behavioural methods used in rodent models of autism spectrum disorders: current standards and new developments, *Behav. Brain Res.* 251 (2013) 5–17, <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.047>.
- [74] J.I. Silverman, M. Yang, C. Lord, J.N. Crawley, Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism, *Nat. Rev. Neurosci.* 11 (2010) 490–502, <https://doi.org/10.1038/nrn2851>.
- [75] A.V. Kalueff, A.M. Stewart, C. Song, K.C. Berridge, A.M. Graybiel, J.C. Fentress, Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience, *Nat. Rev. Neurosci.* 17 (2016) 45–59, <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.8>.
- [76] A.S. Lee, S. Ra, A.M. Rajadhyaksha, J.K. Britt, H. De Jesus-Cortes, K.L. Gonzales, A. Lee, S. Moosmang, F. Hofmann, A.A. Pieper, A.M. Rajadhyaksha, Forebrain elimination of *cacna1c* mediates anxiety-like behavior in mice, *Mol. Psychiatry* 17 (2012) 1054–1055, <https://doi.org/10.1038/mp.2012.71>.
- [77] C. Seisenberger, V. Specht, A. Welling, J. Platzer, A. Pfeifer, S. Kühbandner, J. Striessnig, N. Klugbauer, R. Feil, F. Hofmann, Functional embryonic cardiomyocytes after disruption of the L-type  $\alpha_1C$  (*Cav1.2*) calcium channel gene in the mouse, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 39193–39199, <https://doi.org/10.1074/jbc.M006467200>.
- [78] J.B. Becker, B.J. Prendergast, J.W. Liang, Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies, *Biol. Sex Differ.* 7 (2016) 34, <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0087-5>.
- [79] J. Strohmaier, M. Amelang, L.A. Hothorn, S.H. Witt, V. Nieratschker, D. Gerhard, S. Meier, S. Wüst, J. Frank, A. Loerbroks, M. Rietschel, T. Stürmer, T.G. Schulze, The psychiatric vulnerability gene *CACNA1C* and its sex-specific relationship with personality traits, resilience factors and depressive symptoms in the general population, *Mol. Psychiatry* 18 (2013) 607–613, <https://doi.org/10.1038/mp.2012.53>.

## Ergänzendes Material

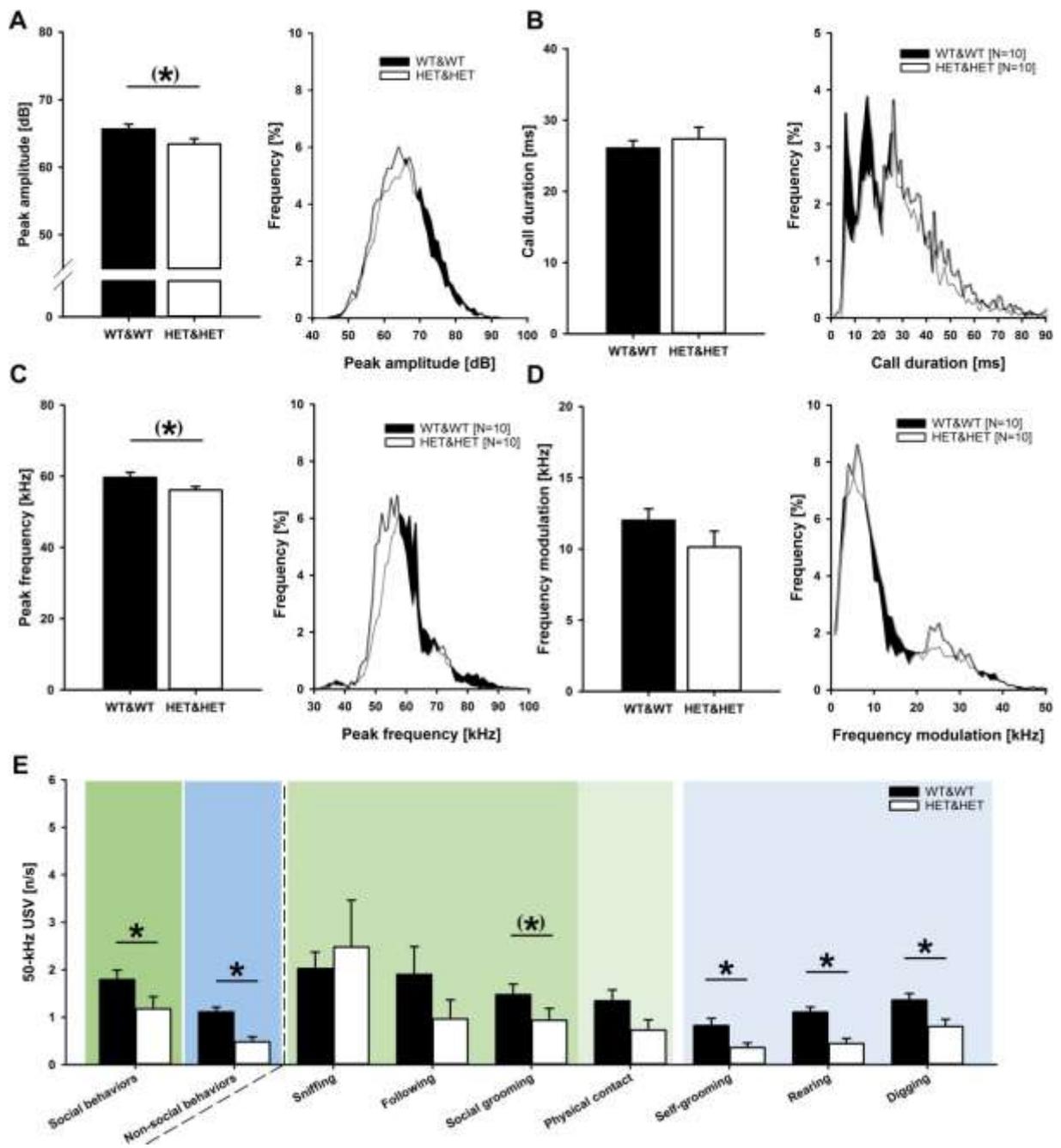
## Supplementary Figure S1



Supplementary Figure S2



Supplementary Figure S3



**Supplementary Table 1:** Non-parametric tests (Kruskal-Wallis test) of outcomes.

Behavior	Statistics	Post-hoc tests
<b>A</b> Total number of 50- kHz USV	$H_2=12.693$ , $p=0.002$	WT&WT vs. WT&HET: $p=0.032$ ; WT&WT vs. HET&HET: $p<0.001$ ; WT&HET vs. HET&HET: $p=0.100$
Peak amplitude [dB]	$H_2=10.365$ , $p=0.006$	WT&WT vs. WT&HET: $p=0.009$ ; WT&WT vs. HET&HET: $p=0.009$ ; WT&HET vs. HET&HET: $p=0.983$
Call duration [ms]	$H_2=1.968$ , $p=0.374$	-
Peak frequency [kHz]	$H_2=1.095$ , $p=0.578$	-
Frequency modulation [kHz]	$H_2=1.306$ , $p=0.520$	-
<b>B</b> Social behaviors	$H_2=3.378$ , $p=0.185$	-
Active social behaviors	$H_2=4.431$ , $p=0.109$	-
Aggressive behaviors	$H_2=1.392$ , $p=0.499$	-
Non-social behaviors	$H_2=5.461$ , $p=0.065$	-
<b>C</b> Sniffing	$H_2=2.731$ , $p=0.255$	-
Following	$H_2=8.884$ , $p=0.012$	WT&WT vs. WT&HET: $p=0.184$ ; WT&WT vs. HET&HET: $p=0.024$ ; WT&HET vs. HET&HET: $p=0.042$
Social grooming	$H_2=2.974$ , $p=0.226$	-
Crawling over/under	$H_2=0.177$ , $p=0.915$	-
Physical contact	$H_2=7.338$ , $p=0.025$	WT&WT vs. WT&HET: $p=0.136$ ; WT&WT vs. HET&HET: $p=0.092$ ; WT&HET vs. HET&HET: $p=0.039$
<b>D</b> Self-grooming	$H_2=11.116$ , $p=0.004$	WT&WT vs. WT&HET: $p=0.188$ ; WT&WT vs. HET&HET: $p=0.003$ ; WT&HET vs. HET&HET: $p=0.028$
Rearing	$H_2=18.07$ , $p<0.001$	WT&WT vs. WT&HET: $p=0.033$ ; WT&WT vs. HET&HET: $p<0.001$ ; WT&HET vs. HET&HET: $p=0.006$
Digging	$H_2=11.495$ , $p=0.003$	WT&WT vs. WT&HET: $p=0.006$ ; WT&WT vs. HET&HET: $p<0.001$ ; WT&HET vs. HET&HET: $p=0.730$

Post-hoc tests were performed by using Mann-Whitney-U-Tests with Bonferroni-Holm corrections to control for multiple testing.

**SUPPLEMENTARY LEGENDS**

**Supplementary Figure S1:** (A) Number of 50-kHz USV emitted on the first and second test day in WT&WT (black circle; N=10), WT&HET (grey circle; N=20), HET&HET (white triangle; N=10) dyads. Data are represented as mean±SEM.

**Supplementary Figure S2: 50-kHz USV clusters.** Density plots depicting the distribution of individual 50-kHz USV on day 1 of direct reciprocal social interaction based on peak frequency (in kilohertz [kHz]) and call durations (in milliseconds [ms]), respectively frequency modulation (in kilohertz [kHz]) and call durations (in milliseconds [ms]), for (A,C) female WT&WT (N=10) and (B,D) HET&HET (N=10) dyads. Color coding reflects frequencies as percentages. Density plots were created by including ~9000 50-kHz USV emitted by WT&WT controls dyads and ~4000 50-kHz USV emitted by female HET&HET dyads.

**Supplementary Figure S3: Detailed temporal and acoustic parameter analysis of 50-kHz USV emitted by WT&WT and HET&HET dyads on test day 2.** (A) Peak amplitude and histogram of peak amplitude (in decibel [dB]), (B) call duration and histogram of call duration (in milliseconds [ms]), (C) peak frequency and histogram of peak frequency (in kilohertz [kHz]), and (D) frequency modulation and histogram of frequency modulation (in kilohertz [kHz]) of 50 kHz USV emitted by female WT&WT (black; N=10) and HET&HET (white; N=10) dyads during direct reciprocal social interaction. (E) 50-kHz USV emission during social behaviors, non-social behaviors and single behaviors (sniffing, following, social grooming, physical contact, self-grooming, rearing, and digging) with 50-kHz USV being presented for WT&WT (black bar; N=10) and HET&HET (white bar; N=10) dyads. Data are represented as mean±SEM; \* p<0.050 vs. WT&WT dyads; (\*) p<0.100 vs. WT&WT dyads.

## Studie II

**Titel:** *Cacna1c* haploinsufficiency lacks effects on adult hippocampal neurogenesis and volumetric properties of prefrontal cortex and hippocampus in female rats

**Autoren:** Redecker, Tobias M., Kisko, Theresa M., Schwarting, Rainer K.W., Wöhr, Markus

**Status:** eingereicht im Januar 2020

**Einreichung:** Neuroscience Letters

**Impact Factor (2018):** 2.173

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31

***Cacna1c* haploinsufficiency lacks effects on adult hippocampal neurogenesis and volumetric properties of prefrontal cortex and hippocampus in female rats**

*Original Research Article*

Tobias M. Redecker<sup>1</sup>, Theresa M. Kisko<sup>1</sup>, Markus Wöhr<sup>1,2</sup>, Rainer K.W. Schwarting<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Behavioral Neuroscience, Experimental and Biological Psychology, Department of Psychology, Philipps-Universität Marburg, Gutenbergstr. 18,

<sup>2</sup>Center for Mind, Brain, and Behavior (CMBB), Hans-Meerwein-Str. 6, D-35032 Marburg, Germany

Correspondence should be addressed to:

Rainer K.W. Schwarting, PhD

Behavioral Neuroscience  
Experimental and Biological Psychology  
Philipps-Universität Marburg  
Gutenbergstr. 18, 35032 Marburg, Germany  
Fax: +49 6421 28 23610, Tel: +49 6421 28 23639  
e-mail: schwarti@staff.uni-marburg.de

32 **ABSTRACT**

33 The cross-disorder risk gene *CACNA1C* is strongly involved in the etiology of all major  
34 neuropsychiatric disorders, with women often being more affected by *CACNA1C*  
35 mutations than men. Human neuroimaging studies provided evidence that *CACNA1C*  
36 variants are associated with anatomical and functional brain alterations, such as  
37 decreased prefrontal volumes, microstructural changes in the hippocampus, and  
38 reduced hippocampal activity during memory tasks. In mouse models, *Cacna1c*  
39 alterations were repeatedly linked to disorder-like behavioral phenotypes and reduced  
40 adult hippocampal neurogenesis, which has been implicated in the pathology of  
41 neuropsychiatric disorders. Here, we applied a recently developed rat model and  
42 conducted two studies to investigate the effects of partial *Cacna1c* depletion on adult  
43 hippocampal neurogenesis and volumetric properties of the hippocampus and the  
44 prefrontal cortex in adult female constitutive heterozygous (*Cacna1c*<sup>+/-</sup>) rats and  
45 wildtype (*Cacna1c*<sup>+/+</sup>) littermate controls. In study 1, we analyzed proliferation versus  
46 survival of adult-born hippocampal cells based on a 5-bromodeoxyuridine assay  
47 ensuring neuronal cell-type specificity through applying an immunofluorescent multiple  
48 staining approach. In study 2, we performed a detailed volumetric analysis with high  
49 structural resolution of the dorsal hippocampus and the medial prefrontal cortex,  
50 including their major substructures. Our results indicate comparable levels of cell  
51 proliferation and neuronal survival in *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls.  
52 Additionally, we found similar volumes of the dorsal hippocampus and the medial  
53 prefrontal cortex across major substructures irrespective of genotype, indicating that  
54 *Cacna1c* haploinsufficiency has no prominent effects on these brain features in female  
55 rats.

56

57 **Key Words:** Cav1.2, calcium, adult hippocampal neurogenesis, medial prefrontal  
58 cortex, hippocampus, neuropsychiatric disorders

59 **BACKGROUND**

60 The *CACNA1C* gene encodes the channel pore-forming alpha-1 subunit of the voltage-  
 61 dependent L-type gate calcium channel Cav1.2. Via this pore and a voltage sensor,  
 62 Cav1.2 controls the depolarization-dependent calcium influx into the cell and,  
 63 therefore, plays a central role in brain functioning through modulating neuronal  
 64 excitability, synaptic plasticity, and gene expression (for review see: Kabir et al. [1,2]).  
 65 This gene was repeatedly linked to major neuropsychiatric disorders, such as major  
 66 depressive disorder (MDD)\*, bipolar disorder (BPD), autism spectrum disorder (ASD),  
 67 and schizophrenia (SCZ), as shown by several studies [3–6]. Genome-wide  
 68 association studies identified a particular single-nucleotide polymorphism (SNP),  
 69 rs1006737, as one of the most common *CACNA1C* variants with relevance to  
 70 neuropsychiatric disorders (for review see: Heyes et al. [7]). Interestingly, sex-  
 71 dependent effects of *CACNA1C* have been reported, with female patients exhibiting a  
 72 higher prevalence of MDD and BD [8,9] and reduced recovery from SCZ episodes [10]  
 73 than males.

74 Several neuroimaging studies confirmed an association of *CACNA1C* and human brain  
 75 anatomy and function, such as increased gray matter volume in the prefrontal cortex  
 76 (PFC; [11]) and especially in the anterior cingulate cortex (ACC; [12]) of rs1006737 risk  
 77 allele carriers, as compared to healthy controls. Soeiro-de-Souza et al. [13]  
 78 investigated the impact of rs1006737 on different substructures of the medial prefrontal  
 79 cortex (mPFC) in female euthymic BD patients. Interestingly, they reported an age-  
 80 related thinning of the ACC and increased thickness of the medial orbitofrontal cortex  
 81 in risk allele carriers. Another study showed alterations in the white matter  
 82 microstructure of the hippocampus (HC) in rs1006737 risk carriers compared to  
 83 controls [14]. On the functional level, reduced connectivity between the PFC and limbic  
 84 structures was reported for healthy rs1006737 risk carriers [12] and BP patients [15].  
 85 In addition, rs1006737 risk carriers displayed altered social outgroup emotion  
 86 processing reflected by a reduced activation of the ventral ACC [16]. Furthermore,

---

\*Abbreviations: AD, affective disorder; AHN, adult hippocampal neurogenesis; BPD, bipolar disorder ; MDD, major depressive disorder; SCZ, schizophrenia; ASD, autism spectrum disorder; SNP, single-nucleotide polymorphism; *Cacna1c*<sup>+/+</sup>, heterozygous *Cacna1c*; *Cacna1c*<sup>+/+</sup>, wildtype *Cacna1c*; USV, ultrasonic vocalizations; DCX, doublecortin; BrdU, 5-bromodeoxyuridine; ACC, anterior cingulate cortex; dHC, dorsal hippocampus; iHC, intermediate; vHC, ventral; DG, dentate gyrus; Hi, hilus; fCA1-3, field of CA1 – CA3; mPFC, medial prefrontal cortex; Cg1, cingulate cortex area 1; Cg2, cingulate cortex area 2; Ci, cingulum; IL, infralimbic cortex; PrL, prelimbic cortex; Mo medial orbital cortex, Cl, claustrum, Cc, corpus callosum; HC, hippocampus; PFC, prefrontal Cortex.

87 altered hippocampal activity during emotional and episodic memory tasks [17–19] and  
88 aberrant activation patterns of the dorsolateral prefrontal cortex during a working  
89 memory task [20] were found in healthy rs1006737 risk carriers.

90 Based on the evidence from human imaging studies, Kabir et al. [2] concluded that  
91 *CACNA1C* alterations eventuate in a dysregulation of the PFC-amygdala-  
92 hippocampus network and they emphasized rodent models as a useful tool to explore  
93 the influence of *Cacna1c* on this neuronal circuitry. In mice, effects of *Cacna1c*  
94 manipulations on adult hippocampal neurogenesis (AHN) were reported ([21–23]; for  
95 review see: Moon et al. [24]). In a first study, Lee et al. [23] demonstrated that a  
96 forebrain specific knockout of *Cacna1c* decreased the number of immature neurons  
97 and the survival of newborn hippocampal neurons. In other mouse models, neuron-  
98 specific deletion of *Cacna1c* was associated with reduced numbers of immature  
99 neurons [21] and deletion of *Cacna1c* on astrocyte-like neural stem cells was related  
100 with reduced cell proliferation [22]. In rats, there is also evidence for *Cacna1c* playing  
101 a role in AHN. Most notably, a recent study reported reduced proliferation rates in a  
102 heterozygous *Cacna1c* rat model [24]. On the behavioral level, this *Cacna1c* rat model  
103 was shown to display aberrant learning capabilities [25,26] and aberrant social  
104 interaction associated with altered socio-affective communication [27–29].

105 However, very little is still known about brain alterations in this *Cacna1c* rat model and,  
106 to our knowledge, no one has studied AHN in heterozygous *Cacna1c* female rats,  
107 which is surprising given the sex-specific effects of *CACNA1C* variants in humans.

108 Here, we conducted two studies to investigate the effects of partial *Cacna1c* depletion  
109 on AHN and volumetric properties of the HC and the PFC in adult female constitutive  
110 heterozygous (*Cacna1c*<sup>+/-</sup>) rats and wildtype (*Cacna1c*<sup>+/+</sup>) littermate controls. In study  
111 1, we analyzed proliferation versus survival of adult-born hippocampal cells based on  
112 a 5-bromodeoxyuridine assay ensuring neuronal cell-type specificity through applying  
113 an immunofluorescent multiple staining approach as suggested by Kuhn et al. [30].  
114 Specifically, we focused on cell proliferation versus survival of adult-born neurons in  
115 the dorsal (dHC), intermediate (iHC), and ventral (vHC) hippocampus. In study 2, we  
116 performed a detailed volumetric analysis with high structural resolution of the dHC and  
117 the mPFC, including their major substructures. We hypothesized that a reduction of  
118 *Cacna1c* expression leads to reduced AHN accompanied by volumetric changes in the  
119 dHC and mPFC.

**120 MATERIALS AND METHODS****121 Animals**

122 Adult female constitutive heterozygous rats (*Cacna1c*<sup>+/-</sup>) were compared to female  
123 wildtype littermate controls (*Cacna1c*<sup>+/+</sup>). *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats were generated using zinc  
124 finger technology (Horizon Discovery Ltd, Cambridge, UK) on a Sprague-Dawley  
125 background [31]. Rats were housed in groups under standard laboratory conditions  
126 and genotyped as previously described [27].

127

**128 General Procedure**

129 Two studies were performed in rats of both genotypes at the age of approximately 6  
130 months. In study 1, AHN was assessed. In Study 2, volumetric analyses of the dHC  
131 and mPFC were performed. For study 1, AHN was assessed in N=16 *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats  
132 and compared to N=16 *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls. To this aim, 5-bromodeoxyuridine (BrdU;  
133 Sigma, St. Louis, MO, USA), a thymidine analog which gets permanently incorporated  
134 into DNA during the S-phase of the cell cycle, was used for the analysis of  
135 neurogenesis based on the time point of sacrifice (for review see: [32,33]). BrdU was  
136 dissolved at 10mg/ml in 0.9% saline and injected i.p. at a dose of 100 mg/kg on 5  
137 consecutive days, according to previous studies [34,35]. After the last BrdU injection,  
138 rats were sacrificed either 1 day later to quantify immature neurons, or 21 days later to  
139 measure survival of young hippocampal cells (Fig. 1A). For study 2, volumetric  
140 measures of the dHC and mPFC were performed in N=20 *Cacna1c*<sup>+/-</sup> and compared  
141 to N=19 *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls (one *Cacna1c*<sup>+/+</sup> rat had to be excluded from the  
142 experiment).

143

**144 Immunohistochemistry**

145 All rats were sacrificed with 600 mg/kg pentobarbital i.p. (Merial, Hallbergmoos,  
146 Germany) and perfused transcardially using 0.9% saline followed by 4% (wt/vol)  
147 paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). The brains  
148 were removed and postfixed (4% paraformaldehyde, 4°C) for 24 h. To measure AHN,  
149 relevant parts of the brains were stored in 0.1 mol/L PBS for further analysis. For  
150 volumetric analysis of the dHC and mPFC, brains were cryoprotected (4%  
151 paraformaldehyde with 20% sucrose) and stored (4°C) for further processing.

152

**153 Study 1 - Adult Hippocampal Neurogenesis**

154 For immunohistochemistry, brains were sent to NeuroScience Associates (Knoxville,  
155 TN, USA) where their MultiBrain®/MultiCord® Technology was used for embedding,  
156 sectioning, and staining. In short, free-floating coronal 40 µm sections of every 10th  
157 slice were used for triple immunohistochemical staining to warrant cell-type specificity  
158 in subsequent analyses. All incubation solutions from the primary antibody onward  
159 used Tris buffered saline (TBS) with Triton X-100 as the vehicle. All rinses were done  
160 with TBS. The sections were immunostained with the primary antibodies overnight at  
161 room temperature. Vehicle solutions contained Triton X-100 for permeabilization.  
162 Following rinses, a fluoro-tagged or biotinylated secondary antibody (anti IgG of host  
163 animal in which the primary antibody was produced) was applied. Following rinses, for  
164 sections with a biotinylated secondary antibody, a fluorescent tagged streptavidin was  
165 applied. To obtain triple staining, the following steps were accordingly performed. BrdU  
166 (Novus NB500-235) was run at 1:5K and then an AlexaFluor 555 secondary antibody  
167 (ThermoScientific A21436) was applied at 1:500. Per BrdU protocol, a 1M HCL step  
168 was performed after initial rinses, but prior to beginning staining. NeuN (neuron-  
169 specific nuclear protein; Millipore MAB377), a commonly used marker of postmitotic  
170 and mature neuronal cells (for review see: von Bohlen und Halbach [36]), was run at  
171 1:150, then a biotinylated secondary (Vector Labs BA-2001) was applied at 1:1K, then  
172 an AlexaFluor 647 streptavidin (ThermoScientific S32357) was applied at 1:1K. Ki-67  
173 (Abcam ab16667), an endogenous cellular marker of on-going cell proliferation [36],  
174 was run at 1:150 and then an AlexaFluor 488 secondary antibody (ThermoScientific  
175 A21206) was applied at 1:500. The obtained sections were mounted on gelatin-coated  
176 glass slides and air-dried. The slides were dehydrated in alcohols, cleared in xylene,  
177 and cover-slipped.

178 Digital whole-slide scans (format NDPIS) of the coronal sections were captured by a  
179 Hamamatsu NanoZoomer S60 Digital Slide Scanner (Hamamatsu Photonics,  
180 Hamamatsu, Japan), which is capable of 3-color fluorescence imaging. Fluorescence  
181 scans were acquired at 20x magnification corresponding to the three markers at 555  
182 nm (BrdU; exposure 16), 488 nm (Ki-67; exposure 28), and 647 nm (NeuN; exposure  
183 64) wavelength. All sections were scanned under identical light and exposure settings.  
184 The Orbit Image Analysis software (Actelion Pharmaceuticals Ltd, Allschwil,  
185 Switzerland) was applied for whole slide analysis [37]. Orbit is an open source program

186 (<http://www.orbit.bio>, September 28th 2018) and allows machine-learning based cell  
187 segmentation and classification [38]. Labeled cells were counted bilaterally on every  
188 10th section in the SVZ (bregma 2.2 to -0.4 mm), the granular cell layer (GCL), and  
189 the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus of the HC (bregma -3.24 to -5.76 mm;  
190 [39]). The SGZ was defined as an approximately two-cell soma-wide zone along the  
191 inner base of the GCL, as suggested by Banasr et al. [40]. The regions of interest  
192 (ROI), i.e. SVZ and GCL combined with SGZ, were manually marked and a trained  
193 algorithm applied to detect BrdU<sup>+</sup>, Ki-67<sup>+</sup>, and double-labeled, i.e. BrdU<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup> and  
194 BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>, cells. These data were visually double-checked by an experienced  
195 observer who was blind to genotype and perfusion time point.

196 Additionally, the numbers of cells were counted separately in the dHC (bregma -3.24 to  
197 -5.16 mm) and the vHC (bregma -5.28 to -5.76 mm), based on the suggestions by  
198 Banasr et al. [40,41]. Furthermore, we distinguished vHC and iHC. On slides containing  
199 the vHC, upper parts (vertically 5.8 mm in relation to bregma) were defined as the iHC  
200 (Fig. 1B). The numbers of BrdU<sup>+</sup>, Ki-67<sup>+</sup>, and double-labeled cells, i.e. BrdU<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup>  
201 and BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup>, were expressed as cells per cubic millimeter (N/mm<sup>3</sup>) by multiplying  
202 the area of ROIs by the thickness of sections.

203

#### 204 **Study 2 - Volumetric analysis of the dHC and mPFC**

205 Frozen brains (-20°C) were cut on a freezing microtome (CM1850, Leica, Wetzlar,  
206 Germany) in 40 µm coronal sections for volumetric analysis. Every 10th slice was  
207 mounted on a gelatin-coated glass slide and stained with cresyl-violet. If one slide  
208 was lost or damaged during cutting, one of the next two slides was mounted to avoid  
209 missing data. Planimetric measurements were created to quantify areas of the dHC  
210 and mPFC on an Axio Imager.M2 light microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) with  
211 a magnification of 25. In Stereo Investigator 9 (MicroBrightField Inc., USA), regions of  
212 interest (µm<sup>2</sup>) were manually labeled based on Paxinos and Watson [39]. Regarding  
213 the HC, the area of total dHC, and corresponding substructures CA1-CA3, dentate  
214 gyrus (DG), hilus (Hi), and field of CA1-CA3 (fCA1-3) were determined, covering the  
215 dorsal part of the HC (-2.28 to -4.20 mm in relation to bregma). Additionally, we  
216 determined the whole area of the brain at these coordinates using sections containing  
217 the dHC. In total, N=2 *Cacna1c*<sup>-/-</sup> and N=3 *Cacna1c*<sup>+/-</sup> animals had to be excluded  
218 from analysis due to data loss. Additionally, we performed a detailed analysis of the

219 mPFC (4.20 to 2.28 mm in relation to bregma), including the area of the total mPFC,  
220 and as substructures, cingulate cortex area 1 (Cg1), cingulate cortex area 2 (Cg2),  
221 cingulum (Ci), infralimbic cortex (IL), prelimbic cortex (PrL), medial orbital cortex (Mo),  
222 claustrum (Cl), and corpus callosum (Cc). We also determined the whole area of the  
223 brain at these coordinates using section containing the mPFC. Due to data loss, N=5  
224 *Cacna1c*<sup>+/-</sup> and N=4 *Cacna1c*<sup>+/+</sup> animals had to be excluded. Finally, volumes in mm<sup>3</sup>  
225 of all (sub-) structures were calculated based on the Cavalieri principle [42] with the  
226 Cavalieri Estimator tool in Stereo Investigator 9. All volumetric analyses were  
227 performed by experienced observers blind to genotypes.

228

### 229 **Statistical analysis**

230 AHN was analyzed by two-way ANOVAs with the between-subject factors genotype  
231 (G) and time point of perfusion (PF). Additionally, we examined AHN in the sub-regions  
232 of the HC, i.e. dHC, iHC, and vHC, by two-way ANOVAs with the between-subject  
233 factors genotype (G) and the within factor sub-region (S) separately for each perfusion  
234 time point. For comparing volumes of the dHC and mPFC with the total brain volumes,  
235 repeated measures ANOVAs with the between factor genotype (G) and the within  
236 factor structure (S) were calculated. The substructures of the dHC and mPFC were  
237 analyzed by repeated measures ANOVAs with the between-subject factors genotype  
238 (G) and the within factor substructure (S). ANOVAs were followed by post-hoc  
239 Bonferroni-corrected t-tests when appropriate. All repeated measures ANOVAs were  
240 Greenhouse-Geisser-corrected if a violation of sphericity was detected. For statistically  
241 significant outcomes, the effect size (Cohen's d) and the suggested interpretations  
242 (d=0.2 small; d=0.5 medium, and d=0.8 large) were reported [43]. Data are presented  
243 as means±SEM. A p-value of <0.05 was considered statistically significant and a p-  
244 value of <0.10 was considered to show a trend.

## 245 **RESULTS**

### 246 **Study 1 - Adult hippocampal Neurogenesis**

247 The number of BrdU<sup>+</sup> cells differed between the time point of perfusion (P:  
248  $F_{1,28}=38.216$ ,  $p<0.001$ ,  $d=2.185$ ), i.e. there was a prominent decrease in BrdU<sup>+</sup> cells  
249 21 days compared to 1 day after the last BrdU injection. We did not find any genotype  
250 effects on the number of immature neurons and cell survival (G:  $F_{1,28}=1.193$ ,  $p=0.284$ ;

251 GxP:  $F_{1,28}=0.825$ ,  $p=0.372$ ; Fig. 2A). Besides investigating immature neurons, we  
 252 additionally used Ki-67 to quantify early proliferation. The number of Ki-67<sup>+</sup> cells did  
 253 not differ between genotypes (G:  $F_{1,28}=1.105$ ,  $p=0.302$ ) and time points of perfusion  
 254 (P:  $F_{1,28}=2.012$ ,  $p=0.167$ ; GxP:  $F_{1,28}=0.808$ ,  $p=0.337$ ; Fig. 2B).

255 Based on our multiple staining approach, we evaluated the number of double-labeling  
 256 of BrdU<sup>+</sup> with Ki-67<sup>+</sup> and NeuN<sup>+</sup> cells to confirm the neuronal origin of the BrdU<sup>+</sup> labeled  
 257 cells. The number of co-labeled BrdU<sup>+</sup> and Ki-67<sup>+</sup> cells was higher at 1 day compared  
 258 to 21 days (P:  $F_{1,28}=19.300$ ,  $p<0.001$ ,  $d=1.588$ ), while genotype had again no effect on  
 259 proliferation (G:  $F_{1,28}=0.419$ ,  $p=0.523$ ; GxP:  $F_{1,28}=0.292$ ,  $p=0.593$ ; Fig. 2C). Regarding  
 260 co-labeling of BrdU<sup>+</sup> and NeuN<sup>+</sup> cells, a reversed pattern was observed with an  
 261 increased number of BrdU<sup>+</sup> and NeuN<sup>+</sup> cells on the second time point of perfusion (P:  
 262  $F_{1,28}=61.307$ ,  $p<0.001$ ,  $d=2.853$ ), indicating that these cells have undergone typical  
 263 maturation processes. Again, genotype had no effect on the number of co-labeled cells  
 264 (G:  $F_{1,28}=0.200$ ,  $p=0.658$ ; GxP:  $F_{1,28}=0.035$ ,  $p=0.852$ ; Fig. 2D). Notably, the volumes  
 265 of the ROIs used to determine labeled cells did not differ between genotypes (G:  
 266  $F_{1,28}=1.460$ ,  $p=0.273$ ) and time points of perfusion (PF:  $F_{1,28}=0.229$ ,  $p=0.636$ ; GxP:  
 267  $F_{1,28}=0.118$ ,  $p=0.734$ ).

268 Furthermore, we evaluated AHN in the dHC, iHC, and vHC (Fig. 1B). In general, the  
 269 number of BrdU<sup>+</sup> cells was highest in the dHC as compared to the iHC and vHC 1 day  
 270 (S:  $F_{1,28}=35.809$ ,  $p<0.001$ ) and 21 days (S:  $F_{2,28}=25.085$ ,  $p<0.001$ ; Table 1) after the  
 271 last BrdU injection. Similar patterns were found for Ki-67<sup>+</sup> cells (1 day = S:  $F_{1,28}=35.809$ ,  
 272  $p<0.001$ ; 21 days = S:  $F_{1,44,20,12}=28.133$ ,  $p<0.001$ ), BrdU<sup>+</sup> and Ki-67<sup>+</sup> double-labeling  
 273 (1 day = S:  $F_{1,28}=7.792$ ,  $p=0.002$ ; 21 days = S:  $F_{1,28}=1.284$ ,  $p=0.293$ ), and co-labeling  
 274 of BrdU<sup>+</sup> and NeuN<sup>+</sup> (1 day = S:  $F_{1,27,17,60}=31.259$ ,  $p<0.001$ ; 21 days = S:  $F_{1,28}=40.468$ ,  
 275  $p<0.001$ ).

276 Again, no genotype effects were found after 1 day (G:  $F_{1,14}=2.444$ ,  $p=0.140$ , GxS:  
 277  $F_{1,28}=0.468$ ,  $p=0.631$ ;) and 21 days (G:  $F_{1,14}=0.061$ ,  $p=0.808$ , GxS:  $F_{1,28}=0.637$ ,  
 278  $p=0.536$ ) after the last BrdU injection for BrdU<sup>+</sup> cells. The same was true for Ki-67<sup>+</sup> (1  
 279 day = G:  $F_{1,14}=1.457$ ,  $p=0.247$ , GxS:  $F_{1,28}=0.468$ ,  $p=0.631$ ; 21 days = G:  $F_{1,14}=0.451$ ,  
 280  $p=0.513$ ; GxS:  $F_{1,44,20,12}=2.924$ ,  $p=0.091$ ), BrdU<sup>+</sup> and Ki-67<sup>+</sup> co-labeled cells (1 day =  
 281 G:  $F_{1,14}=1.080$ ,  $p=0.316$ , GxS:  $F_{1,28}=0.213$ ,  $p=0.809$ ; 21 days = G:  $F_{1,14}=0.300$ ,  
 282  $p=0.592$ , GxS:  $F_{1,28}=0.992$ ,  $p=0.384$ ), and double-labeling of BrdU<sup>+</sup> and NeuN<sup>+</sup> (1 day

283 = G:  $F_{1,14}=0.070$ ,  $p=0.795$ , GxS:  $F_{1,27,17.60}=0.965$ ,  $p=0.393$ ; 21 days = G:  $F_{1,14}=0.161$ ,  
284  $p=0.694$ , GxS:  $F_{1,28}=0.788$ ,  $p=0.465$ ).

285

## 286 **Study 2 - Volumetric analysis of the dHC and mPFC**

287 Neither the volume of the whole area of the brain at coordinates containing the dHC  
288 nor the volume of the dHC differed between genotypes (G:  $F_{1,32}=0.173$ ,  $p=0.680$ ; S:  
289  $F_{1,32}=1139.045$ ,  $p<0.001$ ,  $d=7.423$ ; GxS:  $F_{1,32}=0.050$ ,  $p=0.824$  Fig. 3A). Furthermore,  
290 genotype had no effect on the volumes of the substructures, i.e. CA1-CA3, DG, Hi,  
291 fCA1-3(G:  $F_{1,32}=2.464$   $p=0.126$ ; S:  $F_{1,14,36.59}=450.373$ ,  $p<0.001$ ; GxS:  $F_{1,14,36.59}=2.499$ ,  
292  $p=0.119$ ; Table 2A).

293 We additionally analyzed the volume of the mPFC in female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and  
294 *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls. Again, genotype did not affect the volumes of the mPFC and the  
295 whole area of the brain at coordinates containing the mPFC (G:  $F_{1,28}=0.389$ ,  $p=0.538$ ;  
296 S:  $F_{1,28}=4770.770$ ; GxS:  $F_{1,28}=0.171$ ,  $p=0.682$ ). In addition, genotype had no effect on  
297 the volumes of the substructures, i.e. Cg 1 and 2, Ci, IL, PrL, medial orbital cortex, CL,  
298 and Cc (G:  $F_{1,28}=0.441$   $p=0.512$ ; S:  $F_{1,08,30,20}=4850.973$ ,  $p<0.001$ ; GxS:  
299  $F_{1,08,30,20}=0.292$ ,  $p=0.610$ ; Table 2B).

300 **DISCUSSION**

301 We performed two studies to determine the effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on  
302 AHN, as well as the volumes of the dHC and mPFC using adult female heterozygous  
303 *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and wildtype *Cacna1c*<sup>+/+</sup> littermate controls. In study 1, we carried out  
304 a detailed immunofluorescence-based analysis of AHN to examine genotype effects at  
305 different developmental stages of adult-born cells in the dentate gyrus of the HC. In  
306 general, we found a prominent decrease of BrdU<sup>+</sup> cells 21 days in comparison to 1 day  
307 after the last BrdU injection, which is in accordance with Pieper et al. [44], who  
308 demonstrated that ~50% of new-born BrdU<sup>+</sup> cells died 20 days after a single BrdU  
309 injection. Moreover, we used Ki67 to assess cell proliferation. We found comparable  
310 numbers of Ki-67<sup>+</sup> cells at both times of perfusion, which underlines the validity of our  
311 analysis, since no major changes in proliferation within 21 days were to be expected  
312 [45,46]. Additionally, we verified the neuronal origin of detected cells using a multiple  
313 staining approach. The number of double-labeled BrdU<sup>+</sup> and Ki-67<sup>+</sup> cells was higher at  
314 1 day compared to 21 days. This effect was also expected since Ki-67 is only  
315 expressed during early developmental stages of adult-born hippocampal cells ([47], for  
316 review see: Mandyam and Koob [48]). The increase of co-labeled BrdU<sup>+</sup> and NeuN<sup>+</sup>  
317 cells between time points of perfusion is also consistent with previous results showing  
318 that a substantial number BrdU<sup>+</sup> and NeuN<sup>+</sup> cells can be found three days after a single  
319 BrdU injection [49] and co-labeling of both markers increases over time reaching a  
320 peak about 2 weeks after BrdU injection [50]. Also, we found a dorso-ventral gradient  
321 of AHN, consistent with previous results showing more neurogenesis in the dHC as  
322 compared to the vHC in rats and mice [51,52].

323 On the other hand, our results provide no evidence for effects of partial *Cacna1c*  
324 depletion on AHN, especially on immature neurons and survival of cells in the HC of  
325 adult female rats. In a first study using a heterozygous *Cacna1c* rat model, Moon et al.  
326 [24] investigated AHN in male *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls and reported  
327 equal amounts of immature neurons using doublecortin (DCX), which is commonly  
328 used to identify immature neurons [53]. This finding is in line with our BrdU results  
329 showing similar levels of immature neurons in adult female rats. However, Moon et al.  
330 [24] showed reduced numbers of BrdU<sup>+</sup> cells after a single dose of BrdU 6 hours before  
331 perfusion in *Cacna1c*<sup>+/-</sup> animals suggesting reduced proliferation. They explained these  
332 differences between both markers by compensatory mechanisms based on reduced

333 apoptosis followed by enhanced cell survival. In contrast, we did not find effects of  
334 *Cacna1c* haploinsufficiency on proliferation rates as the numbers of Ki-67<sup>+</sup> cells and,  
335 respectively co-labeled Ki-67<sup>+</sup> and BrdU<sup>+</sup> cells on day 1, were similar in female  
336 *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls. These somehow contradictory results could  
337 be explained by the different markers and their abilities to label distinct stages of cell  
338 development. Ki-67 is expressed during the entire duration of the cell cycle except the  
339 resting phase [36], while BrdU gets incorporated into DNA only during the S-phase of  
340 the cell cycle [32]. Indeed, quantitative analysis of Ki-67<sup>+</sup> and BrdU<sup>+</sup> cells showed 50%  
341 higher numbers of Ki-67<sup>+</sup> cells when examined 24 h after a single BrdU injection [48].  
342 The BrdU data of Moon et al. [24] might reflect very early deficits in proliferation, which  
343 cannot be detected by slightly broader markers, such as DCX or Ki-67, due to the  
344 proposed compensatory processes. The divergent results could also be explained by  
345 sex-specific mechanisms (for review see: Shohayeb et al. [54]), since Moon et al. [24]  
346 used males, whereas we focused on females.

347 Furthermore, we assessed the survival of young hippocampal neurons in *Cacna1c*<sup>+/-</sup>  
348 rats and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls. Neither the numbers of BrdU<sup>+</sup> cells nor the cells co-  
349 labeled for BrdU and NeuN differed between groups 21 days after BrdU injections,  
350 implying equal survival rates of young hippocampal neurons. Lee et al. [23], however,  
351 reported reduced survival of young hippocampal neurons over 30 days after a single  
352 BrdU injection in forebrain-specific *Cacna1c* knockout mice. They additionally  
353 demonstrated that their forebrain-specific knockout was associated with decreased  
354 numbers of immature neurons as indicated by reduced DCX<sup>+</sup> cells and BrdU<sup>+</sup> cells  
355 after applying the same BrdU assay as ours. Interestingly, they reported comparable  
356 proliferation rates as indicated by equal levels of BrdU<sup>+</sup> cells in the HC of forebrain  
357 specific-*Cacna1c* knockout and control mice 1 hour after a single BrdU injection  
358 standing in line with our results. In a different mouse model, Temme et al. [21]  
359 demonstrated reduced immature neurons in conditional knockout mice with neuron-  
360 specific deletion of Ca<sub>v</sub>1.2 as compared to wildtype animals by analyzing DCX<sup>+</sup> and  
361 BrdU<sup>+</sup> cells in the HC. Furthermore, a deletion of *Cacna1c* on astrocyte-like neural  
362 stem cells (type 1 cells) in mice resulted in decreased cell proliferation measured by  
363 Ki-67<sup>+</sup> cells and a BrdU assay with injections 24, 18, and 12 h before sacrifice while  
364 numbers of immature DCX<sup>+</sup> cells did not differ between genotypes [22]. In summary,  
365 the impact of *Cacna1c* deletions on AHN seems to be rather subtle in the heterozygous

366 *Cacna1c* rat model, whereas in several mouse models, characterized by more severe  
367 manipulations of *Cacna1c*, pronounced effects were observed.

368 In addition, we performed a detailed volumetric analysis of the dHC showing that partial  
369 *Cacna1c* depletion did not affect the size of the total HC and its substructures. In  
370 particular, structures such as dentate gyrus and hilus, which include the neurogenic  
371 niche for AHN, had similar volumes irrespective of genotype. Also, no effects of  
372 *Cacna1c* haploinsufficiency on dentate gyrus size in *Cacna1c* mouse models [21,23]  
373 and *Cacna1c* haploinsufficient rats [24] were reported. Moreover, we also focused on  
374 the mPFC in female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and *Cacna1c*<sup>+/-</sup> controls. Again, no genotype  
375 effects on the volumes of mPFC and corresponding substructures, i.e. cingulate cortex  
376 area 1 and 2, cingulum, infralimbic cortex, and prelimbic cortex, were found.

377 Taken together, *Cacna1c* haploinsufficiency lacks effects on AHN and the volumetric  
378 properties of the mPFC and the dHC in female rats. This is interesting, because Cav1.2  
379 is highly expressed in the cortex, including the mPFC, and HC [1,55]. *Cacna1c* mRNA  
380 is especially enriched in the mPFC and the dentate gyrus [56]. Accordingly, we found  
381 reduced Cav1.2 expression levels by ~50% in cortical tissue of female and male  
382 *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats compared to *Cacna1c*<sup>+/+</sup> littermate controls, therefore effects on brain  
383 structure could have been expected [27,28]. Additionally, *Cacna1c* depletion was  
384 accompanied by enhanced mitochondrial resilience to oxidative stress *in vitro* [57,58]  
385 yielding information that certain, but different, biological pathways are affected by  
386 *Cacna1c* manipulations.

387 On the behavioral level, two studies investigated the impact of *Cacna1c*  
388 haploinsufficiency on cognitive functions in the *Cacna1c* rat model. These results are  
389 somewhat conflicting because Sykes et al. [25] detected impairments in an early stage  
390 of reversal learning while we demonstrated intact reversal learning and even positive  
391 effects on spatial memory [26,59], which suggests rather mild effects of *Cacna1c*  
392 haploinsufficiency on cognitive domains. This is paralleled by our current results  
393 showing no main effects of *Cacna1c* depletion on AHN and the volumetric properties  
394 of the mPFC and the dHC. However, we demonstrated changes in social behavior in  
395 juvenile [27,28] and adult female [29] *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats. The emission of pro-social  
396 50-kHz ultrasonic vocalizations (USV), a readout for affective communication (for  
397 review see: Wöhr and Schwarting [60]), during juvenile play was reduced in *Cacna1c*<sup>+/-</sup>  
398 rats compared to their wildtype littermates. Likewise, *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats displayed reduced

399 social approach behavior towards 50-kHz USV playback [27]. In adult female  
400 *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats, we demonstrated a highly reduced emission of 50-kHz USV and mild  
401 social deficits during direct social interaction [29]. Several other potential molecular  
402 pathways have been implicated [1] that should be addressed in future studies to gain  
403 a better understanding of behavioral deficits seen in the *Cacna1c* rat model as well as  
404 in the patho-mechanisms of neuropsychiatric disorders like MDD, ASD, BPD, and  
405 SCZ.

406 **DECLARATIONS:**

407 **Ethics Approval:** All procedures were conducted in strict accordance with the the  
408 National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals  
409 and the relevant local or national rules and regulations of Germany and were subject  
410 to prior authorization by the local government (MR 20/35 19/2014 and G65/2019;  
411 Tierschutzbehörde, Regierungspräsidium Gießen, Germany).

412

413 **Competing interests:** The authors declare no conflict of interest.

414

415 **Funding:** This work was supported by grants from the Deutsche  
416 Forschungsgemeinschaft to R.S. (DFG SCHW 559/14-1 and SCHW 559/14-2) and  
417 M.W. (DFG WO 1732/4-1 and WO 1732/4-2).

418

419 **Authors contributions:** MW and TR conceived the study; TR performed the analyses  
420 and analyzed the data; TR and RS wrote the manuscript; RS and MW acquired  
421 funding. All authors read and approved the final manuscript.

422

423 **Acknowledgments:** The authors wish to thank Marco Bartz, Moria Braun, Ingmar  
424 Conell, Christine Hohmeyer, Marcella Rietschel, Manuell Stritt, and Stephanie Witt for  
425 their help in this project. The authors also give thanks to Prof. Marco Celio and Felix  
426 Meyenhofer at the University of Fribourg/Switzerland where digital whole-slide  
427 scanning was performed.

## 428 REFERENCES

- 429 [1] Z.D. Kabir, A. Martínez-Rivera, A.M. Rajadhyaksha, From Gene to Behavior: L-  
 430 Type Calcium Channel Mechanisms Underlying Neuropsychiatric Symptoms,  
 431 Neurotherapeutics. 14 (2017) 588–613. [https://doi.org/10.1007/s13311-017-](https://doi.org/10.1007/s13311-017-0532-0)  
 432 0532-0.
- 433 [2] Z.D. Kabir, A.S. Lee, A.M. Rajadhyaksha, L-type Ca<sup>2+</sup> channels in mood,  
 434 cognition and addiction: integrating human and rodent studies with a focus on  
 435 behavioural endophenotypes, J. Physiol. 594 (2016) 5823–5837.  
 436 <https://doi.org/10.1113/JP270673>.
- 437 [3] M.A.R. Ferreira, M.C. O'Donovan, Y. a Meng, I.R. Jones, D.M. Ruderfer, L.  
 438 Jones, J. Fan, G. Kirov, R.H. Perlis, E.K. Green, J.W. Smoller, D. Grozeva, J.  
 439 Stone, I. Nikolov, K. Chambert, M.L. Hamshere, V.L. Nimgaonkar, V. Moskvina,  
 440 M.E. Thase, S. Caesar, G.S. Sachs, J. Franklin, K. Gordon-Smith, K.G. Ardlie,  
 441 S.B. Gabriel, C. Fraser, B. Blumenstiel, M. Defelice, G. Breen, M. Gill, D.W.  
 442 Morris, A. Elkin, W.J. Muir, K.A. McGhee, R. Williamson, D.J. MacIntyre, A.W.  
 443 MacLean, D. St Clair, M. Robinson, M. Van Beck, A.C.P. Pereira, R.  
 444 Kandaswamy, A. McQuillin, D.A. Collier, N.J. Bass, A.H. Young, J. Lawrence, I.  
 445 Nicol Ferrier, A. Anjorin, A. Farmer, D. Curtis, E.M. Scolnick, P. McGuffin, M.J.  
 446 Daly, A.P. Corvin, P.A. Holmans, D.H. Blackwood, H.M. Gurling, M.J. Owen,  
 447 S.M. Purcell, P. Sklar, N. Craddock, Collaborative genome-wide association  
 448 analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder, Nat. Genet.  
 449 40 (2008) 1056–1058. <https://doi.org/10.1038/ng.209>.
- 450 [4] I. Splawski, K.W. Timothy, L.M. Sharpe, N. Decher, P. Kumar, R. Bloise, C.  
 451 Napolitano, P.J. Schwartz, R.M. Joseph, K. Condouris, H. Tager-Flusberg, S.G.  
 452 Priori, M.C. Sanguinetti, M.T. Keating, CaV1.2 Calcium Channel Dysfunction  
 453 Causes a Multisystem Disorder Including Arrhythmia and Autism, Cell. 119  
 454 (2004) 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.011>.
- 455 [5] M. Nyegaard, D. Demontis, L. Foldager, A. Hedemand, T.J. Flint, K.M.  
 456 Sørensen, P.S. Andersen, M. Nordentoft, T. Werge, C.B. Pedersen, D.M.  
 457 Hougaard, P.B. Mortensen, O. Mors, A.D. Børglum, CACNA1C (rs1006737) is  
 458 associated with schizophrenia, Mol. Psychiatry. 15 (2010) 119–121.  
 459 <https://doi.org/10.1038/mp.2009.69>.
- 460 [6] E.K. Green, D. Grozeva, I. Jones, L. Jones, G. Kirov, S. Caesar, K. Gordon-

- 461 Smith, C. Fraser, L. Forty, E. Russell, M.L. Hamshere, V. Moskvina, I. Nikolov,  
 462 A. Farmer, P. McGuffin, P.A. Holmans, M.J. Owen, M.C. O'Donovan, N.  
 463 Craddock, The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of  
 464 recurrent major depression and of schizophrenia, *Mol. Psychiatry*. 15 (2010)  
 465 1016–1022. <https://doi.org/10.1038/mp.2009.49>.
- 466 [7] S. Heyes, W.S. Pratt, E. Rees, S. Dahimene, L. Ferron, M.J. Owen, A.C. Dolphin,  
 467 Genetic disruption of voltage-gated calcium channels in psychiatric and  
 468 neurological disorders, *Prog. Neurobiol.* 134 (2015) 36–54.  
 469 <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.002>.
- 470 [8] D.T. Dao, P.B. Mahon, X. Cai, C.E. Kovacsics, R.A. Blackwell, M. Arad, J. Shi,  
 471 P.P. Zandi, P. O'Donnell, J.A. Knowles, M.M. Weissman, W. Coryell, W.A.  
 472 Scheftner, W.B. Lawson, D.F. Levinson, S.M. Thompson, J.B. Potash, T.D.  
 473 Gould, Mood Disorder Susceptibility Gene CACNA1C Modifies Mood-Related  
 474 Behaviors in Mice and Interacts with Sex to Influence Behavior in Mice and  
 475 Diagnosis in Humans, *Biol. Psychiatry*. 68 (2010) 801–810.  
 476 <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.019>.
- 477 [9] S.H. Witt, N. Kleindienst, J. Frank, J. Treutlein, T. Mühleisen, F. Degenhardt, M.  
 478 Jungkunz, B. Krumm, S. Cichon, A. Tadic, N. Dahmen, C.E. Schwarze, B.  
 479 Schott, L. Dietl, M.M. Nöthen, A. Mobascher, K. Lieb, S. Roepke, D. Rujescu, M.  
 480 Rietschel, C. Schmahl, M. Bohus, Analysis of genome-wide significant bipolar  
 481 disorder genes in borderline personality disorder, *Psychiatr. Genet.* 24 (2014)  
 482 262–265. <https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000060>.
- 483 [10] U. Heilbronner, D. Malzahn, J. Strohmaier, S. Maier, J. Frank, J. Treutlein, T.W.  
 484 Mühleisen, A.J. Forstner, S.H. Witt, S. Cichon, P. Falkai, M.M. Nöthen, M.  
 485 Rietschel, T.G. Schulze, A common risk variant in CACNA1C supports a sex-  
 486 dependent effect on longitudinal functioning and functional recovery from  
 487 episodes of schizophrenia-spectrum but not bipolar disorder, *Eur.*  
 488 *Neuropsychopharmacol.* 25 (2015) 2262–2270.  
 489 <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.09.012>.
- 490 [11] M.J. Kempton, G. Ruberto, E. Vassos, R. Tatarelli, P. Giradi, D. Collier, S.  
 491 Frangou, Effects of the CACNA1C Risk Allele for Bipolar Disorder on Cerebral  
 492 Gray Matter Volume in Healthy Individuals, *Am. J. Psychiatry*. 166 (2009) 1413–  
 493 1414. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2009.09050680>.

- 494 [12] F. Wang, A.M. McIntosh, Y. He, J. Gelernter, H.P. Blumberg, The association of  
 495 genetic variation in CACNA1C with structure and function of a frontotemporal  
 496 system, *Bipolar Disord.* 13 (2011) 696–700. <https://doi.org/10.1111/j.1399-5618.2011.00963.x>.  
 497
- 498 [13] M.G. Soeiro-de-Souza, B. Lafer, R.A. Moreno, F.G. Nery, T. Chile, K. Chaim, C.  
 499 da Costa Leite, R. Machado-Vieira, M.C.G. Otaduy, H. Vallada, The CACNA1C  
 500 risk allele rs1006737 is associated with age-related prefrontal cortical thinning in  
 501 bipolar I disorder, *Transl. Psychiatry.* 7 (2017) e1086.  
 502 <https://doi.org/10.1038/tp.2017.57>.
- 503 [14] B. Dietsche, H. Backes, D. Laneri, T. Weikert, S.H. Witt, M. Rietschel, J.  
 504 Sommer, T. Kircher, A. Krug, The impact of a CACNA1C gene polymorphism on  
 505 learning and hippocampal formation in healthy individuals: A diffusion tensor  
 506 imaging study, *Neuroimage.* 89 (2014) 256–261.  
 507 <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.11.030>.
- 508 [15] J. Radua, S.A. Surguladze, N. Marshall, M. Walshe, E. Bramon, D.A. Collier,  
 509 D.P. Prata, R.M. Murray, C. McDonald, The impact of CACNA1C allelic variation  
 510 on effective connectivity during emotional processing in bipolar disorder, *Mol.*  
 511 *Psychiatry.* 18 (2013) 526–527. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.61>.
- 512 [16] J.T. Krautheim, B. Straube, U. Dannlowski, M. Pyka, H. Schneider-Hassloff, R.  
 513 Drexler, A. Krug, J. Sommer, M. Rietschel, S.H. Witt, T. Kircher, Outgroup  
 514 emotion processing in the vACC is modulated by childhood trauma and  
 515 CACNA1C risk variant, *Soc. Cogn. Affect. Neurosci.* 13 (2018) 341–348.  
 516 <https://doi.org/10.1093/scan/nsy004>.
- 517 [17] S. Erk, A. Meyer-Lindenberg, K. Schnell, C.O. Von Boberfeld, C. Esslinger, P.  
 518 Kirsch, O. Grimm, C. Arnold, L. Haddad, S.H. Witt, S. Cichon, M.M. Nöthen, M.  
 519 Rietschel, H. Walter, Brain function in carriers of a genome-wide supported  
 520 bipolar disorder variant, *Arch. Gen. Psychiatry.* 67 (2010) 803–811.  
 521 <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.94>.
- 522 [18] S. Erk, A. Meyer-Lindenberg, D.E.J. Linden, T. Lancaster, S. Mohnke, O. Grimm,  
 523 F. Degenhardt, P. Holmans, A. Pocklington, P. Schmierer, L. Haddad, T.W.  
 524 Mühleisen, M. Mattheisen, S.H. Witt, N. Romanczuk-Seiferth, H. Tost, B.H.  
 525 Schott, S. Cichon, M.M. Nöthen, M. Rietschel, A. Heinz, H. Walter, Replication  
 526 of brain function effects of a genome-wide supported psychiatric risk variant in

- 527 the CACNA1C gene and new multi-locus effects, *Neuroimage*. 94 (2014) 147–  
 528 154. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.03.007>.
- 529 [19] K.L. Bigos, V.S. Mattay, J.H. Callicott, R.E. Straub, R. Vakkalanka, B.  
 530 Kolachana, T.M. Hyde, B.K. Lipska, J.E. Kleinman, D.R. Weinberger, Genetic  
 531 Variation in CACNA1C Affects Brain Circuitries Related to Mental Illness, *Arch.*  
 532 *Gen. Psychiatry*. 67 (2010) 939.  
 533 <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.96>.
- 534 [20] F.M. Paulus, J. Bedenbender, S. Krach, M. Pyka, A. Krug, J. Sommer, M. Mette,  
 535 M.M. Nöthen, S.H. Witt, M. Rietschel, T. Kircher, A. Jansen, Association of  
 536 rs1006737 in CACNA1C with alterations in prefrontal activation and fronto-  
 537 hippocampal connectivity, *Hum. Brain Mapp*. 35 (2014) 1190–1200.  
 538 <https://doi.org/10.1002/hbm.22244>.
- 539 [21] S.J. Temme, R.Z. Bell, G.L. Fisher, G.G. Murphy, Deletion of the Mouse  
 540 Homolog of CACNA1C Disrupts Discrete Forms of Hippocampal-Dependent  
 541 Memory and Neurogenesis within the Dentate Gyrus, *ENeuro*. 3 (2016).  
 542 <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0118-16.2016>.
- 543 [22] B. Völkening, K. Schönig, G. Kronenberg, D. Bartsch, T. Weber, Deletion of  
 544 psychiatric risk gene *Cacna1c* impairs hippocampal neurogenesis in cell-  
 545 autonomous fashion, *Glia*. 65 (2017) 817–827.  
 546 <https://doi.org/10.1002/glia.23128>.
- 547 [23] A.S. Lee, H. De Jesús-Cortés, Z.D. Kabir, W. Knobbe, M. Orr, C. Burgdorf, P.  
 548 Huntington, L. McDaniel, J.K. Britt, F. Hoffmann, D.J. Brat, A.M. Rajadhyaksha,  
 549 A.A. Pieper, The Neuropsychiatric Disease-Associated Gene *cacna1c* Mediates  
 550 Survival of Young Hippocampal Neurons, *ENeuro*. 3 (2016) 1–11.  
 551 <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0006-16.2016>.
- 552 [24] A.L. Moon, N. Haan, L.S. Wilkinson, K.L. Thomas, J. Hall, CACNA1C:  
 553 Association With Psychiatric Disorders, Behavior, and Neurogenesis, *Schizophr.*  
 554 *Bull.* 44 (2018) 958–965. <https://doi.org/10.1093/schbul/sby096>.
- 555 [25] L. Sykes, J. Haddon, T.M. Lancaster, A. Sykes, K. Azzouni, N. Ihssen, A.L.  
 556 Moon, T.-C.E. Lin, D.E. Linden, M.J. Owen, M.C. O'Donovan, T. Humby, L.S.  
 557 Wilkinson, K.L. Thomas, J. Hall, Genetic Variation in the Psychiatric Risk Gene  
 558 CACNA1C Modulates Reversal Learning Across Species, *Schizophr. Bull.*  
 559 (2018) 1–9. <https://doi.org/10.1093/schbul/sby146>.

- 560 [26] M.D. Braun, T.M. Kisko, D.D. Vecchia, R. Andreatini, R.K.W. Schwarting, M.  
 561 Wöhr, Sex-specific effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on object recognition,  
 562 spatial memory, and reversal learning capabilities in rats, *Neurobiol. Learn.*  
 563 *Mem.* 155 (2018) 543–555. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.05.012>.
- 564 [27] T.M. Kisko, M.D. Braun, S. Michels, S.H. Witt, M. Rietschel, C. Culmsee, R.K.W.  
 565 Schwarting, M. Wöhr, *Cacna1c* haploinsufficiency leads to pro-social 50-kHz  
 566 ultrasonic communication deficits in rats, *Dis. Model. Mech.* 11 (2018)  
 567 dmm034116. <https://doi.org/10.1242/dmm.034116>.
- 568 [28] T.M. Kisko, M.D. Braun, S. Michels, S.H. Witt, M. Rietschel, C. Culmsee, R.K.W.  
 569 Schwarting, M. Wöhr, Sex-dependent effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on  
 570 juvenile social play behavior and pro-social 50-kHz ultrasonic communication in  
 571 rats, *Genes, Brain Behav.* (2019) e12552. <https://doi.org/10.1111/gbb.12552>.
- 572 [29] T.M. Redecker, T.M. Kisko, R.K.W. Schwarting, M. Wöhr, Effects of *Cacna1c*  
 573 haploinsufficiency on social interaction behavior and 50-kHz ultrasonic  
 574 vocalizations in adult female rats, *Behav. Brain Res.* 367 (2019).  
 575 <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.032>.
- 576 [30] H.G. Kuhn, T. Toda, F.H. Gage, Adult Hippocampal Neurogenesis: A Coming-  
 577 of-Age Story, *J. Neurosci.* 38 (2018) 10401–10410.  
 578 <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2144-18.2018>.
- 579 [31] A.M. Geurts, G.J. Cost, Y. Freyvert, B. Zeitler, J.C. Miller, V.M. Choi, S.S.  
 580 Jenkins, A. Wood, X. Cui, X. Meng, A. Vincent, S. Lam, M. Michalkiewicz, R.  
 581 Schilling, J. Foeckler, S. Kalloway, H. Weiler, S. Ménoret, I. Anegon, G.D. Davis,  
 582 L. Zhang, E.J. Rebar, P.D. Gregory, F.D. Urnov, H.J. Jacob, R. Buelow,  
 583 Knockout Rats via Embryo Microinjection of Zinc-Finger Nucleases, *Science*.  
 584 325 (2009) 433–433. <https://doi.org/10.1126/science.1172447>.
- 585 [32] G. Kempermann, *Adult Neurogenesis 2*, 2nd ed., Oxford University Press,  
 586 Oxford, 2011. <https://doi.org/10.1093/med/9780199729692.001.0001>.
- 587 [33] O. Von Bohlen und Halbach, Immunohistological markers for staging  
 588 neurogenesis in adult hippocampus, *Cell Tissue Res.* 329 (2007) 409–420.  
 589 <https://doi.org/10.1007/s00441-007-0432-4>.
- 590 [34] J.C. Brenes, M. Lackinger, G.U. Höglinger, G. Schratt, R.K.W. Schwarting, M.  
 591 Wöhr, Differential effects of social and physical environmental enrichment on  
 592 brain plasticity, cognition, and ultrasonic communication in rats, *J. Comp. Neurol.*

- 593 524 (2016) 1586–1607. <https://doi.org/10.1002/cne.23842>.
- 594 [35] M. Wöhr, M. Kehl, A. Borta, A. Schänzer, R.K.W. Schwarting, G.U. Höglinger,  
595 New insights into the relationship of neurogenesis and affect. Tickling induces  
596 hippocampal cell proliferation in rats emitting appetitive 50-khz ultrasonic  
597 vocalizations, *Neuroscience*. 163 (2009) 1024–1030.  
598 <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.07.043>.
- 599 [36] O. von Bohlen und Halbach, Immunohistological markers for proliferative events,  
600 gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus, *Cell Tissue Res*.  
601 345 (2011) 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1196-4>.
- 602 [37] M. Stritt, B. Roman, J. Marrie, E. Vezzali, E. Weber, A. Stalder, Supervised  
603 Machine Learning Methods for Quantification of Pulmonary Fibrosis, in: 6th Int.  
604 Conf. Adv. Mass Data Anal. Images Signals Med. Biotechnol. Chem. Food Ind.,  
605 2011.
- 606 [38] S. Seger, M. Stritt, E. Vezzali, O. Nayler, P. Hess, P.M.A. Groenen, A.K. Stalder,  
607 A fully automated image analysis method to quantify lung fibrosis in the  
608 bleomycininduced rat model, *PLoS One*. 13 (2018) 1–12.  
609 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193057>.
- 610 [39] G. Paxinos, C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6th ed.), Acad.  
611 Press. (2007).
- 612 [40] M. Banasr, A. Soumier, M. Hery, E. Mocaër, A. Daszuta, Agomelatine, a New  
613 Antidepressant, Induces Regional Changes in Hippocampal Neurogenesis, *Biol.*  
614 *Psychiatry*. 59 (2006) 1087–1096.  
615 <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.11.025>.
- 616 [41] R.P. Vetreno, F.T. Crews, Binge ethanol exposure during adolescence leads to  
617 a persistent loss of neurogenesis in the dorsal and ventral hippocampus that is  
618 associated with impaired adult cognitive functioning, *Front. Neurosci*. 9 (2015)  
619 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00035>.
- 620 [42] H.J.G. Gundersen, E.B. Jensen, The efficiency of systematic sampling in  
621 stereology and its prediction, *J. Microsc.* 147 (1987) 229–263.  
622 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1987.tb02837.x>.
- 623 [43] J. Cohen, *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, 2. ed.,  
624 Lawrence Erlbaum, Hillsdale, NJ, 1988.
- 625 [44] A.A. Pieper, S. Xie, E. Capota, S.J. Estill, J. Zhong, J.M. Long, G.L. Becker, P.

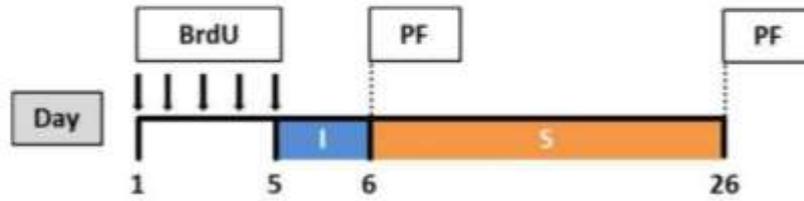
- 626           Huntington, S.E. Goldman, C.-H. Shen, M. Capota, J.K. Britt, T. Kotti, K. Ure,  
627           D.J. Brat, N.S. Williams, K.S. MacMillan, J. Naidoo, L. Melito, J. Hsieh, J. De  
628           Brabander, J.M. Ready, S.L. McKnight, Discovery of a Proneurogenic,  
629           Neuroprotective Chemical, *Cell*. 142 (2010) 39–51.  
630           <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.018>.
- 631 [45] J.S. Snyder, Recalibrating the Relevance of Adult Neurogenesis, *Trends*  
632           *Neurosci.* 42 (2019) 164–178. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.12.001>.
- 633 [46] Y. Fu, Z. Rusznák, J.B.J. Kwok, W.S. Kim, G. Paxinos, Age-Dependent  
634           Alterations of the Hippocampal Cell Composition and Proliferative Potential in  
635           the hA $\beta$ PPSwInd-J20 Mouse, *J. Alzheimer's Dis.* 41 (2014) 1177–1192.  
636           <https://doi.org/10.3233/JAD-132717>.
- 637 [47] C.D. Mandyam, G.F. Koob, The addicted brain craves new neurons: Putative  
638           role for adult-born progenitors in promoting recovery, *Trends Neurosci.* 35 (2012)  
639           250–260. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.12.005>.
- 640 [48] N. Kee, S. Sivalingam, R. Boonstra, J.. Wojtowicz, The utility of Ki-67 and BrdU  
641           as proliferative markers of adult neurogenesis, *J. Neurosci. Methods.* 115 (2002)  
642           97–105. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(02\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(02)00007-9).
- 643 [49] G. Kempermann, Adult Hippocampal Neurogenesis, in: *Adult Neurogenes. 2*,  
644           Oxford University Press, 2011: pp. 185–215.  
645           <https://doi.org/10.1093/med/9780199729692.003.0006>.
- 646 [50] J.S. Snyder, J.S. Choe, M.A. Clifford, S.I. Jeurling, P. Hurley, A. Brown, J.F.  
647           Kamhi, H.A. Cameron, Adult-Born Hippocampal Neurons Are More Numerous,  
648           Faster Maturing, and More Involved in Behavior in Rats than in Mice, *J. Neurosci.*  
649           29 (2009) 14484–14495. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1768-09.2009>.
- 650 [51] J.S. Snyder, R. Radik, J.M. Wojtowicz, H.A. Cameron, Anatomical gradients of  
651           adult neurogenesis and activity: Young neurons in the ventral dentate gyrus are  
652           activated by water maze training, *Hippocampus.* 19 (2009) 360–370.  
653           <https://doi.org/10.1002/hipo.20525>.
- 654 [52] S. Jinno, Topographic differences in adult neurogenesis in the mouse  
655           hippocampus: A stereology-based study using endogenous markers,  
656           *Hippocampus.* 21 (2011) 467–480. <https://doi.org/10.1002/hipo.20762>.
- 657 [53] G. Kempermann, Technical Notes, in: *Adult Neurogenes. 2*, Oxford University  
658           Press, 2011: pp. 216–274.

- 659 <https://doi.org/10.1093/med/9780199729692.003.0007>.
- 660 [54] B. Shohayeb, M. Diab, M. Ahmed, D.C.H. Ng, Factors that influence adult  
661 neurogenesis as potential therapy, *Transl. Neurodegener.* 7 (2018) 4.  
662 <https://doi.org/10.1186/s40035-018-0109-9>.
- 663 [55] B. Schlick, B.E. Flucher, G.J. Obermair, Voltage-activated calcium channel  
664 expression profiles in mouse brain and cultured hippocampal neurons,  
665 *Neuroscience.* 167 (2010) 786–798.  
666 <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.02.037>.
- 667 [56] L. Sykes, N.E. Clifton, J. Hall, K.L. Thomas, Regulation of the Expression of the  
668 Psychiatric Risk Gene *Cacna1c* during Associative Learning, *Mol.*  
669 *Neuropsychiatry.* 4 (2018) 149–157. <https://doi.org/10.1159/000493917>.
- 670 [57] S. Michels, M. Wöhr, R.K. Schwarting, C. Culmsee, Psychiatric risk gene  
671 *Cacna1c* determines mitochondrial resilience against oxidative stress in  
672 neurons, *Cell Death Dis.* 9 (2018) 645. [https://doi.org/10.1038/s41419-018-](https://doi.org/10.1038/s41419-018-0676-9)  
673 [0676-9](https://doi.org/10.1038/s41419-018-0676-9).
- 674 [58] S. Michels, G.K. Ganjam, H. Martins, G.M. Schrott, M. Wöhr, R.K.W. Schwarting,  
675 C. Culmsee, Downregulation of the psychiatric susceptibility gene *Cacna1c*  
676 promotes mitochondrial resilience to oxidative stress in neuronal cells, *Cell*  
677 *Death Discov.* 4 (2018) 54. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0061-6>.
- 678 [59] M.D. Braun, T.M. Kisko, S.H. Witt, M. Rietschel, R.K.W. Schwarting, M. Wöhr,  
679 Long-term environmental impact on object recognition, spatial memory, and  
680 reversal learning capabilities in *Cacna1c* haploinsufficient rats, *Hum. Mol. Genet.*  
681 (2019). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz235>.
- 682 [60] M. Wöhr, R.K.W. Schwarting, Affective communication in rodents: ultrasonic  
683 vocalizations as a tool for research on emotion and motivation, *Cell Tissue Res.*  
684 354 (2013) 81–97. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1607-9>.
- 685

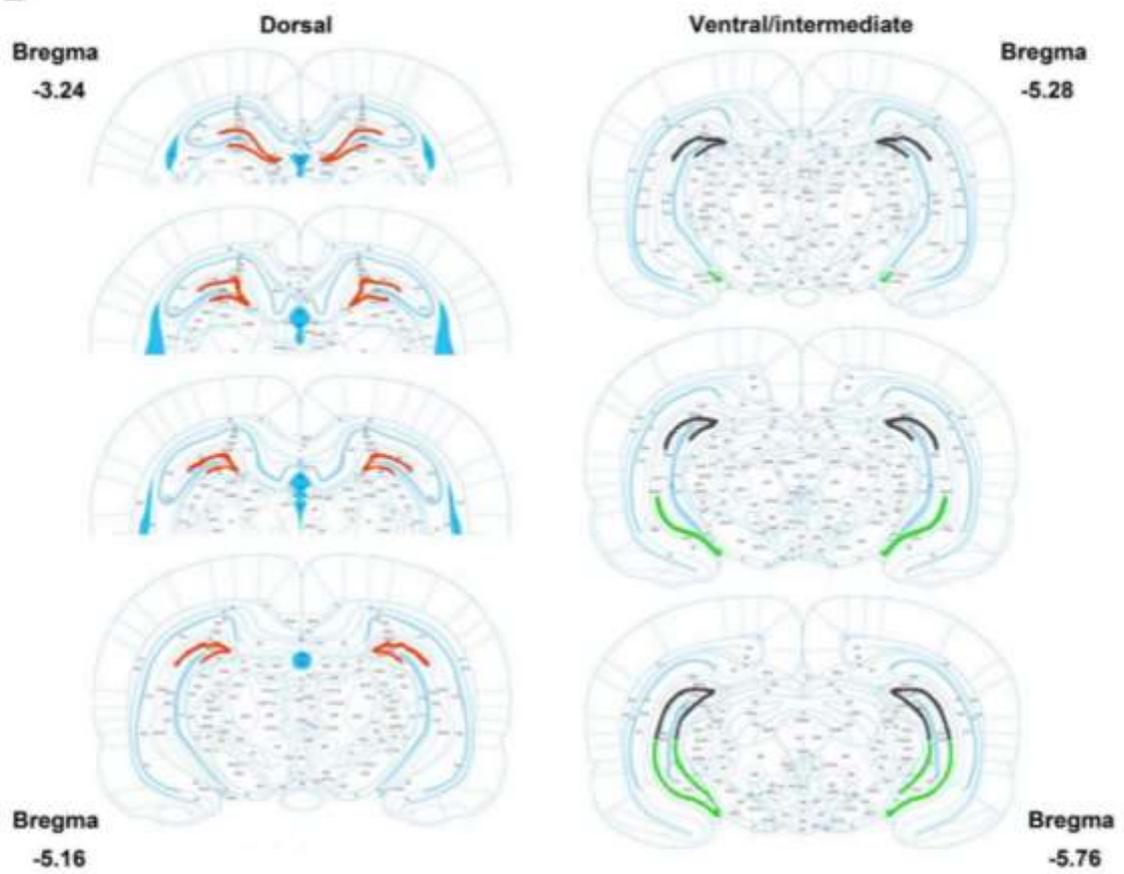
686 FIGURES & TABLES

687 Figure 1

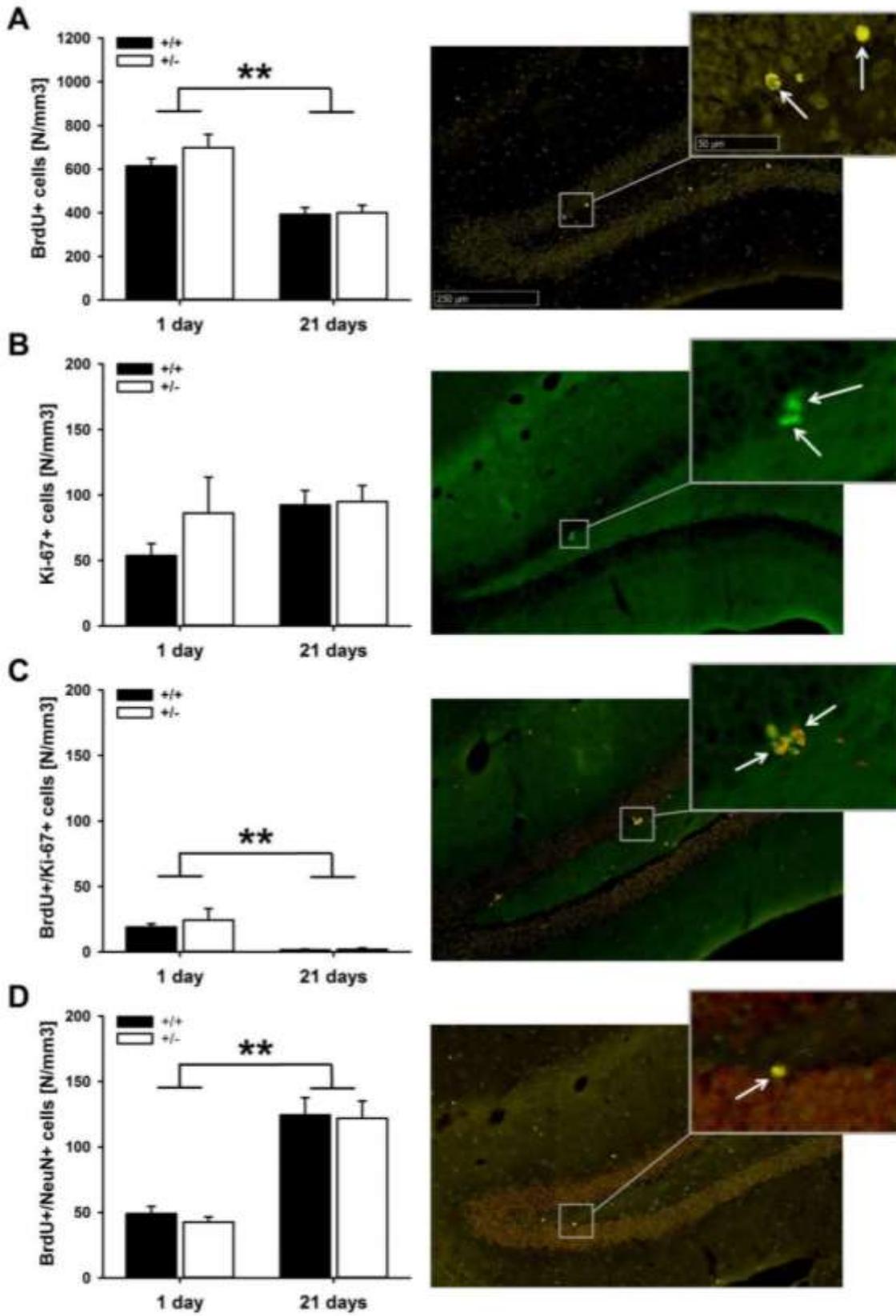
**A**



**B**

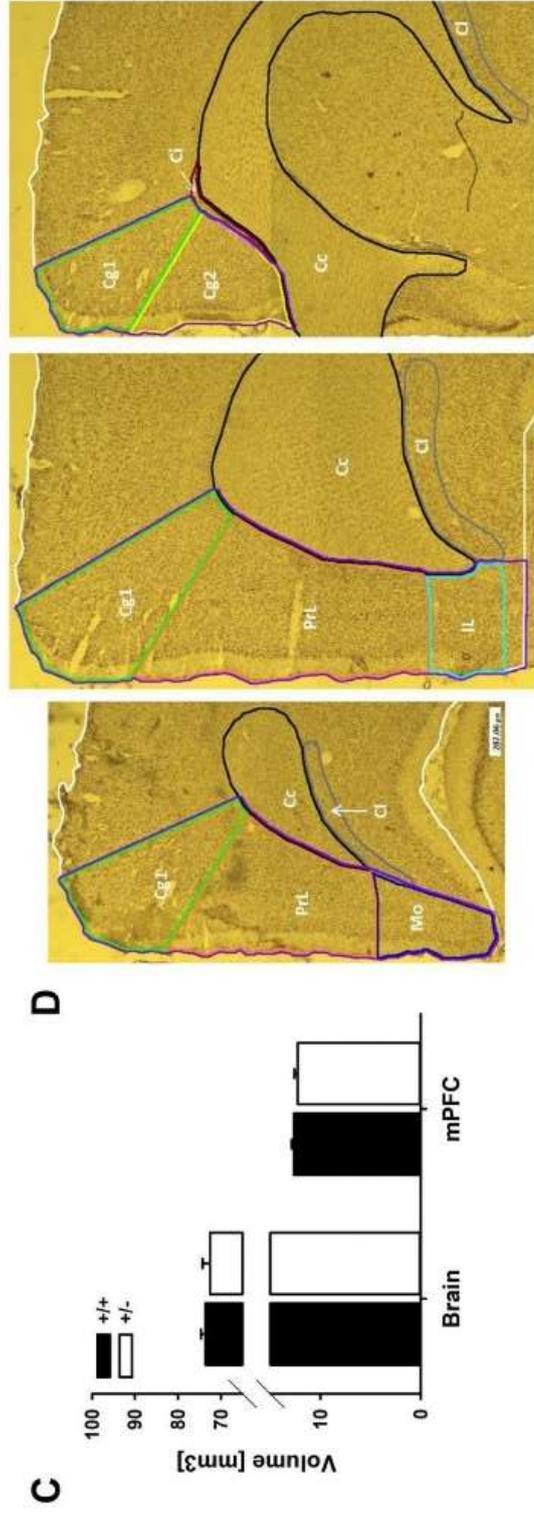


689 **Figure 2**



690

691 **Figure 3**



693 **Table 1:** Number of labeled cells in the hippocampal substructures, i.e. dHC, iHC, and vHC, depicted for genotype and time point  
 694 of perfusion (A) 1 day and (B) 21 days after the last BrdU injection.

Staining	A)	Genotype	dHC	iHC	vHC	B)	Genotype	dHC	iHC	vHC
BrdU <sup>+</sup> cells [N/mm <sup>3</sup> ]	A)	<i>Cacna1c<sup>+/+</sup></i>	730.48 ±42.61	513.95 ±50.47	329.44 ±48.27	<i>Cacna1c<sup>+/+</sup></i>	435.35 ±25.24	395.20 ±28.97	255.00 ±52.73	
		<i>Cacna1c<sup>-/-</sup></i>	807.52 ±70.41	677.40 ±70.28	429.40 ±88.11	<i>Cacna1c<sup>-/-</sup></i>	457.87 ±43.60	388.14 ±49.78	206.30 ±37.40	
Ki67 <sup>+</sup> cells [N/mm <sup>3</sup> ]	A)	<i>Cacna1c<sup>+/+</sup></i>	69.20 ±10.06	36.35 ±11.48	19.05 ±6.50	<i>Cacna1c<sup>+/+</sup></i>	103.02 ±11.71	104.02 ±18.09	42.71 ±15.91	
		<i>Cacna1c<sup>-/-</sup></i>	113.44 ±37.77	52.79 ±21.96	48.01 ±24.07	<i>Cacna1c<sup>-/-</sup></i>	124.55 ±14.56	76.24 ±17.71	17.01 ±6.83	
BrdU <sup>+</sup> /Ki67 <sup>+</sup> cells [N/mm <sup>3</sup> ]	A)	<i>Cacna1c<sup>+/+</sup></i>	28.18 ±3.83	7.33 ±3.06	3.53 ±2.24	<i>Cacna1c<sup>+/+</sup></i>	2.33 ±1.24	0.00 ±0.00	0.88 ±0.88	
		<i>Cacna1c<sup>-/-</sup></i>	32.08 ±13.39	18.89 ±4.99	8.87 ±7.49	<i>Cacna1c<sup>-/-</sup></i>	2.63 ±1.38	2.65 ±2.65	0.00 ±0.00	
BrdU <sup>+</sup> /NeuN <sup>+</sup> cells [N/mm <sup>3</sup> ]	A)	<i>Cacna1c<sup>+/+</sup></i>	67.40 ±8.59	23.10 ±6.86	11.65 ±5.88	<i>Cacna1c<sup>+/+</sup></i>	135.10 ±12.33	147.74 ±22.19	42.92 ±12.69	
		<i>Cacna1c<sup>-/-</sup></i>	60.32 ±8.40	33.22 ±6.73	4.58 ±3.17	<i>Cacna1c<sup>-/-</sup></i>	141.71 ±19.68	124.33 ±10.26	40.46 ±8.40	

695 Data are represented as means±SEM.

**Table 2: Volumes in mm<sup>3</sup> of the substructures of the (A) dHc and (B) mPFC depicted for both genotypes.**

A)	Hippocampal structure	<i>Cacna1c</i> <sup>+/+</sup>	<i>Cacna1c</i> <sup>-/-</sup>	B)	Prefrontal structure	<i>Cacna1c</i> <sup>+/+</sup>	<i>Cacna1c</i> <sup>-/-</sup>
	dHC	12.66±0.81	13.74±0.59		mPFC	73.67±1.05	72.53±1.75
	DG	0.51±0.02	0.56±0.03		Cg1	4.19±0.07	4.18±0.15
	Hi	0.84±0.06	0.93±0.05		Cg2	0.79±0.02	0.77±0.03
	CA1	0.43±0.04	0.49±0.03		PrL	5.02±0.11	4.93±0.11
	CA2	0.09±0.01	0.10±0.01		Mo	0.43±0.03	0.42±0.03
	CA3	0.66±0.04	0.74±0.04		IL	0.97±0.02	0.98±0.05
	fCA1	3.87±0.30	4.47±0.22		Cc	8.81±0.29	8.53±0.25
	fCA2	0.39±0.03	0.41±0.02		CL	1.52±0.04	1.43±0.05
	fCA3	1.23±0.07	1.30±0.04		Ci	0.16±0.01	0.20±0.00

697 Data are represented as means±SEM. Abbreviations: (A) dorsal hippocampus (dHC); dentate gyrus (DG); hilus (Hi), field of CA1 – CA3 (fCA1-3). (B) medial  
698 prefrontal cortex (mPFC); cingulate cortex area 1 (Cg1); cingulate cortex area 2 (Cg2); cingulum (Ci); infralimbic cortex (IL); prelimbic cortex (PrL); medial  
699 orbital cortex (Mo), claustrum (Cl), corpus callosum (Cc).

700 **FIGURE & TABLE LEGENDS**

701 **Figure 1: Effects of *Cacna1c* haploinsufficiency on adult hippocampal**  
 702 **neurogenesis.** (A) The experimental design to determine the number of immature  
 703 neurons (I; blue bar) and survival (S; orange bar) of young hippocampal neurons  
 704 (PF=perfusion). (B) Illustration of coronal sections of the rat brain showing the dHC  
 705 (red), iHC (black) and vHC (green) used for the analysis of AHN based on Paxinos and  
 706 Watson [39].

707

708 **Figure 2: Adult hippocampal neurogenesis in the dentate gyrus of female**  
 709 ***Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> littermate controls.** Results and representative  
 710 images of coronal hippocampal sections immunostained for (A) BrdU<sup>+</sup>, (B) Ki-67<sup>+</sup>, (C)  
 711 double-labeling of BrdU<sup>+</sup>/Ki-67<sup>+</sup>, and (D) double-labeling of BrdU<sup>+</sup>/NeuN<sup>+</sup> cells of  
 712 *Cacna1c*<sup>+/+</sup> (black bar; N=8) and *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats (white bar; N=8) depicted for animals  
 713 sacrificed 1 day and 21 days after the last BrdU injection. Insets highlight  
 714 immunoreactive cells. Data are represented as mean±SEM; \* p<0.050 main effect time  
 715 point of perfusion. \*\* p<0.001 main effect time point of perfusion.

716

717 **Figure 3: Volumetric analysis of the dorsal hippocampus and medial prefrontal**  
 718 **cortex of female *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> littermate controls.** (A) Volumes  
 719 of the dHC and the whole area of the brain at coordinates containing the dHC of  
 720 *Cacna1c*<sup>+/-</sup> (white bar; N=18) and *Cacna1c*<sup>+/+</sup> *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls (black bar; N=16).  
 721 (B) Representative images of a coronal section showing the dHC (purple) and its  
 722 substructures, i.e. DG (red), Hi (blue), CA1 (yellow), CA2 (green), CA3 (cyan), fCA1  
 723 (brown), fCA2 (grey), fCA3 (orange). (C) Volumes of the mPFC and the whole area of  
 724 the brain at coordinates containing the mPFC of *Cacna1c*<sup>+/-</sup> rats (white bar; N=15) and  
 725 *Cacna1c*<sup>+/+</sup> controls (black bar; N=15). (D) Representative images of a coronal section  
 726 showing the sub structures of the mPFC (purple), i.e. Cg1 (green), Cg2 (yellow), Ci  
 727 (brown), IL (cyan), PrL (orange), Mo (blue), claustrum (grey), Cc= (black), PFC (white).  
 728 Data are represented as mean±SEM; \*\* p<0.001 main effect time of structure. Note:  
 729 Line thickness in (B) and (D) was manually increased to improve clarity.

## 4 DISKUSSION

Das Risikogen *CACNA1C* konnte durch GWAS mit den wichtigsten neuropsychiatrischen Störungen, d. h. MDD, BPD, ASD und SCZ, in Verbindung gebracht werden (Heyes et al., 2015; Moon et al., 2018). Diese Erkrankungen zeichnen sich durch überlappende Symptombereiche aus, da insbesondere Defizite der sozialen Funktionsfähigkeit und affektive Symptome häufig auftreten. Auf translationaler Ebene konnte zugleich verändertes Sozialverhalten und Abweichungen des Affektzustands bei verschiedenen *CacnalC* Nagetiermodelle gefunden werden (Kabir et al., 2017c; Moon et al., 2018). Zudem weisen die bisherigen Studien auf Geschlechtseffekte von *CACNA1C* bzw. *CacnalC* hin (Dao et al., 2010; Witt et al., 2014; Braun et al., 2018; Takeuchi et al., 2018; Kisko et al., 2019), da weibliche Individuen stärker von Veränderungen betroffen erscheinen als männliche Individuen.

Zunächst fasse ich die umfassenden Ergebnissen der Studie I, die einen Einfluss der *CacnalC* Haploinsuffizienz auf das direkte Sozialverhalten von adulten weiblichen Ratten zeigte, zusammen und vergleiche diese mit den Befunden der bisherigen *CacnalC* Nagetierstudien. Weiterhin werden die Vorteile der Messung 50-kHz USV und die zeitliche Verknüpfung dieser Rufe mit unterschiedlichen Verhaltensweisen im Kontext des sozialen Interaktionsverhaltens erläutert. Darüber hinaus werde ich methodische Aspekte und Limitationen der Studie I diskutieren.

Im darauffolgenden Abschnitt nehme ich Bezug auf die adulte hippocampale Neurogenese als einen möglichen grundlegenden Mechanismus in der Ätiologie neuropsychiatrischer Störungen (Toda et al., 2018), da ein negativer Einfluss von *CacnalC* auf die adulte Neurogenese in den *CacnalC* Nagetiermodellen bereits gefunden wurde (Lee et al., 2016; Temme et al., 2016; Völkening et al., 2017; Moon et al., 2018). Ich werde die gegenläufigen Befunde der unveränderten Neurogenese von adulten weiblichen *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten aus Studie II ausführlich diskutieren, mögliche Einflussfaktoren auf die AHN aufzeigen und methodische Überlegungen zur Messung der Neurogenese einfließen lassen. Des Weiteren gehe ich auf den Nutzen der detaillierten morphologischen Untersuchung des Hippocampus und mPFCs aus Studie II im Rahmen der translationalen Forschung ein.

Nachfolgend biete ich die Ergebnisse meiner Studien in die allgemeine Forschung ein, um so die Validität des *CacnalC*<sup>+/-</sup> Rattenmodells und der weiteren *CacnalC* Nagetiermodelle zu diskutieren. Dazu werde ich zusätzlich die geschlechtsspezifischen *CacnalC* Effekte aufgreifen und die Wichtigkeit der Untersuchung von weiblichen Individuen in der biomedizinischen

Forschung erläutern. Abschließend wird eine translationale Einordnung der Ergebnisse vorgenommen und mögliche zukünftige Forschungsvorhaben dargestellt.

#### 4.1 Studie I: *Cacna1c* und Sozialverhalten bei weiblichen adulten Ratten

Psychische Gesundheit und das soziale Funktionsniveau sind eng miteinander verbunden und insbesondere Defizite der sozialen Funktionsfähigkeit sind laut DSM-5 ein wichtiges diagnostisches Kriterium für viele der neuropsychiatrischen Störungsbilder (American Psychiatric Association, 2013). Zudem sind soziale Defizite bei vielen psychiatrischen Patienten ausgeprägt vorhanden (Kennedy und Adolphs, 2012; Meyer-Lindenberg und Tost, 2012). Interessanterweise konnten *CACNA1C* SNPs mit psychologischen Eigenschaften, wie einer verringerten Extraversion (Roussos et al., 2011) und einer erhöhten Feindseligkeit (Takeuchi et al., 2018), sowie funktionellen Hirnveränderungen während der Verarbeitung emotionaler sozialer Reize (Wang et al., 2011a; Radua et al., 2013) in Beziehung gesetzt werden, was einen direkten Einfluss von *CACNA1C* auf die soziale Funktionsfähigkeit nahelegt.

Die Fokussierung auf das direkte reziproke soziale Interaktionsverhalten von adulten Versuchstieren und die Kommunikation mittels 50-kHz USV bieten eine adäquate Möglichkeit, den Einfluss von *Cacna1c* auf krankheitsrelevante Phänotypen in Ratten zu untersuchen. Die Ergebnisse aus Studie I liefern Hinweise drauf, dass adulte weibliche *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten ein deutlich verringertes Rufverhalten während der direkten sozialen reziproken Interaktion aufwiesen als weibliche *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltiere. Bei Dyaden, die eine *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratte enthielten, konnte eine Reduktion der Emission von 50-kHz USV um bis zu 50 % festgestellt werden. In Anbetracht dieser Ergebnisse und der Hinweise dafür, dass 50-kHz USV an der Regulation des Sozialverhaltens von Ratten beteiligt sind (Wöhr, 2018), werde ich daher zunächst die Resultate der umfassenden behavioralen Analysen der Studie I aufgreifen.

In Studie I wurden zwei unterschiedliche Ebenen gewählt, um den Einfluss einer *Cacna1c* Haploinsuffizienz auf soziale und nicht-soziale Verhaltensweisen von adulten weiblichen Ratten zu evaluieren. Durch die Betrachtung der dyadischen Ebene konnte das Verhalten zwischen den unterschiedlichen Gruppenzusammensetzungen bezüglich des Genotyps, d. h. genotyp-gleiche oder genotyp-gemischte Dyaden, untersucht werden. Ein Vorteil der Studie I liegt außerdem darin begründet, dass auch genotyp-gemischte Dyaden, bestehend aus *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltiere, untersucht wurden, da in den bisherigen Ansätzen zum juvenilen Spielverhalten im *Cacna1c* Rattenmodell lediglich die Effekte auf das Verhalten in Zweiergruppen des gleichen Genotyps untersucht wurden (Kisko et al., 2018,

2019). So konnten in Studie I mögliche Interaktionseffekte zwischen den beiden Genotypen dargestellt werden. Zudem bestand so die Möglichkeit auf einer weiteren Ebene das individuelle Verhalten beider Versuchstiere einer genotyp-gemischten Dyaden zu analysieren, um subtilere Verhaltensveränderungen herauszuarbeiten.

In Bezug auf Sozialverhalten konnte trotz der beutetenden Rolle von 50-kHz USV an der Regulation von Sozialverhalten (Wöhr, 2018) nur ein leichter Einfluss des Genotyps auf das allgemeine Sozialverhalten während der dyadischen Interaktion von adulten weiblichen *CacnalC*<sup>+/-</sup> und *CacnalC*<sup>+/+</sup> Ratten festgestellt werden. Zunächst konnte auf dyadischer Ebene ein vergleichbares Niveau an unterschiedlichen sozialen Verhaltensweisen, wie Riechen am Partner oder gegenseitige Fellpflege, gemessen werden. Es zeigte sich jedoch, dass reine *CacnalC*<sup>+/-</sup> Dyaden mehr passiven Körperkontakt aufbauten als reine *CacnalC*<sup>+/+</sup> Kontrolldyaden. Vergleichbare Effekte eines erhöhten Körperkontakts wurden während des juvenilen Spielkampfes in männlichen *CacnalC*<sup>+/-</sup> Dyaden gefunden (Theresa Kisko, unveröffentlichten Daten). Passenderweise zeigten Kabitzke et al. (2018), dass *Ca<sub>v</sub>1.2* TS Mäuse ein normales Niveau an Sozialverhalten aufwiesen, aber deutlich mehr Zeit in unmittelbarer Nähe zueinander verbrachten als Wildtypkontrolltiere, was mit den Ergebnissen aus Studie I übereinstimmt. Da vermutet wird, dass die belohnendste Komponente der direkten sozialen Interaktion die direkte Berührung ist (Kummer et al., 2011), könnte dieses erhöhte Aufsuchen von Körperkontakt der *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten als Versuch gedeutet werden, ihren reduzierten affektiven Zustand, angezeigt durch die verringerte 50-kHz USV Emission, zu verbessern.

Bei Betrachtung der zweiten individuellen Ebene, d. h. in genotyp-gemischten Dyaden, fiel auf, dass *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten deutlich weniger Zeit mit dem Beriechen der *CacnalC*<sup>+/+</sup> Ratten verbrachten als umgekehrt. Riechverhalten spielt als eine der häufigsten Verhaltensweisen eine Schlüsselrolle im komplexen Verhaltensrepertoire der Ratte (Ferdman et al., 2007; Snigdha und Neill, 2008), da Ratten über olfaktorische Hinweisreize wichtige Informationen über eines Interaktionspartners, z. B. den Gesundheitsstatus des Artgenossen (Arakawa et al., 2010), gewinnen können. Interessanterweise berichten Terrillion et al. (2017), dass ein Knockout der *CacnalC* Expression im NAc von männlichen Mäusen zu einem verringerten Riechverhalten im weiblichen Urin-Riechtest (engl. „Female urine sniffing test“; FUST) nach CSDS führte. Der FUST wird zur Messung von Anhedonie bzw. des affektiven Zustandes von Nagetieren verwendet und ist hoch mit der Emission von USV und der Ausschüttung von Dopamin im NAc korreliert (Malkesman et al., 2010). Daraus kann geschlossen werden, dass auch über das Riechen indirekt der affektive Zustand der Versuchstiere erhoben werden kann und die Reduktion des Riechens der *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten in Studie I ebenfalls auf einen

reduzierten positiven Affektzustand hinweist, was im Einklang mit der verringerten Anzahl an 50-kHz USV steht.

Besonders ausgeprägte Genotypeneffekte kamen in Studie I nach Analyse der nicht-sozialen Verhaltensweisen zum Vorschein, da adulte weibliche *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten deutlich länger ihr eigenes Fell putzen als *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltiere. Im Bereich der translationalen ASD Forschung wird intensive Fellpflege häufig verwendet, um stereotype und repetitive Verhaltensmuster von Nagetieren zu untersuchen (Wöhr und Scattoni, 2013). Somit konnte in Studie I erstmalig ein autismus-relevanter Phänotyp bei adulten weiblichen *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten nachgewiesen werden. Im Kontrast dazu wurde bei juvenilen männlichen und weiblichen *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten und Kontrolltieren keine Unterschiede in der Fellpflege und anderen nicht-sozialen Verhaltensweisen festgestellt werden (Kisko et al., 2018, 2019). Auch bei *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Mäusen und dem Ca<sub>v</sub>1.2 TS Mausmodell wurden keine Stereotypien festgestellt, welche per Fellpflege (Lee et al., 2012; Kabitzke et al., 2018) und Marmelvergraben (engl. „Marble burying“; Bader et al., 2011) gemessen wurden. Es ist daher zu vermuten, dass ASD-ähnliche Verhaltensmuster erst in der späteren Entwicklung der *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten auffällig werden, wobei die Wichtigkeit der Evaluation des ASD-relevanten Verhaltens in einem sozialen Kontext hervorzuheben ist, da beispielsweise Sungur et al. (2016) im *Shank1* Mausmodell für Autismus zeigten, wie wichtig ein sozialer Kontext zur Messung eines autismusähnlichen Phänotyps ist.

Darüber hinaus zeigte sich durch das messwiederholte Versuchsdesign der Studie I, dass *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten ihr Sozialverhalten basierend auf dem Genotyp des jeweiligen Artgenossen in einer Dyade veränderten, während *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltiere die gleichen Verhaltensmuster unabhängig vom Genotyp des Partners beibehielten. Bemerkenswerterweise zeigten *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten ein gesteigertes Sozialverhalten, wenn sie mit einem Partner gleichen Genotyps interagierten, während sie dieses Verhalten reduzierten, wenn sie mit einer *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Ratte in Kontakt kamen, was auf eine Präferenz der *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten für Partner des gleichen Genotyps hinweist. Dass Nagetiere den Genotyp anderer Tiere wahrnehmen, wurde bereits in einem frühen Experiment gezeigt, wobei dieser Effekte im Kontext der Paarung untersucht wurde (Lenington, 1983). Studie I liefert Hinweise darauf, dass im gleichgeschlechtlichen Kontakt diese Unterscheidung ebenfalls eine Rolle spielte und durch die *Cacna1c* Haploinsuffizienz beeinflusst wurde.

Da Ratten in Gruppen leben und soziale Hierarchien aufbauen, wird der etablierte Röhrentest (engl. „Tube test“) zur Untersuchung der Hierarchie von Nagetieren eingesetzt (Lindzey et al., 1961). Studien bestätigten, dass der genetische Hintergrund von Ratten und Mäusen die soziale

Dominanz beeinflussen kann (Garfield et al., 2011; Wang et al., 2011b; Saxena et al., 2018). Die Ergebnisse der Studie I unter Verwendung des Röhrentests lieferten erste Hinweise, dass adulte weibliche *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten nach sozialer Interaktion dominanter sind als *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Kontrolltiere. Diese Dominanz wurde nicht über eine gesteigerte Aggression vermittelt, da in Studie I kein aggressives Verhalten gefunden wurde. In Übereinstimmung mit der gesteigerten Dominanz wurde bei juvenilen weiblichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten im Vergleich zu *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Kontrolltiere während des Spielkampfes ein gesteigertes „Pinning“ Verhalten beobachtet (Kisko et al., 2019), was ebenfalls als Zeichen von erhöhter Dominanz gewertet werden kann. Basierend auf diesen Ergebnissen kann daher geschlossen werden, dass vor allem weibliche *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten sozial dominanter sind als weibliche *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Kontrolltiere.

Im Gegensatz zu den vergleichsweise leichten Veränderungen der sozialen Verhaltensweisen wurde in Studie I bei adulten weiblichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten eine stark verringerte Emission der 50-kHz USV im Vergleich zu weiblichen *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren während der sozialen Interaktion gemessen. Um diese Unterschiede ausführlich zu ergründen, wurden die 50-kHz USV in Studie I detailliert analysiert, was in diesem Umfang meines Wissens erstmalig für ein genetisches Rattenmodell geleistet wurde. Dabei wurden nicht nur die Anzahl der 50-kHz USV und diverse akustische Parameter analysiert, sondern die 50-kHz USV auch hinsichtlich ihrer Subtypen klassifiziert. Zudem erfolgte eine detaillierte zeitliche Analyse mittels hochauflösender Ethogramme, um neue Erkenntnisse über die zeitliche Synchronisation einzelner Komponenten des Verhaltensrepertoires und der Emission von 50-kHz USV von Ratten zu gewinnen.

Zunächst konnte in Dyaden, die eine *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratte enthielten, eine markante Reduktion der Emission von 50-kHz USV um bis zu 50 % festgestellt werden, was in Einklang mit den *a priori* formulierten Hypothesen steht. Durch das messwiederholte Vorgehen der Studie I konnte diese Reduktion durchgängig an beiden Testtagen beobachten werden, was als interne Replikation der Ergebnisse zu werten ist und die Stabilität des Effekts betont, da am zweiten Testtag jeweils eine neu zusammengesetzte Dyade gemessen wurde. Die detaillierten Analysen der akustischen Parameter der 50-kHz USV ergaben, dass die Lautstärke der 50-kHz USV, die von Dyaden mit mindestens einer *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratte emittiert wurde, stark verringert war, während weitere Parameter wie Rufdauer, Spitzenfrequenz und Frequenzmodulation nicht vom Genotyp beeinflusst wurden.

Die reduzierte Emission von 50-kHz USV bei erwachsenen weiblichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten steht zum Teil im Widerspruch mit vorangegangenen Ergebnissen von weiblichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten in früheren Entwicklungsstufen. Bei juvenilen Weibchen war die *Cacnalc* Haploinsuffizienz

zwar mit einem gesteigerten Spielverhalten assoziiert, dennoch hatte der Genotyp der Versuchstiere bei allgemeiner Betrachtung keinen Einfluss auf die Emission von 50-kHz USV (Kisko et al., 2019). Setzt man aber die Anzahl der 50-kHz USV in Verhältnis zur Dauer des gezeigten Spielverhaltens, so war auch die Emission der 50-kHz USV von juvenilen weiblichen *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten verringert.

Ein vergleichbares Muster, wie in Studie I berichtet, wurde hingegen bei juvenilen männlichen Ratten gefunden, da die 50-kHz USV Emission während des Spielverhaltens von männlichen *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten signifikant reduziert war, während diese Reduktion nicht mit einer Veränderung des Spielverhaltens einherging (Kisko et al., 2018). Interessanterweise scheint die Reduktion der Lautstärke der 50-kHz USV in Studie I über die gesamte Entwicklung der Tiere aufzutreten, da auch während des Spielverhaltens von juvenilen männlichen Ratten eine Reduktion der Amplitude bei *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Dyaden gemessen wurde (Kisko et al., 2018).

Die Veränderungen der 50-kHz USV wurden hingegen nicht von einer abweichenden Anzahl an 22-kHz USV im Zuge der sozialen Interaktion in Studie I begleitet. Das Rufverhalten aller Dyaden wurde ebenfalls detailliert bezüglich 22-kHz USV ausgewertet. Dieser Ruftyp konnte aber lediglich in einer Dyade und nur in einstelliger Anzahl festgestellt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die direkte soziale Interaktion mit einem unbekanntem Tier für adulte weibliche *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltiere nicht aversiv bzw. angstbesetzt war (Wöhr und Schwarting, 2010b).

Die 50-kHz USV wurden darüber hinaus hinsichtlich ihrer spektrographischen Eigenschaften untersucht und basierend auf dem Vorgehen von Pereira et al. (2014) den vier verschiedenen 50-kHz USV Ruftypen zugeordnet. Nach Klassifikation der 50-kHz USV erfolgte außerdem eine ausführliche Analyse verschiedener akustischer Parameter der Ruftypen. In vorherigen Studien wurden bereits unterschiedliche Klassifikationsansätze zur Einordnung von 50-kHz USV Ruftypen verwendet und auch akustische Analysen dieser durchgeführt (Burgdorf et al., 2008; Wright et al., 2010), allerdings wurden diese Ansätze in Studie I deutlich erweitert und bieten somit einen hohen Neuheitsgrad, da neben diversen akustischen Variablen auch der Genotyp der Versuchstiere berücksichtigt wurde.

In Bezug auf die Funktion der Ruftypen wurden bereits unterschiedliche Annahmen getroffen. Es wird angenommen, dass FM 50-kHz USV mit positivem Affekt, appetitivem Verhalten und Belohnung assoziiert sind (Burgdorf et al., 2011), während der „Flat“ Subtyp bei der Wiederherstellung von Sozialkontakt und der Vermeidung von Aggressionen von hoher Relevanz ist (Wöhr et al., 2008; Wright et al., 2010; Burke et al., 2017).

Im Kontrast zu dem ausgeprägten Genotypeneffekt auf die Anzahl der 50-kHz USV konnte in Studie I unabhängig vom Genotyp in allen experimentellen Dyaden das gleiche prozentuale Verhältnis an „Flat“, „Step“, „Trill“ und „Mixed“ Subtypen festgestellt werden, auch wenn natürlich eine absolute Reduktion jeden Subtyps in Dyaden, die *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten enthielten, zu verzeichnen war. Dies stimmt nur zum Teil mit den Ergebnissen der Analysen der Ruftypen von Kisko et al. (2018) überein, da die Autoren während des Spiels von juvenilen männlichen Ratten ein verändertes Profil der Subtypen feststellten. Es zeigte sich, dass die Anzahl an „Flat“ und „Mixed“ Subtypen in *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Dyaden reduziert war. Interessanterweise berichten die Autoren, dass trotz einer veränderten 50-kHz USV Emission das Spielverhalten nicht verändert war, was im Einklang mit den nur geringen Veränderung des Sozialverhaltens in Studie I steht. In Anbetracht der Hypothese, dass 50-kHz USV eine wichtige kommunikative Funktion einnehmen und Subtypen mit unterschiedlichen Verhaltensweisen assoziiert sind (siehe: Kapitel 1.2.2.2.2), wäre auch in Studie I eine Verschiebung des Profils zu erwarten gewesen, welche nicht festgestellt werden konnte. Interessanterweise ging die absolute Reduktion der Gesamtanzahl der Rufe, also auch der „Flat“ Ruftypen, nicht mit gesteigertem aggressiven Verhalten in den experimentellen Dyaden mit *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten einher, obwohl dem „Flat“ Subtyp eine wichtige Rolle bei der Vermeidung von Aggressionen zugeschrieben wird (Burke et al., 2017). Die reine Reduktion der 50-kHz USV Emission ohne Verschiebung des prozentualen Verhältnisses der Subtypen stärkt die Hypothese, dass mit den 50-kHz USV der affektive Zustand der Versuchstiere abgebildet wird (siehe: Kapitel 1.2.2.2.1) und in dem Kontext der weiblichen sozialen Interaktion 50-kHz USV eine eher geringere kommunikative Funktion einnehmen.

Wie in Studie I gezeigt, waren die häufigsten Ruftypen „Flat“ und „Trill“ Rufe. Auch „Mixed“ Rufe konnte vergleichsweise häufig gefunden werden, während der Ruftyp „Step“ nur in geringer Anzahl verzeichnet wurde. Ein ähnliches Verhältnis der Ruftypen war ebenfalls bei juvenilen männlichen *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Kontrollentieren zu beobachten (Kisko et al., 2018). Diese Verteilung der Ruftypen könnte ein allgemeines Muster über unterschiedliche Entwicklungsstadien und Zuchtlinien hinweg abbilden, da auch Wright et al. (2010) während der direkten sozialen Interaktion von Long-Evans Ratten hohe Anteile an „Flat“ und „Trill“ Rufe maßen.

Da sich in Studie I nicht nur die visuellen Eigenschaften, sondern auch die akustischen Parameter der Ruftypen signifikant voneinander unterschieden und die Kriterien von Pereira et al. (2014) wiederholt erfolgreich angewendet wurden (Wöhr et al., 2015; Engelhardt et al.,

2017; Kisko et al., 2018, 2019), sprechen diese Befunde für die Validität der gewählten Kategorienanzahl zur Einteilung der 50-kHz USV Ruftypen.

Um die Funktion der 50-kHz USV weiter zu ergründen, wurde in Studie I auf eine zeitliche Synchronisation von Verhalten und 50-kHz USV mittels hochauflösender Ethogramme zurückgegriffen. Dieses Vorgehen erlaubt eine direkte Verknüpfung der 50-kHz USV einer Dyade mit den individuellen Verhaltensweisen, die jede Ratte der Dyade zum Zeitpunkt der Emission zeigte. In Studie I wurde ein Großteil der 50-kHz USV während des sozialen Verhaltens emittiert, was im Einklang mit vorherigen Maus- und Rattenstudien steht (Ferhat et al., 2016; Burke et al., 2018; Kisko et al., 2018; Sungur et al., 2018). Es zeigte sich außerdem, dass der Effekt der *Cacnalc* Haploinsuffizienz auf die 50-kHz USV Emission sowohl während des sozialen als auch nicht-sozialen Verhaltens offenkundig waren. Ausgeprägtere Effekte des *Cacnalc* Genotyps wurden jedoch auf die Anzahl der 50-kHz USV während nicht-sozialer Verhaltensweisen beobachtet, da Dyaden mit *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten eine äußerst prägnante Reduktion der 50-kHz USV während dieser Verhaltensweisen aufwiesen.

In Hinblick darauf, dass direkte körperliche Berührung eine der belohnendsten Komponenten der sozialen Interaktion ist (Kummer et al., 2011) und reine *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Dyaden signifikant mehr Körperkontakt in Studie I suchten, jedoch eine vergleichbare Anzahl an 50-kHz USV während dieses Verhaltens emittierten, kann vermutet werden, dass der erhöhte Körperkontakt der *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten nur zu einer geringen Verbesserung ihres reduzierten positiven affektiven Zustands beitragen konnte, was für die Stabilität dieses Zustands spricht. In einem ähnlichen experimentellen Ansatz verknüpften Ferhat et al. (2016) spezifisches Sozialverhalten und USV im *Shank2* Mausmodell für ASD und zeigten so, dass weibliche *Shank2* Knockout Mäuse beim körperlichen Kontakt mit einem WildtypTier weniger USV ausstießen als Wildtypkontrollen, was ebenfalls auf eine veränderte affektive Komponente des Körperkontakts in diesem ASD-Mausmodell hinweist.

Zusammengefasst zeigte die ausführliche zeitliche Analyse aus Studie I, dass die Anzahl der 50-kHz USV bei Dyaden, die mindestens eine *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten enthielten, während nicht-sozialer, und abgeschwächt, während sozialer Verhaltensweisen im Vergleich zu *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Kontrolldyaden verringert war, was im Kontext der zwei Hypothesen zur Funktion der 50-kHz USV ebenfalls diskutiert werden soll (siehe: Kapitel 1.2.2.2). Die vorliegenden Befunde der reduzierten 50-kHz USV Emission in Dyaden mit *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten stützen die zweite Annahme, da die verringerte Anzahl an 50-kHz USV nur mit leichten Abweichungen des Sozialverhaltens einherging. Daher zeigt diese Reduktion vor allem die Annahmen einer

genotypabhängige Veränderung des positiven affektiven Zustands während der sozialen Interaktion von *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten im Vergleich zu *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren an.

Im Allgemeinen wird die zweite Hypothese dadurch gestützt, dass 50-kHz USV bei Ratten durch angenehme Situationen, wie Paarung, innerartliches Spiel und die Injektion von AMPH, hervorgerufen werden können (Thomas und Barfield, 1985; Burgdorf et al., 2001; Lukas und Wöhr, 2015; Engelhardt et al., 2017) und aversive Stimuli die Emission von 50-kHz USV blockieren (Ishiyama und Brecht, 2016). Darüber hinaus verabreichen sich Ratten 50-kHz USV ähnlich wie Drogen selbst (Burgdorf et al., 2008). Generell ist das Zusammentreffen mit einem Artgenossen für Ratten sehr appetitiv, da 50-kHz USV insbesondere während der sozialen Interaktion auftreten (Wöhr, 2018). Durch die Verwendung der konditionierten Platzpräferenz (engl. „Conditioned place preference“; CPP) wurde eine hohe Präferenz für dyadische Interaktion bei Ratten nachgewiesen (Zernig und Pinheiro, 2015), die einen vergleichbaren Anreizwert wie Kokain zu haben scheint (Kummer et al., 2014).

Auf neurobiologischer Ebene besteht ein Zusammenhang zwischen 50-kHz USV und der Aktivität des dopaminergen mesolimbischen Systems (Brudzynski, 2013), dessen Dysfunktion mit vielen neuropsychiatrischen Störungen in Verbindung gebracht wurde (zur Übersicht siehe: Dichter et al., 2012). Nach der Präsentation von appetitiven 50-kHz USV kommt es zu einer erhöhten Aktivität im NAc (Sadananda et al., 2008; Pultorak et al., 2016), der eine Kernstruktur des mesolimbischen Systems ist. Des Weiteren kann eine gesteigerte Dopaminausschüttung im NAc des Empfängers in Reaktion auf 50-kHz USV Playback aufgezeichnet werden (Willuhn et al., 2014). Auch wird Dopamin während der Emission von 50-kHz USV beim rufenden Tier ausgeschüttet (Panksepp und Burgdorf, 2000; Burgdorf et al., 2007) und die Emission kann durch dopaminerge Substanzen, wie AMPH und Kokain, gesteigert werden (Barker et al., 2010; Natusch und Schwarting, 2010; Pereira et al., 2014; Rippberger et al., 2015; Engelhardt et al., 2017). In Einklang mit diesem Zusammenhang gibt es Hinweise darauf, dass *Cacna1c* Einfluss auf das mesolimbische Dopaminsystem nimmt, wodurch Veränderungen des affektiven Zustandes der Versuchstiere erklärt werden könnte. Bei weiblichen *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Mäusen konnte eine robuste Abschwächung der AMPH-induzierten Hyperlokomotion gefunden werden (Dao et al., 2010), was darauf hindeutet, dass die *Cacna1c* Haploinsuffizienz Verhaltensweisen, welche über das mesolimbische Dopaminsystem gesteuert werden, verändert. Gestützt wird dieser Befund durch Terrillion et al. (2017a), die ebenfalls bei *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Mäusen eine verringerte Hyperlokomotion nach Injektion von AMPH, Kokain und GBR-12909, einem selektiven Dopamin-Wiederaufnahmehemmer, im Vergleich zu *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Mäusen nachwiesen. Zusätzlich zeigten die Autoren mittels zyklischer Voltammetrie, dass die

Verabreichung von GBR12909 zu einer reduzierten extrazellulären Dopaminkonzentrationen bei *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Mäusen führte und schlußfolgerten, dass *Cacnalc* insbesondere die dopaminerge Funktion der präsynaptische Endigung beeinflusst. Durch Züchtungsansätze konnte aufgezeigt werden, dass Ratten, die spezifisch für eine geringe Emission von 50-kHz USV gezüchtet wurden, neben einem abweichenden Sozialverhalten vor allem eine veränderte *Cacnalc* Genexpression im NAc aufwiesen (Moskal et al., 2011; Burgdorf et al., 2013), was den Zusammenhang zwischen *Cacnalc* und dem mesolimbischen Dopaminsystem verdeutlicht.

Zusammenfassend konnte in Studie I erstmalig nachgewiesen werden, dass eine *Cacnalc* Haploinsuffizienz bei adulten weiblichen Ratten zu einer Reduzierung der Anzahl von 50-kHz-USV während der direkten reziproken sozialen Interaktion führte. Die sozialen Verhaltensweisen waren hingegen nur vergleichsweise schwach durch den Genotyp beeinflusst. Die Reduktion der 50-kHz USV Emission zeigte sich vor allem während Ratten in sozialen und vor allem nicht-sozialen Verhaltensweisen involviert waren. Die Ergebnisse deuten daher auf einen reduzierten positiven affektiven Zustand der weiblichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten im Vergleich zu *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren in einem sozialen Kontext hin, wobei der veränderte Affekt nicht direkt mit dem Sozialverhalten der Tier verknüpft ist. Zusätzlich fanden sich in Studie I Belege für ein erhöhtes repetitives Verhalten bei weiblichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten, was für behaviorale Veränderungen mit Relevanz auf die ASD spricht.

Bisher wurde nur in wenigen Studien der Einfluss von *Cacnalc* auf das Sozialverhalten von Mäusen untersucht. Die meisten dieser Studien griffen auf die Dreikammer-Box (Silverman et al., 2010) zur Messung der Soziabilität zurück, was mit diversen Nachteilen einhergeht, da die direkte reziproke soziale Interaktion so nicht untersucht werden kann. Weiterhin besteht ein Nachteil darin, dass in diesen Studien fast ausschließlich adulte männlichen Mäusen verwendet wurden (Bader et al., 2011; Kabir et al., 2017a; Terrillion et al., 2017b; Dedic et al., 2018; Kabitzke et al., 2018). Ein regionsspezifischer Knockout von *Cacnalc* im Vorderhirn von adulten männlichen Mäusen war mit einer zeitlich verringerten sozialen Annäherung assoziiert (Kabir et al., 2017a; Dedic et al., 2018). Auch war die Soziabilität nach der Reduktion der *Cacnalc* Expression im PFC von Mäusen verringert (Kabir et al., 2017a). Eine Verringerung der *Cacnalc* Expression im NAc war nur mit einer verminderten sozialen Interaktionszeit verknüpft, wenn die Versuchsmäuse zuvor CSDS erfuhren (Terrillion et al., 2017b). Das Cav1.2 TS Mausmodell zeigte nur in einer verlängerten Version des Dreikammer-Box-Tests soziale Defizite auf (Bader et al., 2011), da in der Standardversion keine abweichende Soziabilität gemessen wurde (Bader et al., 2011; Kabitzke et al., 2018). Interessanterweise wurden in den

Studien, die auf *CacnalC*<sup>+/-</sup> Mäuse zurückgriffen, keine Veränderungen des Sozialverhaltens festgestellt (Bader et al., 2011; Dedic et al., 2018), was im Einklang mit den geringen Veränderungen des Sozialverhaltens der weiblichen *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten in Studie I steht.

Bezüglich affektiver Zustände konnte bei *CacnalC*<sup>+/-</sup> Mäusen ein erhöhter angsthäufiger Phänotyp bei weiblichen (Dao et al., 2010; Lee et al., 2012) und männlichen *CacnalC*<sup>+/-</sup> Mäusen gefunden werden (Bader et al., 2011; Lee et al., 2012). Auch ein Knockout von *CacnalC* spezifisch im Vorderhirn und im PFC ging mit einer gesteigerten Ängstlichkeit der Versuchstiere einher (Lee et al., 2012). Im Gegensatz dazu konnte beim Ca<sub>v</sub>1.2 TS Mausmodell keine Veränderung der Angstverhaltens gefunden werden (Bader et al., 2011). Die weiblichen *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten aus Studie I wiesen zwar in einer vorangegangenen EPM Untersuchung (eigene unpublizierte Daten) einen geringfügig erhöhten Angstphänotyp verglichen zu *CacnalC*<sup>+/+</sup> Tieren auf, dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die behavioralen Veränderungen aus Studie I nicht durch einen erhöhten Angstphänotyp verursacht wurden. Für diese Annahme spricht, dass die Emission von 22-kHz USV bei *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten nicht erhöht und auch das allgemeine Aktivitätsniveau nicht auffällig verringert war.

Drüber hinaus berichten mehrere unabhängige Studien einen antidepressiven Phänotyp bei *CacnalC*<sup>+/-</sup> Mäusen (Dao et al., 2010; Bavley et al., 2017; Kabir et al., 2017b; Dedic et al., 2018). Auch ein Knockout von *CacnalC* spezifisch im adulten PFC (Kabir et al., 2017b) und in glutamatergen Neuronen des Vorderhirns während der Entwicklung (Dedic et al., 2018) von Mäusen ist mit einem vergleichbaren antidepressiven Phänotyp assoziiert. Bezüglich des *CacnalC*<sup>+/-</sup> Rattenmodells liegen hingegen Hinweise vor, dass adulte *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten keinen antidepressiven Phänotyp (eigene unpublizierte Daten), sondern sogar einen erhöhten depressiven Phänotyp (Annuska Berz, unpublizierte Daten) aufweisen. Im Einklang damit stehen die Befunde des reduzierten affektiven Zustands von *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten aus Studie I.

Somit lässt sich ein Einfluss von *CacnalC* auf den affektiven Zustand von Nagetieren feststellen, was durch Studie I mit Hinweisen auf einen verringerten positiven affektiven Zustand bedingt durch die *CacnalC* Haploinsuffizienz erweitert wurde. In Anbetracht der vergleichsweise subtilen Veränderung des Sozialverhaltens der weiblichen *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten, ist die Wichtigkeit der Messung der 50-kHz USV Emission in der translationalen Forschung besonders zu betonen, da ohne die Messung des Rufverhaltens die Genotypeffekte auf den affektiven Zustand nur bedingt hätten aufgedeckt werden können.

#### 4.1.1 Studie I: Methodische Aspekte und Limitationen

Die in Studie I verwendete Technik lässt eine verlässliche Aufzeichnung der USV beider Tiere einer Dyade zu, was gleichzeitig einen Nachteil darstellen kann, weil so nicht direkt das individuelle Rufverhalten eines Tieres gemessen wird. Da aber in Studie I gezeigt werden konnte, dass auch in genotyp-gemischten Dyaden eine Reduktion der 50-kHz USV im Vergleich zu einer reinen Wildtypdyade vorliegt, kann daraus indirekt geschlossen werden, dass das jeweilige *Cacnal<sup>c</sup><sup>+/-</sup>* Tier dieser Dyade weniger vokalisierte. Nichtsdestotrotz wäre in Zukunft eine individuelle Detektion der 50-kHz USV in Gruppen von Tieren wünschenswert. Ein Lösungsansatz ist die Verwendung von mehreren Mikrofonen in Kombination mit Videoaufzeichnungen, wie es beispielsweise durch Heckman et al. (2017) beschrieben wird, um den Ort der Emissionsquelle zu messen. Durch dieses Vorgehen könnte auch die zeitliche Synchronisation von Verhalten und USV in Nagetiermodellen, wie in Studie I und weiteren Ansätzen gezeigt (Ferhat et al., 2016; Kisko et al., 2018), weiter verbessert werden, da dieser Ansatz ebenfalls der oben genannten Limitation unterliegt.

Darüber hinaus könnte in zukünftigen Studien eine zeitliche Verknüpfung der vier 50-kHz USV Ruftypen mit verschiedenen sozialen Verhaltensweisen, wie es Kisko et al. (2018) erstmalig beim Spielverhalten juveniler Ratten durchgeführt haben, vorgenommen werden, um weitere Einblicke in die Funktion der 50-kHz USV bei adulten Ratten zu liefern. Die zeitlich sehr aufwendige Auswertung der Ruftypen könnte in Zukunft durch die Verwendung von automatisierten Analysesansätzen, die auf maschinellem Lernen basieren (siehe beispielsweise: Coffey et al., 2019), deutlich vereinfacht und beschleunigt werden. So ließen sich Klassifikationsansätze ökonomisch auf vorhandene Datensätze anwenden und die Reliabilität und Validität verschiedener 50-kHz USV Subtypen überprüfen.

Des Weiteren könnten in zukünftigen Studien der Einfluss der *Cacnal<sup>c</sup>* Haploinsuffizienz auf das Sozialverhalten von adulten männlichen Ratten und im zwischengeschlechtlichen Sozialkontakt untersucht werden, um die bestehenden geschlechtsspezifischen Effekte, die im juvenilen Alter berichtet werden (Kisko et al., 2019), auch in späteren Altersstufen nachzuweisen.

In Anbetracht der Präferenz der *Cacnal<sup>c</sup><sup>+/-</sup>* Ratten für Partner des gleichen Genotyps bieten sich zudem zukünftige Playbackstudien unter Verwendung von 50-kHz USV Rufmaterial, das von *Cacnal<sup>c</sup><sup>+/-</sup>* oder *Cacnal<sup>c</sup><sup>+/+</sup>* Ratten stammt, an, um diese Präferenz zu validieren. Bei den bisher durchgeführten Playback Studien an juvenilen *Cacnal<sup>c</sup><sup>+/-</sup>* Ratten, die ein verringertes Annäherungsverhalten in diesem Paradigma zeigten (Kisko et al., 2018, 2019), wurde als Stimulusmaterial 50-kHz USV verwendet, welche von adulten männlichen Wistar-Ratten

stammten (Seffer et al., 2014). Ein Variation der aufgenommen 50-kHz USV hinsichtlich Faktoren wie Genotyp, Geschlecht oder Züchtungsstamm könnten wertvolle Erkenntnisse im Kontext des Kommunikationsverhaltens von Ratten liefern (Wöhr et al., 2016) und die Präferenz der *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Ratten für Tiere des gleichen Genotyps untermauern.

#### 4.2 Studie II: *Cacnal1c* und adulte hippocampale Neurogenese bei Ratten

Die Ursachen der behavioralen Veränderungen in Folge einer *Cacnal1c* Haploinsuffizienz bei Nagetieren sind weitgehend unerforscht. Wie Kabir et al. (2016) in ihrer Übersichtsarbeit ausführen, könnte eine Dysregulation des PFC-Amygdala-Hippocampus Netzwerkes ausschlaggebend sein, da eine Störung dieses Systems als pathophysiologischer Mechanismus bei der Entstehung neuropsychiatrischer Erkrankungen angenommen wird (Erk et al., 2014b). Um dieses System bei *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Ratten genauer zu beleuchten, wurden in Studie II insgesamt zwei Untersuchungen vorgenommen. In Untersuchung 1 wurde die Neurogenese im adulten Hippocampus fokussiert, während in Untersuchung 2 hirnanatomische Analysen durchgeführt wurden.

Zur Dysregulation des erwähnten Netzwerkes könnte eine veränderte AHN beitragen, da diese bereits mit vielen krankheitsrelevanten Phänotypen assoziiert wurde (Kabir et al., 2017c) und eine direkte Verbindung der hippocampalen Neurogenese zum Sozialverhalten besteht (Holmes, 2016; Anacker et al., 2018). Die AHN als mehrstufiger Prozess ist ein Zusammenspiel aus Proliferation und Zellüberleben junger Nervenzellen (Kuhn et al., 2018) und vorangegangene Studien konnten in der Tat einen negativen Einfluss von *Cacnal1c* Veränderungen auf die unterschiedlichen Stufen der AHN in *Cacnal1c* Nagetiermodellen nachweisen (zur Übersicht siehe: Moon et al., 2018). Auch in Anbetracht der stark reduzierten 50-kHz USV Emission der weiblichen *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Ratten aus Studie I und des Zusammenspiels von USV und der Proliferation im adulten Hippocampus (Wöhr et al., 2009) bot sich die Untersuchung der AHN bei adulten weiblichen *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacnal1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren in Studie II an.

Um den komplexen Prozess der AHN differenzierter zu betrachten, wurde in Untersuchung 1 eine Variation des Perfusionszeitpunktes nach der Injektion des exogenen Markers BrdU durchgeführt, um sowohl proliferative Vorgänge als auch Reifung und Überleben von Nervenzellen zu erfassen. Neben einer immunhistochemische Färbung der BrdU<sup>+</sup> Zellen wurden zwei weitere endogenen Zellmarker, d. h. Ki-67 und NeuN, verwendet, um den neuronalen Phänotyp der neu entstandenen Zellen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten im DG des Hippocampus durch eine dreifache Fluoreszenzfärbung abzusichern. Durch die

Verwendung zweier Perfusionszeitpunkte sollte zudem eine Validierung der Erhebung der AHN durch BrdU erreicht werden, da zum zweiten Perfusionszeitpunkt eine Reduktion der BrdU<sup>+</sup> Zellen erwartet wurde (Pieper et al., 2010). Diese Verringerung von BrdU<sup>+</sup> Zellen konnte in Untersuchung 1 festgestellt werden, was die Validität des gewählten Vorgehens bestätigte.

Im Allgemeinen konnte in Untersuchung 1 kein Einfluss der *Cacnalc* Haploinsuffizienz auf die AHN nachgewiesen werden, da keine Unterschiede in der Anzahl der BrdU<sup>+</sup> Zellen im Hippocampus erwachsener weiblicher *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren gefunden wurden. Die Proliferationsraten zeigten sich vom Genotyp der Versuchstiere nicht beeinflusst, da die Anzahl der Ki-67<sup>+</sup> Zellen und der doppelmarkierten Ki-67<sup>+</sup> und BrdU<sup>+</sup> Zellen bei weiblichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren vergleichbar war. Im Gegensatz dazu fanden Moon et al. (2018) jedoch eine reduzierte Anzahl an BrdU<sup>+</sup> Zellen nach einer Einzelinjektion von BrdU sechs Stunden vor Perfusion bei männlichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten, was laut der Autoren für eine reduzierte Proliferation sprach.

Auch in Bezug auf die unreife Neuronen zeigte sich in Untersuchung 1, dass sich die Anzahl der BrdU<sup>+</sup> Zellen bei erwachsenen weiblichen Ratten nicht signifikant zwischen den Genotypen unterschieden. An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass durch die wiederholte Injektion von BrdU über fünf Tage hinweg nicht nur unreife Zellen markiert, sondern auch Zellen in frühen proliferativen Prozessstufen der AHN detektiert wurden. Interessanterweise decken sich die Ergebnisse aus Untersuchung 1 mit den Befunden von Moon et al. (2018), die berichten, dass die Anzahl unreifer Nervenzellen, gemessen mittels DCX, vergleichbar zwischen adulten männlichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren war. Moon et al. (2018) erklärten ihre abweichenden Ergebnisse der reduzierten Proliferation und vergleichbaren Anzahl unreifer Neurone durch Kompensationsmechanismen, die auf einer reduzierten Apoptose und einem verbesserten Zellüberleben basieren.

Darüber hinaus wurde in Untersuchung 1 das Überleben junger hippocampaler Nervenzellen untersucht, was meines Wissens bisher noch nicht beim *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Rattenmodell durchgeführt wurde. Da sich weder die Anzahl der BrdU<sup>+</sup> Zellen noch der doppelmarkierten BrdU<sup>+</sup> und NeuN<sup>+</sup> Zellen 21 Tage nach der letzten BrdU Injektion zwischen den Genotypen unterschieden, kann auf vergleichbare Überlebensraten junger Neurone von weiblichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren geschlossen werden. Dies ist gegenläufig zu den vorherigen Befunden von Lee et al. (2016), die bei männlichen Vorderhin-spezifischen *Cacnalc* Knockout Mäusen ein reduziertes Überleben hippocampaler Nervenzellen über einen Zeitraum von 30 Tagen nach einer einmaligen BrdU Injektion fanden. Die Autoren gaben außerdem an, dass

dieser spezifische *Cacnalc* Knockout mit einer geringeren Anzahl unreifer DCX<sup>+</sup> Neuronen verbunden war. Des Weiteren griffen die Autoren zur Messung unreifer Zellen, wie in Studie II, auf eine täglichen Injektion von BrdU über fünf Tage zurück und fanden eine reduzierte Gesamtzahl unreifer BrdU<sup>+</sup> Zellen bei Vorderhin-spezifische *Cacnalc* Knockout Mäusen, was im Gegensatz zu den negativen Befunden im *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Rattenmodell von Moon et al. (2018) und Untersuchung 1 steht.

Interessanterweise berichten Lee et al. (2016) vergleichbare hippocampale Proliferationsraten, wie durch eine kongruente Anzahl BrdU<sup>+</sup> Zellen im Hippocampus von Vorderhin-spezifischen *Cacnalc* Knockout Mäusen und Wildtyptieren eine Stunde nach einer einzigen BrdU Injektion nachgewiesen wurde. Dies wiederum steht im Einklang zu den Ergebnissen der unveränderten Proliferation aus Untersuchung 1.

In einem weiteren Mausmodell wiesen Temme et al. (2016) eine reduzierte Anzahl unreifer Nervenzellen, gemessen durch die Marker BrdU (tägliche Injektion über fünf Tage, Perfusion 24 Stunden nach letzter Injektion) und DCX, im Hippocampus von neuronspezifischen *Cacnalc* Knockout Mäusen nach. Auch führte eine Deletion von *Cacnalc* auf astrozyten-ähnlichen neuronalen Stammzellen bei Mäusen zu einer verminderten Zellproliferation, gemessen mittels Ki-67<sup>+</sup> Zellen und einem BrdU-basierten Untersuchungsansatz mit Injektionen 24, 18 und 12 Stunden vor Perfusion, während sich die Anzahl unreifer DCX<sup>+</sup> Neuronen nicht zwischen den Genotypen unterschied (Völkening et al., 2017).

Zusätzlich wurde in Untersuchung 1 eine ausführliche Auswertung der AHN entlang der hippocampalen dorso-ventralen Achse durchgeführt, um den funktionellen Unterschieden der adulten Neurogenese gerecht zu werden (Kheirbek und Hen, 2011; Anacker und Hen, 2017). Eine getrennte Betrachtung der dorsalen und ventralen Areale wurde in den bisherigen Studien zum Einfluss von *Cacnalc* auf die AHN in den Nagetiermodellen meines Wissens noch nicht durchgeführt (Lee et al., 2016; Temme et al., 2016; Völkening et al., 2017; Moon et al., 2018). Dennoch trat auch nach diesen detaillierten Analysen von Untersuchung 1 kein Einfluss der *Cacnalc* Haploinsuffizienz auf die AHN bei adulten weiblichen Ratten zu Tage.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Auswirkungen von *Cacnalc* auf die AHN im *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Rattenmodell vergleichsweise subtil erscheinen, während bei *Cacnalc* Mausmodellen, die sich durch schwerwiegendere genetische Manipulationen, z. B. Deletion von *Cacnalc* auf beiden Allelen, auszeichnen, deutlich ausgeprägtere Effekte, vor allem auf die Anzahl unreifer Neurone, beobachtet wurden. Einschränkend soll an dieser Stelle angemerkt werden, dass diese Mausmodelle durch die zell- und regionsspezifischen *Cacnalc* Manipulationen mechanistisch zwar höchst interessant sind, aber auf translationaler Ebenen das

konstitutive *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodell mit seiner gesteigerten Konstruktvalidität vorzuziehen ist. Beim Menschen ist der gesamte Organismus durch *CACNA1C* Mutationen betroffen, welche oft eine partielle Deletion verursachen, was deutlich besser durch das *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodell abgebildet wird.

Die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse der Untersuchung 1 im Vergleich zu den vorherigen Untersuchungen (Lee et al., 2016; Temme et al., 2016; Völkening et al., 2017; Moon et al., 2018) können durch unterschiedliche Faktoren bedingt sein. Zunächst soll auf methodische Limitationen hingewiesen werden, da die Ergebnisse der *Cacna1c* Mausmodelle (Lee et al., 2016; Temme et al., 2016) und des *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodells (Moon et al., 2018) auf einfachen immunohistochemischen Markierungen basierten und somit der neuronale Phänotyp der detektierten Zellen hinterfragt werden sollte. Durch den Verzicht auf die Verwendung endogener Marker kann daher in diesen Studien zwar darauf geschlossen werden, dass die Anzahl der Zellen an sich reduziert ist, aber eine Unterscheidung zwischen Nerven- und Gliazellen ist in diesen Studien nicht verlässlich möglich.

Im direkten Vergleich der abweichenden Ergebnisse von Untersuchung 1 und Moon et al. (2018), die beide das *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodell fokussierten, soll außerdem auf die Fähigkeiten der Marker, die unterschiedliche Stadien der Zellentwicklung zu markieren, hingewiesen werden. Das in Untersuchung 1 verwendete Ki-67 zur Messung der proliferativer Vorgänge wird während der gesamten Dauer des Zellzyklus mit Ausnahme der Ruhephase exprimiert (von Bohlen und Halbach, 2011). BrdU hingegen wird nur während der Synthese-Phase des Zellzyklus in die DNA aufgenommen (Kempermann, 2011a). Die BrdU-basierten Befunde von Moon et al. (2018) könnten daher sehr frühe Proliferationsdefizite widerspiegeln, die aufgrund der von den Autoren vorgeschlagenen Kompensationsechanimsen von vergleichsweise breiteren Markern wie Ki-67 oder DCX nicht aufgedeckt werden können. Hier würde sich eine Untersuchung der frühen Proliferation (Typ 1 Zellen) durch den Marker GFAP in zukünftigen Studien anbieten (Abbildung 2B).

Des Weiteren sind auch geschlechtsspezifische Mechanismen im Kontext der AHN zu nennen (zur Übersicht siehe: Shohayeb et al., 2018), da Moon et al. (2018) adulte Männchen untersuchten, wohingegen in Untersuchung 1 weibliche Versuchstiere fokussiert wurden. Von potenzieller Relevanz für geschlechtsabhängige Effekte ist das Steroidhormon Östradiol, das Einfluss auf die Zellproliferation über Östrogenrezeptoren (ER) nimmt, die von den Vorläuferzellen des DG exprimiert werden (Mazzucco et al., 2006). Die durch Östradiol induzierte Proliferation im Hippocampus kann durch ER-Agonisten gesteigert und ER-Antagonisten gehemmt werden (Nagy et al., 2005; Mazzucco et al., 2006). Interessanterweise

beeinflusst Östradiol den schnellen Calciumeinstrom über  $Ca_v1.2$  in kultivierte hippocampale Neurone direkt über die Dihydropyridin Bindungsstelle, welches für Neuroprotektion und LTP von Bedeutung ist (Sarkar et al., 2008; Duncan et al., 2010). Brewer et al. (2009) konnten zudem nachweisen, dass eine Östradiolbehandlung den altersbedingten Anstieg des  $Ca_v1.2$  vermittelten Calciumeinstroms in hippocampale Neurone verhinderte. Der altersbedingte Anstieg der Aktivität von LTCC wird als ein Biomarker für die Gehirnalterung angesehen (Thibault et al., 2007). Da in Studie II auf adulte weibliche Ratten zurückgegriffen wurde, könnten protektiven Effekte von Östradiol auf die Funktionsfähigkeit von  $Ca_v1.2$  angenommen werden. Daher wäre es weiterhin von Interesse, ob sich die bekannten Defizite der LTP, die Dedic et al. (2018) nach einem Neuron-spezifischem *Cacnalc* Knockout bei Mäusen fanden, ebenfalls im *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Rattenmodell replizieren lassen und diese veränderte LTP in Abhängigkeit des Geschlechts aufzudecken ist.

Da der Hippocampus an wichtigen kognitiven Prozessen involviert (Fanselow und Dong, 2010) und die adulte Neurogenese mit dem RL assoziiert ist (Kalm et al., 2013; Yau et al., 2015), ist zudem eine Betrachtung der kognitive Performanz des *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Rattenmodells von Relevanz, da es auch in diesem Fall abweichende Befunde gibt (Braun et al., 2018; Sykes et al., 2018b). Während die Arbeitsgruppe um Hall bei männliche *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten eine Beeinträchtigung des RL (Sykes et al., 2018b) und die oben erwähnte verringerte Neurogenese (Moon et al., 2018) ermittelte, konnte im Kontext der FOR2107 ein intaktes RL bei weiblichen und männlichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten (Braun et al., 2018) und eine unveränderten AHN bei weiblichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten in Studie II festgestellt werden. Braun et al. (2018) berichten sogar positive Auswirkungen auf unterschiedliche Domänen des räumlichen Gedächtnis der *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten im Vergleich zu *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren. Interessant erscheint, dass sich die Ergebnisse auf das gleiche *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Rattenmodell beziehen und innerhalb der Arbeitsgruppen konsistent sind, aber zwischen den unterschiedlichen Laboren keine Replikation des Genotypeffekts auf die kognitive Leistung und adulte Neurogenese gefunden werden konnte. Dies mag zum einen durch methodische Unterschiede erklärt werden, zum anderen könnten sich grundlegende Faktoren wie Zucht- und Haltungsbedingungen unterscheiden. Vor allem die Messung der AHN war in Studie II im Vergleich zu Moon et al. (2018) deutlich umfangreicher, da zur Absicherung der Validität der Befunde eine mehrfache Fluoreszenzfärbung durchgeführt wurde.

Ein interessanter Zusammenhang besteht zwischen der AHN und dem sozialen Status von Ratten, da Kozorovitskiy und Gould (2004) bei männlichen Ratten eine erhöhte Neurogenese, d. h. gesteigertes Überleben adulter hippocampaler Neurone, fanden, wenn die Versuchstiere

die Rolle des dominanten Tieres in einer Gruppe innehatten. In Anbetracht des erhöhten Dominanzverhaltens der *CacnalC*<sup>+/-</sup> Weibchen in Studie I könnte spekuliert werden, dass daher die AHN in Studie II im Sinne eines „Schutzfaktors“ nicht durch den Genotyp beeinflusst wurde. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte zukünftig der Dominanzstatus jedes Versuchstieres innerhalb eines Haltungskäfigs erhoben werden.

Insgesamt ist das *CacnalC*<sup>+/-</sup> Rattenmodell relativ neu und gibt es noch wenig publizierte Befunde im Kontext der adulten Neurogenese. Zukünftige Studien sollten daher die bekannten geschlechtsspezifischen Effekte von *CacnalC* (Dao et al., 2010; Braun et al., 2018; Kisko et al., 2019) auf die adulte Neurogenese im Hippocampus von Ratten unter Berücksichtigung der verschiedenen Neurogeneseprozesse untersuchen.

#### **4.2.1 *CacnalC* und strukturelle Veränderungen des Gehirns von Ratten**

In Anbetracht der postulierten Dysregulation des PFC-Amygdala-Hippocampus Netzwerks (Kabir et al., 2016) und der bekannten Einflüsse von *CACNA1C* auf strukturelle Eigenschaften des Gehirns (Kempton et al., 2009; Wang et al., 2011a; Dietsche et al., 2014; Soeiro-de-Souza et al., 2017) wurden in Untersuchung 2 der Studie II detaillierte volumetrische Analysen des dHCs und mPFCs durchgeführt, um den Einfluss der *CacnalC* Haploinsuffizienz auf die Hirnstruktur von weiblichen adulten Ratten zu untersuchen. Diese Strukturen sind von besonderer Relevanz, da Ca<sub>v</sub>1.2 ausgeprägt im mPFC und Hippocampus exprimiert wird (Schlick et al., 2010; Kabir et al., 2017c) und *CacnalC* Boten-RNA (engl. „Messenger RNA“; mRNA) vor allem im mPFC und dem DG des Hippocampus aufzufinden ist (Sykes et al., 2018a). Auch sind diese Hirnstrukturen bei vielen kognitiven, sozialen und emotionalen Prozessen involviert (Kabir et al., 2016).

In Untersuchung 2 unterschied sich das Volumen des dHC und verschiedener hippocampaler Substrukturen nicht signifikant zwischen weiblichen *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten und *CacnalC*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren. Auch in den Substrukturen DG und Hilus, in denen die AHN stattfinden, konnten keine Volumenunterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Mausmodelle mit einer defizitären AHN weisen häufig Veränderungen der Morphologie des Hippocampus auf (Pieper et al., 2005), daher ist die strukturelle Untersuchung des Hippocampus von besonderer Bedeutung. Trotz Veränderungen der hippocampalen Neurogenese fanden weder Lee et al. (2016) noch Temme et al. (2016) Veränderungen der Volumina des Hippocampus in *CacnalC* Mausmodellen. Auch Moon et al. (2018) konnten keine Größenunterschiede des DG zwischen männlichen *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten und *CacnalC*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren aufdecken, was sich mit den Ergebnissen der Studie II deckt.

Interessanterweise berichten Marschallinger et al. (2015), dass eine Deletion von *Cacnald* ( $Ca_v1.3$ ) eine verringerte AHN verursachte, die von einem verringerten Volumen des DG begleitet wurde. Wie Lee et al. (2016) daraus schlussfolgerten, könnte  $Ca_v1.3$  daher einen Einfluss auf die hippocampale Neurogenese und somit auf das Hippocampusvolumen während pre- und postnataler Entwicklungsstufen haben, während  $Ca_v1.2$  eine spezifische Rolle bei der Regulation der AHN im adulten Gehirn spielt und somit die Morphologie des Hippocampus weniger beeinflusst. Weitere strukturelle Untersuchungen des Hippocampus wurde bei den *Cacnalc* Nagetiermodellen bisher meines Wissens nach nicht durchgeführt, was in Anbetracht der bekannten Hippocampusatrophie bei affektiven Erkrankungen verwunderlich ist (Campbell et al., 2004; Cole et al., 2011).

In Bezug auf präfrontale Hirnstrukturen konnten bildgebende Studien strukturelle Veränderungen insbesondere im mPFC im Zusammenhang mit *CACNA1C* aufzeigten werden, da bei Trägern des Risikoallels rs1006737 ein erhöhtes Volumen der grauen Substanz im ACC (Wang et al., 2011a) und bei euthymen BDP Patientinnen mit dem Risikoallel rs1006737 eine altersabhängige Verdünnung des ACC gefunden wurde (Soeiro-de-Souza et al., 2017). In Untersuchung 2 wurde das Volumen des mPFC im *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten untersucht, da auch Veränderungen des mPFCs zu einer Dysfunktion des PFC-Amygdala-Hippocampus Netzwerkes (Kabir et al., 2016) beitragen könnten. Auch wird dem mPFC eine wichtige Rolle bei der Modulation des Sozialverhaltens von Nagetieren beigemessen (Quirk und Beer, 2006; Ko, 2017), daher ist diese Struktur von besonderer Relevanz.

Die Analysen der Untersuchung 2 zeigten keine Unterschiede des Volumens des mPFCs zwischen weiblichen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren. Weiterhin zeigte sich kein Einfluss der *Cacnalc* Haploinsuffizienz auf die Substrukturen des mPFCs. Beispielsweise konnten keine Volumenunterschiede des cingulären Cortex zwischen *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren festgestellt werden, dessen Rolle im Zusammenhang mit *Cacnalc* beim Beobachtungslernen bekannt ist (Jeon et al., 2010). Die Befunde von Untersuchung 2, dass die partielle *Cacnalc* Depletion keinen Einfluss auf das Volumen des mPFCs und dHCs hat, deckt sich hingegen auf behavioraler Ebene mit dem unveränderten RL und räumlichen Gedächtnis der *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten (Braun et al., 2018).

Zusammenfassend lässt sich durch Untersuchung 2 feststellen, dass die *Cacnalc* Haploinsuffizienz keine auffälligen strukturellen Veränderungen des Gehirn von weiblichen Ratten verursacht. Die visuelle Inspektion der Hirnschnitte gab keine Hinweise darauf, dass andere Hirnstrukturen, wie Corpus callosum (Cc) oder ventrikuläres System, Abweichungen aufwiesen oder gar fehlten. Bisher wurde nach meinem Kenntnisstand keine Untersuchung

diverser Hirnstrukturen für die *Cacnalc* Nagetiermodellen vorgenommen, was in Anbetracht der diskutierten Dysfunktion des PFC-Amygdala-Hippocampus Netzwerks bei neuropsychiatrischen Störungen überraschend ist (Kabir et al., 2016) und die Wichtigkeit von Untersuchung 2 herausstellt.

Translational betrachtet stehen die Ergebnisse von Untersuchung 2 zwar zum Teil in Widerspruch zu den strukturellen Veränderungen, die durch Bildgebungsstudien bei *CACNA1C* Risikoallelträgern nachgewiesen werden konnten (Wang et al., 2011a; Dietsche et al., 2014; Soeiro-de-Souza et al., 2017), dennoch weichen auch die Ergebnisse der Humanuntersuchungen voneinander ab. So berichteten zum Beispiel Tesli et al. (2013), dass es keinen Einfluss des Risikoallels rs1006737 auf die frontale kortikale Dicke und das Volumen des Hippocampus bei BP und SCZ Patienten gab, was sich mit den Ergebnissen von Untersuchung 2 deckt.

Um die behavioralen Veränderungen des *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Rattenmodells zu erklären, kommen unabhängig von AHN weitere potenzielle biologische Prozesse und molekulare Signalwege in Betracht (Kabir et al., 2017c), die in zukünftigen Studien untersucht werden sollten, um ein besseres Verständnis dieser Verhaltensdefizite zu gewinnen. Die bisherigen Studien weisen daraufhin, dass *Cacnalc* einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Hirnmorphologie hat und spezifischere Untersuchungen von Nöten sind. Beispielsweise sollte in Anbetracht der defizitäre LTP im Hippocampus nach einem Knockout von *Cacnalc* bei Mäusen (Dedic et al., 2018) dieser Mechanismus ebenfalls beim *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Rattenmodell untersucht werden.

Durch Züchtungsansätze wurde interessanterweise nachgewiesen, dass Ratten, die spezifisch für eine geringe Emission von 50-kHz USV gezüchtet wurden, neben einem abweichenden Sozialverhalten vor allem eine veränderte *Cacnalc* Genexpression im mPFC und NAc aufwiesen (Moskal et al., 2011; Burgdorf et al., 2013). Im Detail betrachtet war die Expression von *Cacnalc* im mPFC von den wenig vokalisierenden Ratten signifikant verringert (Moskal et al., 2011). Die Autoren zeigten in ihrer Studie auf korrelativer Ebene einen Zusammenhang von *Cacnalc* mit Defiziten der 50-kHz USV Kommunikation auf. Da sich das *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Rattenmodell durch eine verringerte Expression von *Cacnalc* in kortikalen Arealen auszeichnet (Kisko et al., 2018, 2019), konnte in Studie I weiterhin ein kausaler Zusammenhang zwischen Sozialverhalten und der *Cacnalc* Haploinsuffizienz bei Ratten hergestellt werden. Weitere neurobiologische Messungen zeigten, dass eine partielle *Cacnalc* Depletion *in vitro* mit einer erhöhten mitochondrialen Resistenz gegen oxidativen Stress assoziiert ist (Michels et al., 2018b, 2018a), was darauf hinweist, dass weitere biologische Prozesse durch *Cacnalc* beeinflusst werden und daher von Interesse sind.

#### 4.2.2 Studie II: Methodische Aspekte und Limitationen

Eine Herausforderung von Untersuchung 1 bestand darin, den transienten Prozess der adulten Neurogenese im Hippocampus durch die Wahl adäquater Zellmarker verlässlich darzustellen. Durch die Wahl einer Dreifachmarkierung, d. h. der exogene Marker BrdU und die beiden endogenen Marker Ki-67 und NeuN, konnte nicht nur der neuronale Phänotyp, sondern gleichzeitig verschiedene Entwicklungsstufen der neu entstandenen Zellen abgebildet werden, was dem geforderten Vorgehen einer Mehrfachmarkierung von Kuhn et al. (2018) entspricht. Die Validität der Messungen von Untersuchung 2 lässt sich durch den Abgleich der Ergebnisse der verschiedenen Marker unabhängig vom Genotyp der Versuchstiere bewerten. Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen Perfusionszeitpunkten kann der Zeitverlauf der Expression der drei verwendeten Zellmarker dargestellt werden, was ebenfalls zur Abschätzung der Validität dienen kann.

Im Allgemeinen konnte ein Rückgang der BrdU<sup>+</sup> Zellen von ungefähr 50 % zwischen den beiden Perfusionszeitpunkten festgestellt werden, was in Übereinstimmung mit Pieper et al. (2010) steht, die zeigen konnten, dass die Hälfte neu entstandener BrdU<sup>+</sup> Zellen 20 Tage nach einer einzigen BrdU Injektion starben. Der signifikante Anstieg der doppelt markierten BrdU<sup>+</sup> und NeuN<sup>+</sup> Zellen zwischen den Zeitpunkten der Perfusion steht ebenfalls im Einklang mit früheren Ergebnissen, dass drei Tage nach einer einmaligen BrdU-Injektion eine beträchtliche Anzahl von BrdU<sup>+</sup> und NeuN<sup>+</sup> Zellen gefunden werden konnte (Kempermann, 2011c) und die Doppelmarkierung beider Zellmarker circa zwei Wochen nach einer BrdU-Injektion einen Höchststand erreicht (Snyder et al., 2009a).

Zur Messung der Proliferation wurde Ki-67 verwendet und zu beiden Zeiten der Perfusion konnte eine vergleichbare Anzahl an Ki-67<sup>+</sup> Zellen gemessen werden, was die Validität unserer Analyse unterstreicht, da keine größeren Veränderungen der Proliferation innerhalb von 21 Tagen zu erwarten waren (Fu et al., 2014; Snyder, 2019). Zusätzlich konnte in Untersuchung 1 der neuronale Ursprung der proliferativen Zellen überprüft werden, da die Anzahl der doppelt markierten Ki-67<sup>+</sup> und BrdU<sup>+</sup> Zellen nur zum ersten Perfusionszeitpunkt substantiell vorhanden war. Dieser Effekt war zu erwarten, da Ki-67 nur in frühen Entwicklungsstadien der Neurogenese exprimiert wird (Kee et al., 2002; Mandyam und Koob, 2012).

Des Weiteren wurde die AHN in dorsalen und ventralen Teilen des Hippocampus analysiert. Durch dieses Vorgehen konnten die bereits bekannten quantitativen Unterschiede mit einer gesteigerten Neurogenese im dorsalen Bereichen des Hippocampus repliziert werden (Snyder et al., 2009b; Jinno, 2011), was für die Validität der gewählten Marker spricht. Es lässt sich daher feststellen, dass die Erhebung der AHN durch die verwendeten Zellmarker als valide

anzusehen ist und die AHN im *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodell somit deutlich präziser im Vergleich zu Moon et al. (2018) dargestellt wurde.

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass der Einsatz von BrdU zur Markierung von Zellen mit einigen Herausforderungen verbunden ist. BrdU besitzt nicht nur die Eigenschaft die Synthese-Phase des Zellzyklus zu markieren, sondern es kann als Analogon des Nukleosids Thymidin auch die allgemeine DNA-Synthese kennzeichnen (von Bohlen und Halbach, 2011). Die DNA-Synthese tritt auch während der DNA-Reparatur oder der Genduplikation auf (Taupin, 2007). Auch können postmitotische Zelle während der Apoptose nach Hirnverletzungen wieder in den Zellzyklus eintreten und so BrdU exprimieren (Kuan et al., 2004). Die Versuchstiere aus Studie II wurden in Gruppen in Standardkäfigen gehalten und keinen aversiven Paradigmen ausgesetzt, daher können apoptotische Prozesse vermutlich ausgeschlossen werden. Durch die Verwendung endogener Marker zur Mehrfachmarkierung der BrdU<sup>+</sup> Zellen lassen sich zudem Apoptoseprozesse gut kontrollieren, so dass davon auszugehen ist, dass Fehlmarkierungen von Zellen vermieden werden konnten.

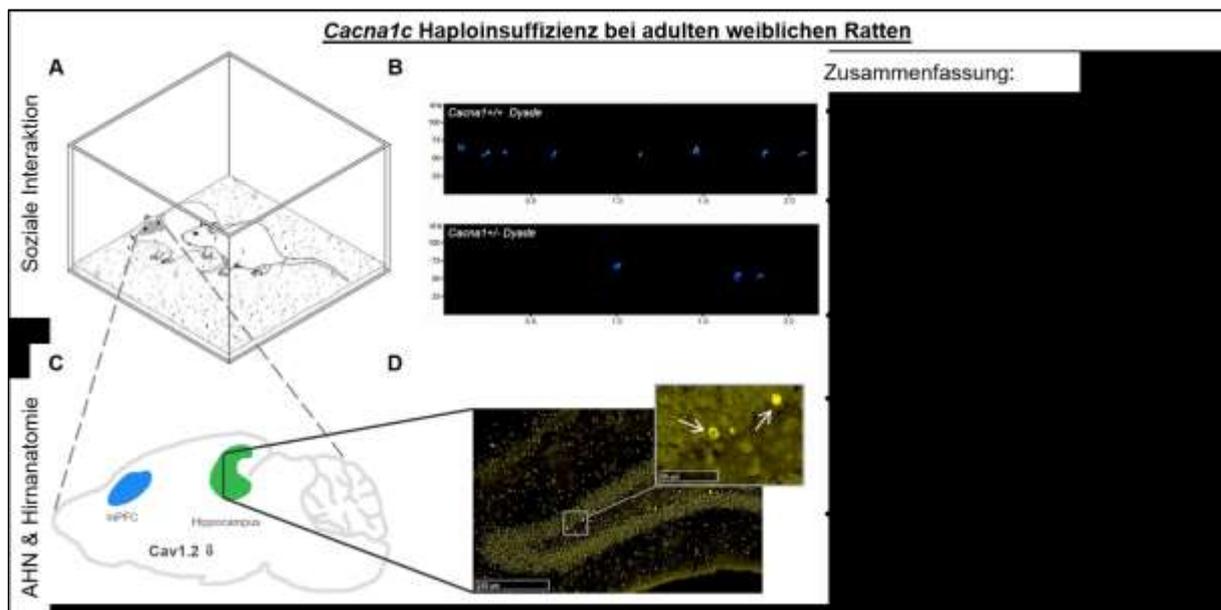
Des Weiteren hat BrdU in Abhängigkeit seiner Dosierung selbst toxische und mutagene Eigenschaften (Taupin, 2007), da hohe BrdU-Dosierungen von bis zu 600 mg/kg Körpergewicht neuronalen Zelltod während der embryonalen und neonatalen Entwicklung zur Folge haben (Biggers et al., 1987; Nagao et al., 1998). Diverse Studien konnten hingegen nachweisen, dass Dosierungen von BrdU zwischen 50 und 150 mg/kg Körpergewicht keinen negativen Einfluss auf Verhalten und Proliferation bei adulten Nagetiere ausüben (Taupin, 2007; Kempermann, 2011b) und daher zur Messung der AHN verwendet werden können (Hancock et al., 2009).

Ein Vorteil von Untersuchung 1 war die Erstellung von digitalen Bildern der gesamten Fläche der Objektträger mit einem Immunfluoreszenzscanner. So war es möglich, eine große Anzahl an Hippocampi bzw. deren Schnittebenen zu analysieren und die Datensätze für spätere Analysen durch die Digitalisierung zu erhalten, da Immunfluoreszenzfärbungen bei wiederholter Beleuchtung zum Ausbleichen tendieren (Mahmoudian et al., 2011). Durch die Verwendung des Computerprogrammes ORBIT, welches eine automatisierte Bildauswertung basierend auf dem Maschinlernen erlaubt (Stritt et al., 2011; Seger et al., 2018), konnte eine reliable Quantifizierung der Zellen im DG des Hippocampus durchgeführt werden. In zukünftigen Studien sollte zur Auswertung der Immunfluoreszenzdaten dennoch zusätzlich auf die konfokale Mikroskopie zurückgegriffen werden, da diese Technik weitere Vorteile, wie beispielsweise die Einbeziehung dreidimensionaler Informationen, ermöglicht (Kempermann, 2011b).

Die funktionelle Assoziation zwischen der Neurogenese im adulten Hippocampus und diverser Verhaltensweisen ist als gesichert anzusehen (Gonçalves et al., 2016; Holmes, 2016; Anacker und Hen, 2017; Toda et al., 2018) und zukünftige Studien sollten auch im *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodell diese Verknüpfung herstellen. In Anbetracht der veränderte 50-kHz USV in Studie I und dem bekannten Zusammenhang der Proliferation und 50-kHz USV (Wöhr et al., 2009) ist dies von besonderem Interesse. Erste explorative Ansätze zur korrelativen Verknüpfung behavioraler Ergebnisse mit der AHN zeigten keine signifikanten Zusammenhänge (eigene unpublizierte Daten). Dies lässt sich durch das experimentelle Vorgehen erläutern, da die bisherigen Studie unabhängig voneinander geplant wurden, wodurch eine Verknüpfung erschwert wurde.

### 4.3 Zusammenfassung des Phänotyps adulter weiblicher *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten

Die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit (Abbildung 3) liefern Hinweise darauf, dass die *Cacna1c* Haploinsuffizienz zu einer reduzierten 50-kHz USV Emission und leichten sozialen Defiziten während der direkten sozialen Interaktion von adulten weiblichen *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten führt. Da die Emission von 50-kHz USV hauptsächlich während nicht-sozialer Verhaltensweisen verringert war, ist davon auszugehen, dass eine Reduktion des positiven affektiven Zustandes der weiblichen *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten vorliegt. Zusätzlich zeigten weibliche *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten erhöhtes repetitives Verhalten, was für einen ASD-ähnlichen Phänotyp spricht.



**Abbildung 3:** Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Dissertation. (A) Direkte reziproke soziale Interaktionsverhalten von adulten weiblichen *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Ratten und *Cacna1c*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren. (B) Repräsentative Spektrogramme von 50-kHz USV, die von *Cacna1c*<sup>+/+</sup> und *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Dyaden aufgenommen wurden. (C) Graphische Übersicht der untersuchten Hirnstrukturen. (D) Beispielhafte Darstellung der Neurogenese im Gyrus dentatus des Hippocampus. Die Vergrößerung zeigt BrdU<sup>+</sup> Zellen, welche durch weiße Pfeile markiert wurden.

Zeitgleich konnten in diesem Dissertationsprojekt auf neurobiologischer Ebene keine auffälligen Veränderungen der Neurogenese im Hippocampus und der Hirnanatomie adulter weiblicher *Cacnal<sup>c</sup>*<sup>+/-</sup> Ratten festgestellt werden. Eine Replikation der bisherigen Befunde zur verringerten AHN bei *Cacnal<sup>c</sup>* Maus- und Rattenmodellen konnte somit nicht erreicht werden. In Anbetracht der bekannten behavioralen Veränderungen und der Befunde einer veränderten Neurogenese der bisherigen *Cacnal<sup>c</sup>* Maus- und Rattenstudien ist die Wichtigkeit des Einbezugs weiblicher Versuchstiere hervorzuheben. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die geschlechtsabhängigen Effekte von *Cacnal<sup>c</sup>* und lassen weitere neurobiologische Veränderungen, welche unabhängig von der AHN sind, vermuten.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass vor allem behaviorale Abweichungen des Verhaltens bestehen, die analog zu Beeinträchtigungen der sozialen Funktionsfähigkeit und affektiven Symptomen sind, welche bei neuropsychiatrischen Störungen auftreten. Aktuelle Klassifikationssysteme, wie DSM-5 oder ICD-10, beschreiben diese Störungsbilder rein deskriptiv auf Erlebens- und Verhaltensebene, da Biomarker bis jetzt nicht gefunden wurden. Daher sind die Befunde der behavioralen Untersuchungen dieser Dissertationsarbeit von besonderer translationaler Bedeutung.

#### **4.4 Einordnung bisheriger Modellierungsansätze von *Cacnal<sup>c</sup>* bei Nagetieren**

Bei den meisten der genetischen *Cacnal<sup>c</sup>* Nagetiermodelle wurde auf eine Reduktion der Gendosierung zurückgegriffen. Die regions- und zellspezifischen *Cacnal<sup>c</sup>* Knockout Mausmodelle, die hauptsächlich auf Cre-Rekombinase-Systemen basieren (Moosmang et al., 2005; White et al., 2008; McKinney et al., 2008; Jeon et al., 2010; Lee et al., 2012; Temme et al., 2016; Kabir et al., 2017a, 2017b; Terrillion et al., 2017b; Völkening et al., 2017; Dedic et al., 2018), bieten eine gute Möglichkeit den Einfluss von *Cacnal<sup>c</sup>* auf krankheitsrelevante Verhaltensweisen, neuronale und molekulare Mechanismen zu untersuchen, die der Pathophysiologie der neuropsychiatrischen Störungen zugrundeliegen. Der spezifische Knockout von *Cacnal<sup>c</sup>* dieser Modelle ist auf das Gehirn begrenzt, was von Vorteil ist, da Ca<sub>v</sub>1.2 auch im Herzen exprimiert wird (Striessnig et al., 2014), was einen Einfluss auf das Verhalten der Versuchstiere nehmen könnte. Der Nachteil dieses Vorgehens besteht darin, dass die Konstruktvalidität dieser Modelle eingeschränkt wird, da *CACNA1C* Veränderungen im Menschen den gesamten Organismus, d. h. alle Organsysteme, betreffen. Hier bietet vor allem das konstitutive *Cacnal<sup>c</sup>*<sup>+/-</sup> Rattenmodell einen großen Vorteil (Braun et al., 2018; Kisko et al., 2018, 2019; Moon et al., 2018; Sykes et al., 2018b), da sich die Reduktion von *Cacnal<sup>c</sup>* auf

den gesamten Organismus bezieht und somit eine gesteigerte Übertragbarkeit auf den Menschen gewährleistet wird.

An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass adulte *CacnalC*<sup>+/-</sup> Mäuse nur geringfügige Veränderungen der Herzfunktion im Vergleich zu *CacnalC*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren aufwiesen und erst nach Stress konnte bei *CacnalC*<sup>+/-</sup> Mäusen eine leichte Hypertrophie des Herzens und minimale Vergrößerungen der Herzventrikel festgestellt werden (Goonasekera et al., 2012). Im Kontrast dazu fanden Rosati et al. (2011), dass eine vollständige Deletion von Ca<sub>v</sub>1.2 im Herzen von Mäusen zwar zu einer Verringerung der Herzfunktion und einer frühen postnatalen Sterblichkeit führte, aber ein heterozygoter herzspezifischer Knockout von Ca<sub>v</sub>1.2 bei Mäusen keinen auffälligen kardialen Phänotyp verursachte. Bezüglich *CacnalC*<sup>+/-</sup> Mäusmodelle gibt es weiterhin Hinweise, dass während früher embryonaler Entwicklungsstufen verringerte Calciumkanalströme in das Herzen vorliegen, folglich jedoch Kompensationsmechanismen greifen und die Herzfunktion stabilisieren (Muth et al., 2001), was zu einer normalen Entwicklung des Körpers und Verhaltens führt (Seisenberger et al., 2000). Das Gain-of-function Ca<sub>v</sub>1.2 TS Mausmodell wies laut Zhang et al. (2018) zwar Herzrhythmusstörung auf, dennoch konnten auch unter stressreichen und körperlich anspruchsvollen Testbedingungen, wie dem MWM, keine Hinweise auf eine Herzinsuffizienz gefunden werden (Bader et al., 2011).

In Anbetracht dieser nur leichten Veränderungen des Herzens von genetisch manipulierten *CacnalC* Mäusen lässt sich vermuten, dass auch *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten keinen pathologischen Phänotypen des Herzens aufweisen, der behaviorale und neurobiologische Parameter beeinflusst (Kabir et al., 2017c). So konnte bei juvenilen und adulten *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten und *CacnalC*<sup>+/+</sup> Kontrolltiere vergleichbare lokomotorische Aktivität gefunden werden (Kisko, 2018; Sykes et al., 2018b; Kisko et al., 2019). In Studie I konnte kein Unterschied zwischen den Genotypen bezüglich des Körpergewichts festgestellt werden, was gegen eine veränderte körperliche Entwicklung und abweichende Performanz des Herzens im Vergleich von adulten weiblichen *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten und *CacnalC*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren spricht. Auch die weiteren behavioralen Parameter der Studie I, wie die gesteigerte Aktivität der *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten bei Kontakt mit Tieren gleichen Genotyps, sprechen für eine vergleichbare Herzleistung. Somit ist davon auszugehen, dass *CacnalC*<sup>+/-</sup> Ratten keinen kardialen Phänotyp einhergehend mit einer Herzschwäche aufweisen, womit auch ein Einfluss durch eine möglicherweise verringerte Durchblutung des zentralen Nervensystems ausgeschlossen werden kann und die vorhandenen Verhaltensänderungen auf eine direkt veränderte Funktion des Gehirns zurückzuführen sind.

Im Allgemeinen lässt sich feststellen, dass das konstitutive *CacnalC*<sup>+/-</sup> Rattenmodell den regionsspezifischen *CacnalC* Mausmodellen vorzuziehen ist, da eine erhöhte translationale Validität angenommen werden kann. Die partielle *CacnalC* Deletion im *CacnalC*<sup>+/-</sup> Rattenmodell spiegelt die Situation der menschlichen Genvarianten von *CACNA1C* deutlich besser wieder, da davon auszugehen ist, dass die *CACNA1C* Risikoallele lediglich die Gendosierung beeinflussen und nicht zu einer vollständigen Löschung des Gens führen. Ebenfalls spricht das komplexere Verhalten von Ratten in Anbetracht der verhaltensbasierten Diagnosekriterien neuropsychiatrischer Störungen für eine Bevorzugung dieser Spezies im Vergleich zu Mausmodellen.

#### 4.4.1 *CacnalC* und Geschlechtseffekte in der präklinischen Forschung

Geschlechtsunterschiede bei neuropsychiatrischen Störungen gehören zu den am besten replizierten Befunden in der Erforschung der Ätiologie dieser Störungsbilder (Steel et al., 2014; Riecher-Rössler, 2017). Passenderweise konnten bereits Effekte von *CACNA1C* in Abhängigkeit des Geschlechts nachweisen, da weibliche Träger eines *CACNA1C* Risikoallels höhere Prävalenzraten von affektiven Störungen (Dao et al., 2010; Witt et al., 2014) und eine verschlechtere funktionelle Erholung nach einer schizophrenen Episode aufwiesen (Heilbronner et al., 2015). Auch scheint *CACNA1C* in Abhängigkeit des Geschlechts psychologische Faktoren zu beeinflussen, da beispielsweise eine erhöhte Feindseligkeit und eine verringerte emotionale Intelligenz bei weiblichen rs1006737 Risikoträgern (Takeuchi et al., 2018) und eine erhöhte emotionale Labilität und verringerte Belastbarkeit bei männlichen rs1006737 Risikoträgern (Strohmaier et al., 2013) festgestellt werden konnte. Auch die translationale Forschung konnte in Nagetiermodellen diverse geschlechtsabhängige Effekte von *CacnalC* feststellen (Dao et al., 2010; Braun et al., 2018; Kisko et al., 2018, 2019). Weibliche *CacnalC*<sup>+/-</sup> Mäuse zeigten einen deutlich erhöhten Angstphänotyp im Vergleich zu weiblichen *CacnalC*<sup>+/+</sup> Kontrolltieren (Dao et al., 2010). Weiterhin gibt es geschlechtsspezifische Effekte im *CacnalC*<sup>+/-</sup> Rattenmodell, da die *CacnalC* Haploinsuffizienz in Abhängigkeit des Geschlechts der Versuchstiere das räumliche Lernen verbessert (Braun et al., 2018) und das soziale Interaktionsverhalten verändert (Kisko et al., 2018, 2019). Trotz dieser prägnanten Effekte fokussierten die bisherigen Nagetierstudien hauptsächlich männliche Versuchstiere (Bader et al., 2011; Kabir et al., 2017a; Terrillion et al., 2017b; Dedic et al., 2018; Kabitzke et al., 2018; Moon et al., 2018; Sykes et al., 2018b), was die bekannte und kritisch zu bewertende Bevorzugung männlicher Nagetiere in der biomedizinischen Forschung festigt (Beery und Zucker, 2011).

Der Fokus auf das männliche Geschlecht insbesondere in den Neurowissenschaften ist der Fehlannahme geschuldet, dass weibliche Versuchstiere aufgrund einer hormonellen Fluktuation eine höhere Variabilität aufweisen als männliche Tiere (Becker et al., 2016; Shansky, 2019). Wie das NIH bereits 2014 betonte, kann die Vernachlässigung weiblicher Versuchstiere in der präklinischen Forschung zu einer Verringerung der translationalen Validität der Tiermodelle und nachfolgend zu negativen Folgen für die Gesundheit von Frauen führen (McCullough et al., 2014). Das NIH gibt wichtige Empfehlungen, um die Anzahl der weiblichen Tieren in der Wissenschaft zu erhöhen und weißt daraufhin, dass klinische Studien auf allen Ebenen der Forschung, d. h. prä- und klinisch beziehungsweise über Spezies hinweg, das weibliche Geschlecht berücksichtigen sollen. Daher habe ich in meiner Arbeit weibliche *Cacnalc*<sup>+/-</sup> und *Cacnalc*<sup>+/+</sup> Ratten untersucht, um den geschlechterspezifischen Verzerrungseffekten entgegenzuwirken und den geschlechtsabhängigen Effekte von *CACNA1C* respektive *Cacnalc* gerecht zu werden.

#### 4.5 Translatiöner Vergleich des *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Rattenmodells

Auf translationaler Ebene wurden vergleichbare Effekte von *CACNA1C* SNPs auf den affektiven Zustand von Individuen berichtet, wobei der Effekt von *CACNA1C* abhängig vom Geschlecht der Betroffenen ist (Dao et al., 2010; Strohmaier et al., 2013; Witt et al., 2014). Insbesondere konnten bei Patientinnen mit einem *CACNA1C* Risikoallel erhöhte Prävalenzraten für MDD und BPD gefunden werden (Dao et al., 2010; Witt et al., 2014). Außerdem zeigten weibliche Risikoallelträger des *CACNA1C* SNP rs1024582 eine erhöhte Feindseligkeit und Schadensvermeidung sowie reduzierte intrapersonliche emotionale Intelligenz (Takeuchi et al., 2018), was ebenfalls auf Veränderungen des Affektzustands hinweist. Im Gegensatz zu diesen negativen Effekten bei Frauen, berichten Strohmaier et al. (2013), dass bei männlichen Trägern des Risikoallels rs1006737 eine erhöhte emotionale Labilität und verringerte Belastbarkeit gemessen wurde, während Allelträgerinnen eine erhöhte Resilienz bezüglich dieser Parameter zeigten. Unabhängig vom Geschlecht weisen Träger des Risikoallels rs1006737 eine gesteigerte Ängstlichkeit und Schadensvermeidung (Roussos et al., 2011) sowie erhöhte Angst- und Depressionswerte auf (Erk et al., 2010, 2014a). Auch ist das Ausmaß einer depressiven Symptomatik bei Trägern verschiedener *CACNA1C* SNPs nach multiplen Traumata im Erwachsenenalter signifikant erhöht (Dedic et al., 2018).

Zwar sind auf struktureller und funktioneller Ebene Veränderungen des Gehirns von gesunden und erkrankten *CACNA1C* Risikoallelträgern bekannt, wobei auf funktioneller Ebene deutlich ausgeprägtere Effekte gefunden werden konnten (Ou et al., 2015; Kabir et al., 2016). Bezüglich

des mPFCs (Wang et al., 2011a; Soeiro-de-Souza et al., 2017) und Hippocampus (Dietsche et al., 2014) konnte eine Zusammenhang des Risikoallels rs1006737 mit Volumenänderungen gefunden werden, wohingegen andere Studien keinen Einfluss von *CACNA1C* auf die Hirnmorphologie ermitteln konnten (Soeiro-de-Souza et al., 2012; Tesli et al., 2013). Diese Bildgebungsstudien unterscheiden sich in Hinblick auf methodische Aspekte und die Wahl der Stichproben, was einen Teil der Diskrepanzen erklären kann. Wie Tesli et al. (2013) feststellten, kann in Anbetracht der bisherigen Bildgebungsstudien darauf geschlossen werden, dass die *CACNA1C* Risikoallele über Mechanismen wirken, die nicht unbedingt durch strukturelle Bildgebung aufgedeckt werden können. Passend zu dieser Annahme konnten beispielsweise mikrostrukturelle Veränderungen des Hippocampus (Dietsche et al., 2014) und abweichende funktionelle Aktivierungsmuster des Hippocampus (Erk et al., 2010, 2014a; Dima et al., 2013) bei rs1006737 Risikoallelträgern festgestellt werden.

Im Allgemeinen lässt sich daher sagen, dass *CACNA1C* an der Regulation des affektiven Zustandes beteiligt ist, wobei der Einfluss des Geschlechts berücksichtigt werden sollte. Auch konnten *CACNA1C* Risikoallele mit Hirnveränderungen in Verbindung gebracht werden, wobei diese auf struktureller Ebene vergleichsweise subtil erscheinen und eher bei funktioneller Betrachtung von betroffenen Individuen zutage treten.

#### 4.6 Zukunftsperspektiven

Das konstitutive *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodell, welches einen monogenetischen Ansatz mit einer Reduktion der Expression von Ca<sub>v</sub>1.2 aufweist, stellt ein mögliches Vorgehen zu Modellierung genetischer Veränderungen im Rahmen der translationalen Forschung dar. Der Einfluss von *CACNA1C* SNPs auf die Genexpression bei Menschen ist noch nicht endgültig geklärt, da es Hinweise auf eine verringerte (Gershon et al., 2014; Roussos et al., 2014; Eckart et al., 2016) sowie gesteigerte (Bigos et al., 2010; Yoshimizu et al., 2015) Expression von *CACNA1C* gibt. In Zukunft sollte ein konstitutives *Cacna1c* Rattenmodell mit einer gesteigerten Expression beziehungsweise Funktion von Ca<sub>v</sub>1.2, ähnlich dem Gain-of-function Ca<sub>v</sub>1.2 TS Mausmodell (Bader et al., 2011), entwickelt werden, um auch die Effekte der erhöhten Expression von Ca<sub>v</sub>1.2 auf krankheitsrelevante Phänotypen zu untersuchen.

Außerdem stellt aktuell die Erforschung nicht-kodierender *CACNA1C* SNPs in Nagetiermodellen eine Herausforderung dar. Durch die CRISPR/Cas9 Technologie wird die genetische Manipulation deutlich vereinfacht und SNP-spezifische Tiermodelle konnten so bereits entwickelt werden (Birling et al., 2017). Da viele SNPs neuropsychiatrischer Störungen auf nicht-kodierenden Regionen des Genoms liegen (Zhang und Lupski, 2015), kann so die

Konstruktvalidität genetischer Nagetiermodelle weiter gesteigert werden. Diese genetischen Tiermodelle können nicht nur zur Untersuchung des Einflusses von *Cacnalc* auf die Transkriptionskontrolle verwendet werden, sondern es können darüber hinaus wichtige biologische Signalwege im Zusammenhang mit *Cacnalc* untersucht werden (Kabir et al., 2017c).

Interessant sind auch genetische Tiermodelle, die mehrere genetische Faktoren berücksichtigen. Ein Beispiel ist das Doppel-Knockout Mausmodell des Fragilen-X Syndroms (FXS), welches von Spencer et al. (2006) verwendet wurde. Individuen, die an FXS erkrankt sind, weisen laut DSM-5 unter anderem kognitive Beeinträchtigungen, soziale Ängste und autistisches Verhalten auf (American Psychiatric Association, 2013). Durch den gleichzeitigen Knockout der Gene *Fmr1* und *Fxr2*, die beide mit FXS assoziiert sind, konnten die Autoren nachweisen, dass der Doppelknockout zu deutlich stärkeren krankheitsrelevanten Phänotypen im Mausmodell führten als der Knockout des jeweils einzelnen Gens (Spencer et al., 2006). Durch diese Ansätze können bekannte polygene Effekte (Gen x Gen Interaktionen) in der Ätiologie neuropsychiatrischer Störungen auf komplexe behaviorale Phänotypen im Tiermodell nachgebildet werden.

Im Rahmen der Forschergruppe FOR2107 werden darüber hinaus bereits eine Gen-Umwelt-Interaktionsstudie am *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Rattenmodell durchgeführt, um den modernen biopsychosozialen Krankheitsmodellen gerecht zu werden. Gestützt wird dieses Vorgehen durch Befunde von Dedic et al. (2018), die von einem Zusammenhang zwischen *CACNA1C* und Traumatisierungen im Erwachsenenalter berichteten. Auch die Befunde aus Studie I und II könnten daher in Zukunft um Experimente erweitert werden, die positive und negative Haltungsbedingungen der Versuchstiere variieren. Braun et al. (2019) lieferten erste Hinweise darauf, dass die *Cacnalc* Haploinsuffizienz in Abhängigkeit der Umwelt die Lern- und Gedächtnisleistung von Ratten beeinflusst. Interessanterweise scheinen diese Effekte unabhängig von der mitochondrialen Funktionsfähigkeit der Ratten zu sein (Michels et al., 2019).

Weitere Interventionen sollten sich außerdem auf die Verbesserung der Verhaltensdefizite von *Cacnalc*<sup>+/-</sup> Ratten durch pharmakologische Ansätze konzentrieren. In verschiedenen klinischen Studien wurde die Wirksamkeit von LTCC-Blockern zur Linderung der Symptome von neuropsychiatrischen Erkrankung untersucht (Zamponi, 2015). Problematisch bei diesem Vorgehen erscheint, dass LTCC-Blocker, wie Verapamil, nicht spezifisch an Ca<sub>v</sub>1.2 binden (Bergson et al., 2011) und eine Bandbreite von Nebenwirkungen auf das Verhalten von Nagetieren haben (Popović et al., 2017). Es wäre daher auch von Interesse die von Ca<sub>v</sub>1.2

abhängigen Signalmechanismen, z. B. mTOR (engl. „Mammalian target of rapamycin“) oder BDNF (Kabir et al., 2017c), pharmakologisch zu manipulieren, um Verhaltensabweichungen in den Tiermodellen zu verbessern. Zum Beispiel ist eine Dysregulation von mTOR eng mit neuropsychiatrischen Störungen verbunden (Costa-Mattioli und Monteggia, 2013) und mittels pharmakologischer Manipulation dieses Signalwegs konnten durch den mTOR-Hemmer Rapamycin soziale (Burket et al., 2015) und affektive Defizite (Zhou et al., 2013) bei genetischen Tiermodellen für neuropsychiatrischen Störungen verbessert werden.

Zusätzlich sollte die Phänotypisierung des *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodells hinsichtlich struktureller und funktioneller Eigenschaften mittels Bildgebungsverfahren weiter vorangetrieben werden. Neben den histologischen Ansätzen, wie sie in Studie II verwendet wurden, bietet sich bei Tiermodellen auch die Verwendung der Magnetresonanztomographie (MRT) an, um strukturelle und funktionelle Parameter zu erheben. Am Zentrum für bildgebende Forschung der Philipps-Universität Marburg ist ein 7-Tesla Kleintier-MRT vorhanden, der für dieses Vorhaben verwendet werden könnte. Diese nicht-invasive Messung bietet nicht nur den Vorteil, dass das gesamte Gehirn mit seinen Substrukturen erhoben werden kann, sondern die Versuchstiere können nach der Messung wieder in die Tierhaltung verbracht und in weiteren Paradigmen untersucht werden. So können behaviorale und biologische Daten optimal miteinander verknüpft und korrelative bzw. kausale Zusammenhänge nachgewiesen werden. Auch können wiederholte Messungen durchgeführt werden, um mögliche degenerative Verläufe in Abhängigkeit des Genotyps beim *Cacna1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodell aufzudecken, da es bereits Hinweise darauf gibt, dass *Cacna1c* über die Lebensspanne von Mäusen hinweg differentielle Effekte auf die kognitive Leistung hat (Zanos et al., 2015).

Durch MRT Scanner könnte außerdem das Verfahren Diffusions-Tensor-Bildgebung (engl. „Diffusion tensor imaging“; DTI) angewendet werden, um die grundlegenden neurobiologischen Veränderungen der neuropsychiatrischen Störungen besser zu verstehen. Im Kontext der postulierten Dysregulation des PFC-Amygdala-Hippocampus Netzwerkes (Kabir et al., 2016), bietet DTI gute Möglichkeiten, sowohl Volumen- als auch Mikrostrukturunterschiede von cerebralem Gewebe zu ermitteln. Zur Untersuchung der Gewebemikrostruktur wird bei diesem Verfahren auf die Diffusion von Wasser im Gehirn zurückgegriffen. Diese lässt eine Messung der Integrität von Nervenfasern der weißen Substanz im Gehirn zu und erlaubt somit auch eine indirekte Messung der strukturellen Konnektivität des Gehirns (Caan, 2016). Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich verwendet, um die Konnektivität in Gehirnen von verschiedenen Mausmodelle für ASD zu untersuchen (Kumar et al., 2012; Ellegood et al., 2013; Ellegood und Crawley, 2015). In einer Studie am BTBR-

Mausmodell für ASD konnte so beispielsweise eine verringerte Konnektivität im Bereich des Corpus callosum nachgewiesen werden (Ellegood et al., 2013). Durch die Verwendung der funktionellen MRT ließe sich ebenfalls die Dysregulation wichtiger Hirnnetzwerke untersuchen, beispielsweise die Verbindung zwischen mPFC und Hippocampus (Sigurdsson und Duvarci, 2016), was in Anbetracht der bekannten Einflüsse von *CACNA1C* auf die Hirnfunktion bei Menschen (siehe Kapitel 1.1.3) zu einer Erhöhung der Konstruktvalidität des *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodells beitragen kann.

#### **4.7 Abschlussbemerkungen**

Im Bereich der Erforschung neuropsychiatrischer Störungen tragen die Verhaltensneurowissenschaften erkenntnisreiche Ansätze bei, um die postulierten ätiologischen Faktoren moderner Krankheitsmodelle zu untersuchen. Insbesondere genetische Nagetiermodelle bieten eine gute Möglichkeit die genetischen Grundlagen und neurobiologischen Pathomechanismen ausführlich zu beleuchten. Da aktuelle Klassifikationssysteme neuropsychiatrische Störungsbilder deskriptiv auf Erlebens- und Verhaltensebene beschreiben und bisher noch keine verlässlichen Biomarker für diese Störungsbilder gefunden wurden, ist besonders Verhalten auf Ebene der Tiermodelle von großer Bedeutung. Unter Verwendung des *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodells konnte in diesem Dissertationsprojekt gezeigt werden, dass eine Verringerung der Ca<sub>v</sub>1.2 Expression zu krankheitsrelevanten behavioralen Phänotypen, vor allem im Bereich des Affektzustands und Sozialverhaltens, führte, was für eine hohe Augescheinvalidität dieses Modells spricht und im Einklang mit einer suffizienten Konstruktvalidität einen wichtigen Modellierungsansatz darstellt. Behaviorale Veränderungen des *Cacnal1c*<sup>+/-</sup> Rattenmodells können in der zukünftigen Forschung als eine wichtige Messgröße verwendet werden, um neue Therapieansätze zu erproben mit dem übergeordneten Ziel die Behandlung und Therapie neuropsychiatrischer Störungen zu verbessern und die Lebensqualität erkrankter Menschen zu erhöhen.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- Abel KM, Drake R, Goldstein J (2010) Sex differences in schizophrenia. *Int J Soc Psychiatry* 22:417–428.
- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124:319–335.
- American Psychiatric Association (2013) Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Publishing.
- Anacker C, Hen R (2017) Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci* 18:335–346.
- Anacker C, Luna VM, Stevens GS, Millette A, Shores R, Jimenez JC, Chen B, Hen R (2018) Hippocampal neurogenesis confers stress resilience by inhibiting the ventral dentate gyrus. *Nature* 559:98–102.
- Arakawa H, Arakawa K, Deak T (2010) Sickness-related odor communication signals as determinants of social behavior in rat: A role for inflammatory processes. *Horm Behav* 57:330–341.
- Arrant AE, Schramm-Sapyta NL, Kuhn CM (2013) Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. *Behav Brain Res* 256:119–127.
- Bader PL, Faizi M, Kim LH, Owen SF, Tadross MR, Alfa RW, Bett GCL, Tsien RW, Rasmusson RL, Shamloo M (2011) Mouse model of Timothy syndrome recapitulates triad of autistic traits. *Proc Natl Acad Sci* 108:15432–15437.
- Banasr M, Soumier A, Hery M, Mocaër E, Daszuta A (2006) Agomelatine, a New Antidepressant, Induces Regional Changes in Hippocampal Neurogenesis. *Biol Psychiatry* 59:1087–1096.
- Barfield RJ, Thomas DA (1986) The Role of Ultrasonic Vocalizations in the Regulation of Reproduction in Rats. *Ann N Y Acad Sci* 474:33–43.
- Barker DJ, Root DH, Ma S, Jha S, Megehee L, Pawlak AP, West MO (2010) Dose-dependent differences in short ultrasonic vocalizations emitted by rats during cocaine self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* 211:435–442.
- Bavley CC, Fischer DK, Rizzo BK, Rajadhyaksha AM (2017) Cav1.2 channels mediate persistent chronic stress-induced behavioral deficits that are associated with prefrontal cortex activation of the p25/Cdk5-glucocorticoid receptor pathway. *Neurobiol Stress* 7:27–37.
- Becker JB, Prendergast BJ, Liang JW (2016) Female rats are not more variable than male rats: a meta-analysis of neuroscience studies. *Biol Sex Differ* 7:34.
- Beery AK, Zucker I (2011) Sex bias in neuroscience and biomedical research. *Neurosci Biobehav Rev* 35:565–572.
- Bergson P, Lipkind G, Lee SP, Duban M-E, Hanck DA (2011) Verapamil Block of T-Type Calcium Channels. *Mol Pharmacol* 79:411–419.
- Bett GC, Lis A, Wersinger SR, Baizer JS, Duffey ME, Rasmusson RL (2012) A Mouse Model of Timothy Syndrome: a Complex Autistic Disorder Resulting from a Point Mutation in Cav1.2. *Am Chinese J Med Sci* 5:135.
- Bhat S, Dao DT, Terrillion CE, Arad M, Smith RJ, Soldatov NM, Gould TD (2012) CACNA1C (Cav1.2) in the pathophysiology of psychiatric disease. *Prog Neurobiol* 99:1–14.
- Bidaud I, Mezghrani A, Swayne LA, Monteil A, Lory P (2006) Voltage-gated calcium channels in genetic diseases. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1763:1169–1174.
- Bienvenu OJ, Davydow DS, Kendler KS (2011) Psychiatric ‘diseases’ versus behavioral disorders and degree of genetic influence. *Psychol Med* 41:33–40.
- Biggers WJ, Barnea ER, Sanyal MK (1987) Anomalous neural differentiation induced by 5-bromo-2'-deoxyuridine during organogenesis in the rat. *Teratology* 35:63–75.

- Bigos KL, Mattay VS, Callicott JH, Straub RE, Vakkalanka R, Kolachana B, Hyde TM, Lipska BK, Kleinman JE, Weinberger DR (2010) Genetic Variation in CACNA1C Affects Brain Circuitries Related to Mental Illness. *Arch Gen Psychiatry* 67:939.
- Birling M-C, Herculat Y, Pavlovic G (2017) Modeling human disease in rodents by CRISPR/Cas9 genome editing. *Mamm Genome* 28:291–301.
- Blanchard RJ, Blanchard DC, Agullana R, Weiss SM (1991) Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol Behav* 50:967–972.
- Borta A, Wöhr M, Schwarting RKW (2006) Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res* 166:271–280.
- Braun MD, Kisko TM, Vecchia DD, Andreatini R, Schwarting RKW, Wöhr M (2018) Sex-specific effects of Cacna1c haploinsufficiency on object recognition, spatial memory, and reversal learning capabilities in rats. *Neurobiol Learn Mem* 155:543–555.
- Braun MD, Kisko TM, Witt SH, Rietschel M, Schwarting RKW, Wöhr M (2019) Long-term environmental impact on object recognition, spatial memory, and reversal learning capabilities in Cacna1c haploinsufficient rats. *Hum Mol Genet*.
- Brenes JC, Lackinger M, Höglinger GU, Schrott G, Schwarting RKW, Wöhr M (2016) Differential effects of social and physical environmental enrichment on brain plasticity, cognition, and ultrasonic communication in rats. *J Comp Neurol* 524:1586–1607.
- Brewer LD, Dowling ALS, Curran-Rauhut MA, Landfield PW, Porter NM, Blalock EM (2009) Estradiol Reverses a Calcium-Related Biomarker of Brain Aging in Female Rats. *J Neurosci* 29:6058–6067.
- Brudzynski SM (2013) Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr Opin Neurobiol* 23:310–317.
- Brudzynski SM, Pniak A (2002) Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. *J Comp Psychol* 116:73–82.
- Burgdorf J, Knutson B, Panksepp J, Ikemoto S (2001) Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behav Neurosci* 115:940–944.
- Burgdorf J, Kroes RA, Moskal JR, Pfaus JG, Brudzynski SM, Panksepp J (2008) Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *J Comp Psychol* 122:357–367.
- Burgdorf J, Moskal JR, Brudzynski SM, Panksepp J (2013) Rats selectively bred for low levels of play-induced 50kHz vocalizations as a model for Autism Spectrum Disorders: A role for NMDA receptors. *Behav Brain Res* 251:18–24.
- Burgdorf J, Panksepp J, Brudzynski SM, Beinfeld MC, Cromwell HC, Kroes RA, Moskal JR (2009) The effects of selective breeding for differential rates of 50-kHz ultrasonic vocalizations on emotional behavior in rats. *Dev Psychobiol* 51:34–46.
- Burgdorf J, Panksepp J, Moskal JR (2011) Frequency-modulated 50kHz ultrasonic vocalizations: a tool for uncovering the molecular substrates of positive affect. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1831–1836.
- Burgdorf J, Wood PL, Kroes RA, Moskal JR, Panksepp J (2007) Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: Electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. *Behav Brain Res* 182:274–283.
- Burke CJ, Kisko TM, Euston DR, Pellis SM (2018) Do juvenile rats use specific ultrasonic calls to coordinate their social play? *Anim Behav* 140:81–92.
- Burke CJ, Kisko TM, Pellis SM, Euston DR (2017) Avoiding escalation from play to aggression in adult male rats: The role of ultrasonic calls. *Behav Processes* 144:72–81.

- Burket JA, Benson AD, Tang AH, Deutsch SI (2015) NMDA receptor activation regulates sociability by its effect on mTOR signaling activity. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 60:60–65.
- Caan MWA (2016) DTI Analysis Methods: Fibre Tracking and Connectivity. In: *Diffusion Tensor Imaging: A Practical Handbook* (Van Hecke W, Emsell L, Sunaert S, Hrsg), S. 1–440. New York, NY: Springer New York.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993) Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56:337–344.
- Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM (2004) Lower Hippocampal Volume in Patients Suffering From Depression: A Meta-Analysis. *Am J Psychiatry* 161:598–607.
- Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD (2011) The Mouse Forced Swim Test. *J Vis Exp*:4–8.
- Canteras NS, Resstel LB, Bertoglio LJ, de Pádua Carobrez A, Guimarães FS (2010) Neuroanatomy of anxiety. *Curr Top Behav Neurosci*.
- Castagné V, Moser P, Roux S, Porsolt RD (2011) Rodent models of depression: Forced swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. *Curr Protoc Neurosci*:1–14.
- Catterall WA (2011) Voltage-Gated Calcium Channels. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a003947.
- Coffey KR, Marx RG, Neumaier JF (2019) DeepSqueak: a deep learning-based system for detection and analysis of ultrasonic vocalizations. *Neuropsychopharmacology* 44:859–868.
- Cole J, Costafreda SG, McGuffin P, Fu CHY (2011) Hippocampal atrophy in first episode depression: A meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *J Affect Disord* 134:483–487.
- Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium (2013) Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet* 381:1371–1379.
- Costa-Mattioli M, Monteggia LM (2013) mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 16:1537–1543.
- Covington HE, Miczek KA (2003) Vocalizations during withdrawal from opiates and cocaine: possible expressions of affective distress. *Eur J Pharmacol* 467:1–13.
- Czéh B, Müller-Keuker JIH, Rygula R, Abumaria N, Hiemke C, Domenici E, Fuchs E (2007) Chronic Social Stress Inhibits Cell Proliferation in the Adult Medial Prefrontal Cortex: Hemispheric Asymmetry and Reversal by Fluoxetine Treatment. *Neuropsychopharmacology* 32:1490–1503.
- Dao DT, Mahon PB, Cai X, Kovacsics CE, Blackwell RA, Arad M, Shi J, Zandi PP, O'Donnell P, Knowles JA, Weissman MM, Coryell W, Scheftner WA, Lawson WB, Levinson DF, Thompson SM, Potash JB, Gould TD (2010) Mood Disorder Susceptibility Gene CACNA1C Modifies Mood-Related Behaviors in Mice and Interacts with Sex to Influence Behavior in Mice and Diagnosis in Humans. *Biol Psychiatry* 68:801–810.
- de Andrade JS, Céspedes IC, Abrão RO, dos Santos TB, Diniz L, Britto LRG, Spadari-Bratfisch RC, Ortolani D, Melo-Thomas L, da Silva RCB, Viana MB (2013) Chronic unpredictable mild stress alters an anxiety-related defensive response, Fos immunoreactivity and hippocampal adult neurogenesis. *Behav Brain Res* 250:81–90.
- Deacon BJ (2013) The biomedical model of mental disorder: A critical analysis of its validity, utility, and effects on psychotherapy research. *Clin Psychol Rev* 33:846–861.
- Debiec J, Olsson A (2017) Social Fear Learning: from Animal Models to Human Function. *Trends Cogn Sci* 21:546–555.

- Dedic N et al. (2018) Cross-disorder risk gene CACNA1C differentially modulates susceptibility to psychiatric disorders during development and adulthood. *Mol Psychiatry* 23:533–543.
- Deisseroth K, Singla S, Toda H, Monje M, Palmer TD, Malenka RC (2004) Excitation-Neurogenesis Coupling in Adult Neural Stem/Progenitor Cells. *Neuron* 42:535–552.
- Dichter GS, Damiano CA, Allen JA (2012) Reward circuitry dysfunction in psychiatric and neurodevelopmental disorders and genetic syndromes: animal models and clinical findings. *J Neurodev Disord* 4:19.
- Dietsche B, Backes H, Laneri D, Weikert T, Witt SH, Rietschel M, Sommer J, Kircher T, Krug A (2014) The impact of a CACNA1C gene polymorphism on learning and hippocampal formation in healthy individuals: A diffusion tensor imaging study. *Neuroimage* 89:256–261.
- Dima D, Jogia J, Collier D, Vassos E, Burdick KE, Frangou S (2013) Independent Modulation of Engagement and Connectivity of the Facial Network During Affect Processing by CACNA1C and ANK3 Risk Genes for Bipolar Disorder. *JAMA Psychiatry* 70:1303.
- Duncan RS, Goad DL, Grillo MA, Kaja S, Payne AJ, Koulen P (2010) Control of Intracellular Calcium Signaling as a Neuroprotective Strategy. *Molecules* 15:1168–1195.
- Eaton NR, Keyes KM, Krueger RF, Balsis S, Skodol AE, Markon KE, Grant BF, Hasin DS (2012) An invariant dimensional liability model of gender differences in mental disorder prevalence: Evidence from a national sample. *J Abnorm Psychol* 121:282–288.
- Eckart N, Song Q, Yang R, Wang R, Zhu H, McCallion AS, Avramopoulos D (2016) Functional Characterization of Schizophrenia-Associated Variation in CACNA1C. *PLoS One* 11:e0157086.
- Ellegood J, Babineau BA, Henkelman RM, Lerch JP, Crawley JN (2013) Neuroanatomical analysis of the BTBR mouse model of autism using magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging. *Neuroimage* 70:288–300.
- Ellegood J, Crawley JN (2015) Behavioral and Neuroanatomical Phenotypes in Mouse Models of Autism. *Neurotherapeutics* 12:521–533.
- Ellenbroek B, Youn J (2016) Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Dis Model Mech* 9:1079–1087.
- Endres T, Widmann K, Fendt M (2007) Are rats predisposed to learn 22 kHz calls as danger-predicting signals? *Behav Brain Res* 185:69–75.
- Engel G (1977) The need for a new medical model: a challenge for biomedicine. *Science* 196:129–136.
- Engel G (1980) The clinical application of the biopsychosocial model. *Am J Psychiatry* 137:535–544.
- Engelhardt K-A, Fuchs E, Schwarting RKW, Wöhr M (2017) Effects of amphetamine on pro-social ultrasonic communication in juvenile rats: Implications for mania models. *Eur Neuropsychopharmacol* 27:261–273.
- Engelhardt KA, Schwarting RKW, Wöhr M (2018) Mapping trait-like socio-affective phenotypes in rats through 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Psychopharmacology (Berl)* 235:83–98.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn A, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4:1313–1317.
- Erk S et al. (2014a) Replication of brain function effects of a genome-wide supported psychiatric risk variant in the CACNA1C gene and new multi-locus effects. *Neuroimage* 94:147–154.
- Erk S, Meyer-Lindenberg A, Schmierer P, Mohnke S, Grimm O, Garbusow M, Haddad L, Poehland L, Mühleisen TW, Witt SH, Tost H, Kirsch P, Romanczuk-Seiferth N, Schott BH, Cichon S, Nöthen MM, Rietschel M, Heinz A, Walter H (2014b) Hippocampal and

- Frontolimbic Function as Intermediate Phenotype for Psychosis: Evidence from Healthy Relatives and a Common Risk Variant in CACNA1C. *Biol Psychiatry* 76:466–475.
- Erk S, Meyer-Lindenberg A, Schnell K, Von Boberfeld CO, Esslinger C, Kirsch P, Grimm O, Arnold C, Haddad L, Witt SH, Cichon S, Nöthen MM, Rietschel M, Walter H (2010) Brain function in carriers of a genome-wide supported bipolar disorder variant. *Arch Gen Psychiatry* 67:803–811.
- Fanselow M, Dong H-W (2010) Are the Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures. *Neuron* 65:1–25.
- Ferdman F, Murmu RP, Bock J, Braun K, Leshem M (2007) Weaning age, social isolation, and gender, interact to determine adult explorative and social behavior, and dendritic and spine morphology in prefrontal cortex of rats. *Behav Brain Res* 180:174–182.
- Ferhat A-T, Torquet N, Le Sourd A-M, de Chaumont F, Olivo-Marin J-C, Faure P, Bourgeron T, Ey E (2016) Recording Mouse Ultrasonic Vocalizations to Evaluate Social Communication. *J Vis Exp*:1–12.
- Ferreira MAR et al. (2008) Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet* 40:1056–1058.
- Frances A (2014) Resuscitating the biopsychosocial model. *The Lancet Psychiatry* 1:496–497.
- Fu Y, Rusznák Z, Kwok JBJ, Kim WS, Paxinos G (2014) Age-Dependent Alterations of the Hippocampal Cell Composition and Proliferative Potential in the hA $\beta$ PPSwInd-J20 Mouse. *J Alzheimer's Dis* 41:1177–1192.
- Gage FH (2019) Adult neurogenesis in mammals. *Science* 364:827–828.
- Gandal MJ, Haney JR, Parikshak NN, Leppa V, Ramaswami G, Hartl C, Schork AJ, Appadurai V, Buil A, Werge TM, Liu C, White KP, Horvath S, Geschwind DH (2018) Shared molecular neuropathology across major psychiatric disorders parallels polygenic overlap. *Science* 359:693–697.
- Garfield AS, Cowley M, Smith FM, Moorwood K, Stewart-Cox JE, Gilroy K, Baker S, Xia J, Dalley JW, Hurst LD, Wilkinson LS, Isles AR, Ward A (2011) Distinct physiological and behavioural functions for parental alleles of imprinted Grb10. *Nature* 469:534–538.
- Gershon ES, Grennan K, Busnello J, Badner JA, Ovsiew F, Memon S, Alliey-Rodriguez N, Cooper J, Romanos B, Liu C (2014) A rare mutation of CACNA1C in a patient with bipolar disorder, and decreased gene expression associated with a bipolar-associated common SNP of CACNA1C in brain. *Mol Psychiatry* 19:890–894.
- Geurts AM et al. (2009) Knockout Rats via Embryo Microinjection of Zinc-Finger Nucleases. *Science* 325:433–433.
- Gheusi G, Ortega-Perez I, Murray K, Lledo PM (2009) A niche for adult neurogenesis in social behavior. *Behav Brain Res* 200:315–322.
- Goldman SA, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci* 80:2390–2394.
- Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH (2016) Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167:897–914.
- Goonasekera SA, Hammer K, Auger-Messier M, Bodi I, Chen X, Zhang H, Reiken S, Elrod JW, Correll RN, York AJ, Sargent MA, Hofmann F, Moosmang S, Marks AR, Houser SR, Bers DM, Molkentin JD (2012) Decreased cardiac L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity induces hypertrophy and heart failure in mice. *J Clin Invest* 122:280–290.
- Gould E (1999) Neurogenesis in the Neocortex of Adult Primates. *Science* 286:548–552.
- Gould TD Hrsg (2009) Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. Totowa, NJ: Humana Press.
- Gould TD, Dao DT, Kovacsics CE (2009) The Open Field Test. In: Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice. *Neuromethods* (Gould TD, Hrsg), S. 1–20. Totowa, NJ: Humana Press.

- Green EK, Grozeva D, Jones I, Jones L, Kirov G, Caesar S, Gordon-Smith K, Fraser C, Forty L, Russell E, Hamshere ML, Moskvina V, Nikolov I, Farmer A, McGuffin P, Holmans PA, Owen MJ, O'Donovan MC, Craddock N (2010) The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 15:1016–1022.
- Halladay AK, Bishop S, Constantino JN, Daniels AM, Koenig K, Palmer K, Messinger D, Pelphrey K, Sanders SJ, Singer AT, Taylor JL, Szatmari P (2015) Sex and gender differences in autism spectrum disorder: summarizing evidence gaps and identifying emerging areas of priority. *Mol Autism* 6:36.
- Hancock A, Priester C, Kidder E, Keith JR (2009) Does 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) disrupt cell proliferation and neuronal maturation in the adult rat hippocampus in vivo? *Behav Brain Res* 199:218–221.
- Hascoët M, Bourin M (2009a) The Mouse Light–Dark Box Test. In: *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice* (Gould TD, Hrsg), S. 197–223. Totowa, NJ: Humana Press.
- Hascoët M, Bourin M (2009b) The Forced Swimming Test in Mice: A Suitable Model to Study Antidepressants. In: *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice* (Gould TD, Hrsg), S. 85–118. Totowa, NJ: Humana Press.
- Heckman JJ, Proville R, Heckman GJ, Azarfar A, Celikel T, Englitz B (2017) High-precision spatial localization of mouse vocalizations during social interaction. *Sci Rep* 7:3017.
- Heilbronner U, Malzahn D, Strohmaier J, Maier S, Frank J, Treutlein J, Mühleisen TW, Forstner AJ, Witt SH, Cichon S, Falkai P, Nöthen MM, Rietschel M, Schulze TG (2015) A common risk variant in CACNA1C supports a sex-dependent effect on longitudinal functioning and functional recovery from episodes of schizophrenia-spectrum but not bipolar disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* 25:2262–2270.
- Heyes S, Pratt WS, Rees E, Dahimene S, Ferron L, Owen MJ, Dolphin AC (2015) Genetic disruption of voltage-gated calcium channels in psychiatric and neurological disorders. *Prog Neurobiol* 134:36–54.
- Himmler BT, Kisko TM, Euston DR, Kolb B, Pellis SM (2014) Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? I. Evidence from the timing and context of their use. *Behav Processes* 106:60–66.
- Holmes MM (2016) Social regulation of adult neurogenesis: A comparative approach. *Front Neuroendocrinol* 41:59–70.
- Hölter SM, Garrett L, Einicke J, Sperling B, Dirscherl P, Zimprich A, Fuchs H, Gailus-Durner V, Hrabě de Angelis M, Würst W (2015) Assessing Cognition in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 5:331–358.
- Homberg JR, Wöhr M, Alenina N (2017) Comeback of the Rat in Biomedical Research. *ACS Chem Neurosci* 8:900–903.
- Horwitz T, Lam K, Chen Y, Xia Y, Liu C (2018) A decade in psychiatric GWAS research. *Mol Psychiatry*:1–12.
- Human I, Sequencing G, Lander E, Linton L, Birren B, Nusbaum C (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921.
- Ishiyama S, Brecht M (2016) Neural correlates of ticklishness in the rat somatosensory cortex. *Science* 354:757–760.
- Jeon D, Kim S, Chetana M, Jo D, Ruley HE, Lin S-Y, Rabah D, Kinet J-P, Shin H-S (2010) Observational fear learning involves affective pain system and Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels in ACC. *Nat Neurosci* 13:482–488.
- Jinno S (2011) Topographic differences in adult neurogenesis in the mouse hippocampus: A stereology-based study using endogenous markers. *Hippocampus* 21:467–480.
- Kabir ZD, Che A, Fischer DK, Rice RC, Rizzo BK, Byrne M, Glass MJ, De Marco Garcia N

- V, Rajadhyaksha AM (2017a) Rescue of impaired sociability and anxiety-like behavior in adult *cacna1c*-deficient mice by pharmacologically targeting *eIF2 $\alpha$* . *Mol Psychiatry* 22:1096–1109.
- Kabir ZD, Lee AS, Burgdorf CE, Fischer DK, Rajadhyaksha AM, Mok E, Rizzo B, Rice RC, Singh K, Ota KT, Gerhard DM, Schierberl KC, Glass MJ, Duman RS, Rajadhyaksha AM (2017b) *Cacna1c* in the Prefrontal Cortex Regulates Depression-Related Behaviors via REDD1. *Neuropsychopharmacology* 42:2032–2042.
- Kabir ZD, Lee AS, Rajadhyaksha AM (2016) L-type Ca<sup>2+</sup> channels in mood, cognition and addiction: integrating human and rodent studies with a focus on behavioural endophenotypes. *J Physiol* 594:5823–5837.
- Kabir ZD, Martínez-Rivera A, Rajadhyaksha AM (2017c) From Gene to Behavior: L-Type Calcium Channel Mechanisms Underlying Neuropsychiatric Symptoms. *Neurotherapeutics* 14:588–613.
- Kabitzke PA, Brunner D, He D, Fazio PA, Cox K, Sutphen J, Thiede L, Sabath E, Hanania T, Alexandrov V, Rasmusson R, Spooren W, Ghosh A, Feliciano P, Biemans B, Benedetti M, Clayton AL (2018) Comprehensive analysis of two *Shank3* and the *Cacna1c* mouse models of autism spectrum disorder. *Genes, Brain Behav* 17:4–22.
- Kaiser T, Feng G (2015) Modeling psychiatric disorders for developing effective treatments. *Nat Med* 21:979–988.
- Kalm M, Karlsson N, Nilsson MKL, Blomgren K (2013) Loss of hippocampal neurogenesis, increased novelty-induced activity, decreased home cage activity, and impaired reversal learning one year after irradiation of the young mouse brain. *Exp Neurol* 247:402–409.
- Kang E, Wen Z, Song H, Christian KM, Ming G (2016) Adult Neurogenesis and Psychiatric Disorders. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a019026.
- Kaplan M, Hinds J (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197:1092–1094.
- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz J. (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 115:97–105.
- Kempermann G (2011a) *Adult Neurogenesis 2*, 2nd ed. Oxford: Oxford University Press.
- Kempermann G (2011b) Technical Notes. In: *Adult Neurogenesis 2* (Kempermann G, Hrsg), S. 216–274. Oxford University Press.
- Kempermann G (2011c) Adult Hippocampal Neurogenesis. In: *Adult Neurogenesis 2* (Kempermann G, ed), S. 185–215. Oxford University Press.
- Kempermann G, Song H, Gage FH (2015) Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7:a018812.
- Kempton MJ, Ruberto G, Vassos E, Tatarelli R, Giradi P, Collier D, Frangou S (2009) Effects of the *CACNA1C* Risk Allele for Bipolar Disorder on Cerebral Gray Matter Volume in Healthy Individuals. *Am J Psychiatry* 166:1413–1414.
- Kennedy DP, Adolphs R (2012) The social brain in psychiatric and neurological disorders. *Trends Cogn Sci* 16:559–572.
- Kheirbek MA, Hen R (2011) Dorsal vs ventral hippocampal neurogenesis: Implications for cognition and mood. *Neuropsychopharmacology* 36:373–374.
- Kinderman P (2005) A psychological model of mental disorder. *Harv Rev Psychiatry* 13:206–217.
- Kircher T et al. (2018) Neurobiology of the major psychoses: a translational perspective on brain structure and function—the FOR2107 consortium. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*:1–14.
- Kisko TM, Braun MD, Michels S, Witt SH, Rietschel M, Culmsee C, Schwarting RKW, Wöhr M (2018) *Cacna1c* haploinsufficiency leads to pro-social 50-kHz ultrasonic communication deficits in rats. *Dis Model Mech* 11:dmm034116.

- Kisko TM, Braun MD, Michels S, Witt SH, Rietschel M, Culmsee C, Schwarting RKW, Wöhr M (2019) Sex-dependent effects of Cacna1c haploinsufficiency on juvenile social play behavior and pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats. *Genes, Brain Behav*:e12552.
- Kisko TM, Euston DR, Pellis SM (2015a) Are 50-khz calls used as play signals in the playful interactions of rats? III. The effects of devocalization on play with unfamiliar partners as juveniles and as adults. *Behav Processes* 113:113–121.
- Kisko TM, Himmler BT, Himmler SM, Euston DR, Pellis SM (2015b) Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? II. Evidence from the effects of devocalization. *Behav Processes* 111:25–33.
- Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J (1998) Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *J Comp Psychol* 112:65–73.
- Ko J (2017) Neuroanatomical Substrates of Rodent Social Behavior: The Medial Prefrontal Cortex and Its Projection Patterns. *Front Neural Circuits* 11:1–16.
- Kozorovitskiy Y, Gould E (2004) Dominance Hierarchy Influences Adult Neurogenesis in the Dentate Gyrus. *J Neurosci* 24:6755–6759.
- Krauthaim JT, Straube B, Dannowski U, Pyka M, Schneider-Hassloff H, Drexler R, Krug A, Sommer J, Rietschel M, Witt SH, Kircher T (2018) Outgroup emotion processing in the vACC is modulated by childhood trauma and CACNA1C risk variant. *Soc Cogn Affect Neurosci* 13:341–348.
- Krug A, Nieratschker V, Markov V, Krach S, Jansen A, Zerres K, Eggermann T, Stöcker T, Shah NJ, Treutlein J, Mühleisen TW, Kircher T (2010) Effect of CACNA1C rs1006737 on neural correlates of verbal fluency in healthy individuals. *Neuroimage* 49:1831–1836.
- Kuan CY, Schloemer AJ, Lu A, Burns KA, Weng WL, Williams MT, Strauss KI, Vorhees C V., Flavell RA, Davis RI, Sharp FR, Rakic P (2004) Hypoxia-ischemia induces DNA synthesis without cell proliferation in dying neurons in adult rodent brain. *J Neurosci* 24:10763–10772.
- Kuhn HG, Toda T, Gage FH (2018) Adult Hippocampal Neurogenesis: A Coming-of-Age Story. *J Neurosci* 38:10401–10410.
- Kumar M, Kim S, Pickup S, Chen R, Fairless AH, Ittyerah R, Abel T, Brodtkin ES, Poptani H (2012) Longitudinal in-vivo diffusion tensor imaging for assessing brain developmental changes in BALB/cJ mice, a model of reduced sociability relevant to autism. *Brain Res* 1455:56–67.
- Kumar V, Bhat ZA, Kumar D (2013) Animal models of anxiety: A comprehensive review. *J Pharmacol Toxicol Methods* 68:175–183.
- Kummer K, Sabine K, Eggart V, J. Mayr M, Saria A, Zernig G (2011) Conditioned place preference for social interaction in rats: contribution of sensory components. *Front Behav Neurosci* 5:1–5.
- Kummer KK, Hofhansel L, Barwitz CM, Schardl A, Prast JM, Salti A, El Rawas R, Zernig G (2014) Differences in social interaction- vs. cocaine reward in mouse vs. rat. *Front Behav Neurosci* 8:1–7.
- LaFollette MR, O’Haire ME, Cloutier S, Blankenberger WB, Gaskill BN (2017) Rat tickling: A systematic review of applications, outcomes, and moderators. *PLoS One* 12:e0175320.
- Lee AS, De Jesús-Cortés H, Kabir ZD, Knobbe W, Orr M, Burgdorf C, Huntington P, McDaniel L, Britt JK, Hoffmann F, Brat DJ, Rajadhyaksha AM, Pieper AA (2016) The Neuropsychiatric Disease-Associated Gene cacna1c Mediates Survival of Young Hippocampal Neurons. *eNeuro* 3:1–11.
- Lee AS, Ra S, Rajadhyaksha AM, Britt JK, De Jesus-Cortes H, Gonzales KL, Lee A, Moosmang S, Hofmann F, Pieper AA, Rajadhyaksha AM (2012) Forebrain elimination of cacna1c mediates anxiety-like behavior in mice. *Mol Psychiatry* 17:1054–1055.

- Lenington S (1983) Social preferences for partners carrying 'good genes' in wild house mice. *Anim Behav* 31:325–333.
- Liao P, Soong TW (2010) CaV1.2 channelopathies: From arrhythmias to autism, bipolar disorder, and immunodeficiency. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 460:353–359.
- Lichtenstein P, Yip BH, Björk C, Pawitan Y, Cannon TD, Sullivan PF, Hultman CM (2009) Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. *Lancet* 373:234–239.
- Lieberwirth C, Wang Z (2012) The Social Environment and Neurogenesis in the Adult Mammalian Brain. *Front Hum Neurosci* 6:1–19.
- Lindzey G, Winston H, Manosevitz M (1961) Social dominance in inbred mouse strains. *Nature* 191:474–476.
- Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G, Ma L (2003) Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. *Exp Neurol* 183:600–609.
- Lucassen PJ, Stumpel MW, Wang Q, Aronica E (2010) Decreased numbers of progenitor cells but no response to antidepressant drugs in the hippocampus of elderly depressed patients. *Neuropharmacology* 58:940–949.
- Lukas M, Wöhr M (2015) Endogenous vasopressin, innate anxiety, and the emission of pro-social 50-kHz ultrasonic vocalizations during social play behavior in juvenile rats. *Psychoneuroendocrinology* 56:35–44.
- Mahmoudian J, Hadavi R, Jeddi-Tehrani M, Mahmoudi AR, Bayat AA, Shaban E, Vafakhah M, Darzi M, Tarahomi M, Ghods R (2011) Comparison of the photobleaching and photostability traits of Alexa fluor 568- and fluorescein isothiocyanate- conjugated antibody. *Cell J* 13:169–172.
- Malkesman O, Scattoni ML, Paredes D, Tragon T, Pearson B, Shaltiel G, Chen G, Crawley JN, Manji HK (2010) The Female Urine Sniffing Test: A Novel Approach for Assessing Reward-Seeking Behavior in Rodents. *Biol Psychiatry* 67:864–871.
- Mandyam CD, Koob GF (2012) The addicted brain craves new neurons: Putative role for adult-born progenitors in promoting recovery. *Trends Neurosci* 35:250–260.
- Marschallinger J, Sah A, Schmuckermair C, Unger M, Rotheneichner P, Kharitonova M, Waclawiczek A, Gerner P, Jaksch-Bogensperger H, Berger S, Striessnig J, Singewald N, Couillard-Despres S, Aigner L (2015) The L-type calcium channel Cav1.3 is required for proper hippocampal neurogenesis and cognitive functions. *Cell Calcium* 58:606–616.
- Mazzucco CA, Lieblich SE, Bingham BI, Williamson MA, Viau V, Galea LAM (2006) Both estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$  agonists enhance cell proliferation in the dentate gyrus of adult female rats. *Neuroscience* 141:1793–1800.
- McCullough LD, de Vries GJ, Miller VM, Becker JB, Sandberg K, McCarthy MM (2014) NIH initiative to balance sex of animals in preclinical studies: generative questions to guide policy, implementation, and metrics. *Biol Sex Differ* 5:15.
- McGuffin P, Rijdsdijk F, Andrew M, Sham P, Katz R, Cardno A (2003) The Heritability of Bipolar Affective Disorder and the Genetic Relationship to Unipolar Depression. *Arch Gen Psychiatry* 60:497.
- McKinney BC, Sze W, White JA, Murphy GG (2008) L-type voltage-gated calcium channels in conditioned fear: A genetic and pharmacological analysis. *Learn Mem* 15:326–334.
- Meyer-Lindenberg A, Tost H (2012) Neural mechanisms of social risk for psychiatric disorders. *Nat Neurosci* 15:663–668.
- Micheli L, Ceccarelli M, Andrea GD, Tirone F (2018) Depression and adult neurogenesis: Positive effects of the antidepressant fluoxetine and of physical exercise. *Brain Res Bull* 143:181–193.

- Michels S, Dolga AM, Braun MD, Kisko TM, Sungur AÖ, Witt SH, Rietschel M, Dempfle A, Wöhr M, Schwarting RKW, Culmsee C (2019) Interaction of the Psychiatric Risk Gene *Cacna1c* With Post-weaning Social Isolation or Environmental Enrichment Does Not Affect Brain Mitochondrial Bioenergetics in Rats. *Front Cell Neurosci* 13:1–14.
- Michels S, Ganjam GK, Martins H, Schratt GM, Wöhr M, Schwarting RKW, Culmsee C (2018a) Downregulation of the psychiatric susceptibility gene *Cacna1c* promotes mitochondrial resilience to oxidative stress in neuronal cells. *Cell Death Discov* 4:54.
- Michels S, Wöhr M, Schwarting RK, Culmsee C (2018b) Psychiatric risk gene *Cacna1c* determines mitochondrial resilience against oxidative stress in neurons. *Cell Death Dis* 9:645.
- Millan MJ et al. (2012) Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy. *Nat Rev Drug Discov* 11:141–168.
- Ming G, Song H (2005) Adult Neurogenesis in the Mammalian Central Nervous System. *Annu Rev Neurosci* 28:223–250.
- Ming G, Song H (2011) Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70:687–702.
- Moon AL, Haan N, Wilkinson LS, Thomas KL, Hall J (2018) *CACNA1C*: Association With Psychiatric Disorders, Behavior, and Neurogenesis. *Schizophr Bull* 44:958–965.
- Moosmang S, Haider N, Klugbauer N, Adelsberger H, Langwieser N, Müller J, Stieß M, Marais E, Schulla V, Lacinova L, Goebbels S, Nave K-A, Storm DR, Hofmann F, Kleppisch T (2005) Role of Hippocampal *Cav1.2*  $Ca^{2+}$  Channels in NMDA Receptor-Independent Synaptic Plasticity and Spatial Memory. *J Neurosci* 25:9883–9892.
- Morris RGM (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn Motiv* 12:239–260.
- Moskal JR, Burgdorf J, Kroes RA, Brudzynski SM, Panksepp J (2011) A novel NMDA receptor glycine-site partial agonist, GLYX-13, has therapeutic potential for the treatment of autism. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1982–1988.
- Moskvina V, Craddock N, Holmans P, Nikolov I, Pahwa JS, Green E, Owen MJ, O'Donovan MC (2009) Gene-wide analyses of genome-wide association data sets: evidence for multiple common risk alleles for schizophrenia and bipolar disorder and for overlap in genetic risk. *Mol Psychiatry* 14:252–260.
- Mullins N, Lewis CM (2017) Genetics of Depression: Progress at Last. *Curr Psychiatry Rep* 19:43.
- Muth JN, Varadi G, Schwartz A (2001) Use of transgenic mice to study voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels. *Trends Pharmacol Sci* 22:526–532.
- Nagao T, Kuwagata M, Saito Y (1998) Effects of prenatal exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine on the developing brain and reproductive function in male mouse offspring. *Reprod Toxicol* 12:477–487.
- Nagy AI, Ormerod BK, Mazzucco C, Galea LAM (2005) Estradiol-induced enhancement in cell proliferation is mediated through estrogen receptors in the dentate gyrus of adult female rats. *Drug Dev Res* 66:142–149.
- Natusch C, Schwarting RKW (2010) Using bedding in a test environment critically affects 50-kHz ultrasonic vocalizations in laboratory rats. *Pharmacol Biochem Behav* 96:251–259.
- Nieratschker V, Brückmann C, Plewnia C (2015) *CACNA1C* risk variant affects facial emotion recognition in healthy individuals. *Sci Rep* 5:17349.
- Nöthen MM, Degenhardt F, Forstner AJ (2019) Durchbrüche im Verständnis der molekularen Ursachen psychiatrischer Störungen. *Nervenarzt* 90:99–106.
- Nyegaard M, Demontis D, Foldager L, Hedemand A, Flint TJ, Sørensen KM, Andersen PS, Nordentoft M, Werge T, Pedersen CB, Hougaard DM, Mortensen PB, Mors O, Børglum AD (2010) *CACNA1C* (rs1006737) is associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry*

- 15:119–121.
- O'Dushlaine C et al. (2015) Psychiatric genome-wide association study analyses implicate neuronal, immune and histone pathways. *Nat Neurosci* 18:199–209.
- O'Leary OF, Cryan JF (2009) The Tail-Suspension Test: A Model for Characterizing Antidepressant Activity in Mice. In: *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice* (Gould TD, Hrsg), S. 119–137. Totowa, NJ: Humana Press.
- OECD/EU (2018) Health at a Glance: Europe 2018: State of Health in the EU Cycle.
- Olton DS, Samuelson RJ (1976) Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 2:97–116.
- Ou X, Crane DE, MacIntosh BJ, Young LT, Arnold P, Ameis S, Goldstein BI (2015) CACNA1C rs1006737 genotype and bipolar disorder: Focus on intermediate phenotypes and cardiovascular comorbidity. *Neurosci Biobehav Rev* 55:198–210.
- Panksepp J (1981) The ontogeny of play in rats. *Dev Psychobiol* 14:327–332.
- Panksepp J (2005) Affective consciousness: Core emotional feelings in animals and humans. *Conscious Cogn* 14:30–80.
- Panksepp J, Burgdorf J (2000) 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: Effects of social housing and genetic variables. *Behav Brain Res* 115:25–38.
- Panksepp J, Burgdorf J (2003) “Laughing” rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiol Behav* 79:533–547.
- Panksepp J, Gordon N, Burgdorf J (2002) Empathy and the action-perception resonances of basic socio-emotional systems of the brain. *Behav Brain Sci* 25:43–44.
- Parsana AJ, Li N, Brown TH (2012) Positive and negative ultrasonic social signals elicit opposing firing patterns in rat amygdala. *Behav Brain Res* 226:77–86.
- Pasparakis E, Koiliari E, Zouraraki C, Tsapakis E-M, Roussos P, Giakoumaki SG, Bitsios P (2015) The effects of the CACNA1C rs1006737 A/G on affective startle modulation in healthy males. *Eur Psychiatry* 30:492–498.
- Paulus FM, Bedenbender J, Krach S, Pyka M, Krug A, Sommer J, Mette M, Nöthen MM, Witt SH, Rietschel M, Kircher T, Jansen A (2014) Association of rs1006737 in CACNA1C with alterations in prefrontal activation and fronto-hippocampal connectivity. *Hum Brain Mapp* 35:1190–1200.
- Pellis SM, Pellis VC (2007) Rough and tumble play and the development of the social brain. *Curr Dir Psychol Sci* 16:95–98.
- Pereira M, Andreatini R, Schwarting RKW, Brenes JC (2014) Amphetamine-induced appetitive 50-kHz calls in rats: a marker of affect in mania? *Psychopharmacology (Berl)* 231:2567–2577.
- Perrier E, Pompei F, Ruberto G, Vassos E, Collier D, Frangou S (2011) Initial evidence for the role of CACNA1C on subcortical brain morphology in patients with bipolar disorder. *Eur Psychiatry* 26:135–137.
- Pettersson E et al. (2019) Genetic influences on eight psychiatric disorders based on family data of 4 408 646 full and half-siblings, and genetic data of 333 748 cases and controls – CORRIGENDUM. *Psychol Med* 49:351–351.
- Pieper AA et al. (2010) Discovery of a Proneurogenic, Neuroprotective Chemical. *Cell* 142:39–51.
- Pieper AA, Wu X, Han TW, Estill SJ, Dang Q, Wu LC, Reece-Fincannon S, Dudley CA, Richardson JA, Brat DJ, McKnight SL (2005) The neuronal PAS domain protein 3 transcription factor controls FGF-mediated adult hippocampal neurogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci* 102:14052–14057.

- Popović N, Giménez de Béjar V, Caballero-Bleda M, Popović M (2017) Verapamil Parameter- and Dose-Dependently Impairs Memory Consolidation in Open Field Habituation Task in Rats. *Front Pharmacol* 7:3–8.
- Portfors C V (2007) Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 46:28–34.
- Powell TR, Fernandes C, Schalkwyk LC (2011) Depression-Related Behavioral Tests. *Curr Protoc Mouse Biol* 2:119–127.
- Prince M, Patel V, Saxena S, Maj M, Maselko J, Phillips MR, Rahman A (2007) No health without mental health. *Lancet* 370:859–877.
- Pultorak JD, Kelm-Nelson CA, Holt LR, Blue KV, Ciucci MR, Johnson AM (2016) Decreased approach behavior and nucleus accumbens immediate early gene expression in response to Parkinsonian ultrasonic vocalizations in rats. *Soc Neurosci* 11:365–379.
- Quirk GJ, Beer JS (2006) Prefrontal involvement in the regulation of emotion: convergence of rat and human studies. *Curr Opin Neurobiol* 16:723–727.
- Radua J, Surguladze SA, Marshall N, Walshe M, Bramon E, Collier DA, Prata DP, Murray RM, McDonald C (2013) The impact of CACNA1C allelic variation on effective connectivity during emotional processing in bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 18:526–527.
- Riecher-Rössler A (2017) Sex and gender differences in mental disorders. *The Lancet Psychiatry* 4:8–9.
- Ripke S et al. (2011) Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet* 43:969–976.
- Ripke S et al. (2014) Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511:421–427.
- Rippberger H, van Gaalen M, Schwarting R, Wöhr M (2015) Environmental and Pharmacological Modulation of Amphetamine-Induced 50-kHz Ultrasonic Vocalizations in Rats. *Curr Neuropharmacol* 13:220–232.
- Rosati B, Yan Q, Lee MS, Liou S-R, Ingalls B, Foell J, Kamp TJ, McKinnon D (2011) Robust L-type calcium current expression following heterozygous knockout of the Cav1.2 gene in adult mouse heart. *J Physiol* 589:3275–3288.
- Roussos P et al. (2014) A Role for Noncoding Variation in Schizophrenia. *Cell Rep* 9:1417–1429.
- Roussos P, Giakoumaki SG, Georgakopoulos A, Robakis NK, Bitsios P (2011) The CACNA1C and ANK3 risk alleles impact on affective personality traits and startle reactivity but not on cognition or gating in healthy males. *Bipolar Disord* 13:250–259.
- Sadananda M, Wöhr M, Schwarting RKW (2008) Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. *Neurosci Lett* 435:17–23.
- Saito Y, Okanoya K (2017) Response characteristics of the rat anterior cingulate cortex to ultrasonic communicative vocalizations. *Neuroreport* 28:479–484.
- Salamone JD, Correa M (2012) The Mysterious Motivational Functions of Mesolimbic Dopamine. *Neuron* 76:470–485.
- Sales GD (1972) Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. *Anim Behav* 20:88–100.
- Samuels BA, Hen R (2011) Neurogenesis and affective disorders. *Eur J Neurosci* 33:1152–1159.
- Sandin S, Lichtenstein P, Kuja-Halkola R, Hultman C, Larsson H, Reichenberg A (2017) The Heritability of Autism Spectrum Disorder. *JAMA* 318:1182.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. *Science* 301:805–809.

- Sarkar SN, Huang R-Q, Logan SM, Yi KD, Dillon GH, Simpkins JW (2008) Estrogens directly potentiate neuronal L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci* 105:15148–15153.
- Saxena K, Webster J, Hallas-Potts A, Mackenzie R, Spooner PA, Thomson D, Kind P, Chatterji S, Morris RGM (2018) Experiential contributions to social dominance in a rat model of fragile-X syndrome. *Proc R Soc B Biol Sci* 285:20180294.
- Schlick B, Flucher BE, Obermair GJ (2010) Voltage-activated calcium channel expression profiles in mouse brain and cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 167:786–798.
- Schwarting RKW, Jegan N, Wöhr M (2007) Situational factors, conditions and individual variables which can determine ultrasonic vocalizations in male adult Wistar rats. *Behav Brain Res* 182:208–222.
- Seffer D, Rippberger H, Schwarting RKW, Wöhr M (2015) Pro-social 50-kHz ultrasonic communication in rats: post-weaning but not post-adolescent social isolation leads to social impairments—phenotypic rescue by re-socialization. *Front Behav Neurosci* 9:102.
- Seffer D, Schwarting RKW, Wöhr M (2014) Pro-social ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. *J Neurosci Methods* 234:73–81.
- Seger S, Stritt M, Vezzali E, Nayler O, Hess P, Groenen PMA, Stalder AK (2018) A fully automated image analysis method to quantify lung fibrosis in the bleomycin-induced rat model. *PLoS One* 13:1–12.
- Seibenhener ML, Wooten MC (2015) Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *J Vis Exp*:1–6.
- Seisenberger C, Specht V, Welling A, Platzer J, Pfeifer A, Kühbandner S, Striessnig J, Klugbauer N, Feil R, Hofmann F (2000) Functional Embryonic Cardiomyocytes after Disruption of the L-type  $\alpha 1C$  (Cav1.2) Calcium Channel Gene in the Mouse. *J Biol Chem* 275:39193–39199.
- Shansky RM (2019) Are hormones a “female problem” for animal research? *Science* 364:825–826.
- Shohayeb B, Diab M, Ahmed M, Ng DCH (2018) Factors that influence adult neurogenesis as potential therapy. *Transl Neurodegener* 7:4.
- Sigurdsson T, Duvarci S (2016) Hippocampal-Prefrontal Interactions in Cognition, Behavior and Psychiatric Disease. *Front Syst Neurosci* 9:1–18.
- Silverman JL, Yang M, Lord C, Crawley JN (2010) Behavioural phenotyping assays for mouse models of autism. *Nat Rev Neurosci* 11:490–502.
- Sinnegger-Brauns MJ, Huber IG, Koschak A, Wild C, Obermair GJ, Einzinger U, Hoda JC, Sartori SB, Striessnig J (2009) Expression and 1,4-dihydropyridine-binding properties of brain L-type calcium channel isoforms. *Mol Pharmacol* 75:407–414.
- Sklar P et al. (2008) Whole-genome association study of bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 13:558–569.
- Sklar P et al. (2011) Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nat Genet* 43:977–985.
- Snigdha S, Neill JC (2008) Efficacy of antipsychotics to reverse phencyclidine-induced social interaction deficits in female rats—A preliminary investigation. *Behav Brain Res* 187:489–494.
- Snyder JS (2019) Recalibrating the Relevance of Adult Neurogenesis. *Trends Neurosci* 42:164–178.
- Snyder JS, Choe JS, Clifford MA, Jeurling SI, Hurley P, Brown A, Kamhi JF, Cameron HA (2009a) Adult-Born Hippocampal Neurons Are More Numerous, Faster Maturing, and More Involved in Behavior in Rats than in Mice. *J Neurosci* 29:14484–14495.
- Snyder JS, Radik R, Wojtowicz JM, Cameron HA (2009b) Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: Young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus* 19:360–370.

- Soeiro-de-Souza MG, Bio DS, Dias VV, Vieta E, Machado-Vieira R, Moreno RA (2013) The CACNA1C risk allele selectively impacts on executive function in bipolar type I disorder. *Acta Psychiatr Scand* 128:362–369.
- Soeiro-de-Souza MG, Lafer B, Moreno RA, Nery FG, Chile T, Chaim K, da Costa Leite C, Machado-Vieira R, Otaduy MCG, Vallada H (2017) The CACNA1C risk allele rs1006737 is associated with age-related prefrontal cortical thinning in bipolar I disorder. *Transl Psychiatry* 7:e1086.
- Soeiro-de-Souza MG, Otaduy MCG, Dias CZ, Bio DS, Machado-Vieira R, Moreno RA (2012) The impact of the CACNA1C risk allele on limbic structures and facial emotions recognition in bipolar disorder subjects and healthy controls. *J Affect Disord* 141:94–101.
- Spencer CM, Serysheva E, Yuva-Paylor LA, Oostra BA, Nelson DL, Paylor R (2006) Exaggerated behavioral phenotypes in Fmr1/Fxr2 double knockout mice reveal a functional genetic interaction between Fragile X-related proteins. *Hum Mol Genet* 15:1984–1994.
- Splawski I, Timothy KW, Decher N, Kumar P, Sachse FB, Beggs AH, Sanguinetti MC, Keating MT (2005) Severe arrhythmia disorder caused by cardiac L-type calcium channel mutations. *Proc Natl Acad Sci* 102:8089–8096.
- Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT (2004) CaV1.2 Calcium Channel Dysfunction Causes a Multisystem Disorder Including Arrhythmia and Autism. *Cell* 119:19–31.
- Steel Z, Marnane C, Iranpour C, Chey T, Jackson JW, Patel V, Silove D (2014) The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980–2013. *Int J Epidemiol* 43:476–493.
- Stranahan AM, Khalil D, Gould E (2006) Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. *Nat Neurosci* 9:526–533.
- Striessnig J, Pinggera A, Kaur G, Bock G, Tuluc P (2014) L-type Ca<sup>2+</sup> channels in heart and brain. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 3:15–38.
- Stritt M, Roman B, Marrie J, Vezzali E, Weber E, Stalder A (2011) Supervised Machine Learning Methods for Quantification of Pulmonary Fibrosis. In: 6th International Conference on Advances in Mass Data Analysis of Images and Signals in Medicine, Biotechnology, Chemistry and Food Industry.
- Strohmaier J, Amelang M, Hothorn LA, Witt SH, Nieratschker V, Gerhard D, Meier S, Wüst S, Frank J, Loerbroks A, Rietschel M, Stürmer T, Schulze TG (2013) The psychiatric vulnerability gene CACNA1C and its sex-specific relationship with personality traits, resilience factors and depressive symptoms in the general population. *Mol Psychiatry* 18:607–613.
- Sullivan PF, Franzcp MD, Daly MJ, O'Donovan M (2014) Genetic Architectures of Psychiatric Disorders: The Emerging Picture and Its Implications. *Nat Rev Genet* 13:537–551.
- Sungur AÖ, Schwarting RKW, Wöhr M (2016) Early communication deficits in the Shank1 knockout mouse model for autism spectrum disorder: Developmental aspects and effects of social context. *Autism Res* 9:696–709.
- Sungur AÖ, Stemmler L, Wöhr M, Rust MB (2018) Impaired Object Recognition but Normal Social Behavior and Ultrasonic Communication in Cofilin1 Mutant Mice. *Front Behav Neurosci* 12:1–11.
- Sykes L, Clifton NE, Hall J, Thomas KL (2018a) Regulation of the Expression of the Psychiatric Risk Gene *Cacna1c* during Associative Learning. *Mol Neuropsychiatry* 4:149–157.

- Sykes L, Haddon J, Lancaster TM, Sykes A, Azzouni K, Ihssen N, Moon AL, Lin T-CE, Linden DE, Owen MJ, O'Donovan MC, Humby T, Wilkinson LS, Thomas KL, Hall J (2018b) Genetic Variation in the Psychiatric Risk Gene CACNA1C Modulates Reversal Learning Across Species. *Schizophr Bull*:1–9.
- Takeuchi H et al. (2018) A Common CACNA1C Gene Risk Variant has Sex-Dependent Effects on Behavioral Traits and Brain Functional Activity. *Cereb Cortex*:1–9.
- Taupin P (2007) BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* 53:198–214.
- Temme SJ, Bell RZ, Fisher GL, Murphy GG (2016) Deletion of the Mouse Homolog of CACNA1C Disrupts Discrete Forms of Hippocampal-Dependent Memory and Neurogenesis within the Dentate Gyrus. *eNeuro* 3.
- Terrillion CE, Dao DT, Cachope R, Lobo MK, Puche AC, Cheer JF, Gould TD (2017a) Reduced levels of Cacna1c attenuate mesolimbic dopamine system function. *Genes, Brain Behav* 16:495–505.
- Terrillion CE, Francis TC, Puche AC, Lobo MK, Gould TD (2017b) Decreased Nucleus Accumbens Expression of Psychiatric Disorder Risk Gene Cacna1c Promotes Susceptibility to Social Stress. *Int J Neuropsychopharmacol* 20:428–433.
- Tesli M, Egeland R, Søndersby IE, Haukvik UK, Bettella F, Hibar DP, Thompson PM, Rimol LM, Melle I, Agartz I, Djurovic S, Andreassen OA (2013) No evidence for association between bipolar disorder risk gene variants and brain structural phenotypes. *J Affect Disord* 151:291–297.
- Thibault O, Gant JC, Landfield PW (2007) Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store. *Aging Cell* 6:307–317.
- Thimm M, Kircher T, Kellermann T, Markov V, Krach S, Jansen A, Zerres K, Eggermann T, Stöcker T, Shah NJ, Nöthen MM, Rietschel M, Witt SH, Mathiak K, Krug A (2011) Effects of a CACNA1C genotype on attention networks in healthy individuals. *Psychol Med* 41:1551–1561.
- Thomas DA, Barfield RJ (1985) Ultrasonic vocalization of the female rat (*Rattus norvegicus*) during mating. *Anim Behav* 33:720–725.
- Toda T, Parylak SL, Linker SB, Gage FH (2018) The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Mol Psychiatry*:1–21.
- van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999a) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci* 96:13427–13431.
- van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999b) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2:266–270.
- Vanderschuren LJMJ, Achterberg EJM, Trezza V (2016) The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 70:86–105.
- Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA, Yang J (2017) 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet* 101:5–22.
- Völkening B, Schönig K, Kronenberg G, Bartsch D, Weber T (2017) Deletion of psychiatric risk gene Cacna1c impairs hippocampal neurogenesis in cell-autonomous fashion. *Glia* 65:817–827.
- von Bohlen und Halbach O (2011) Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res* 345:1–19.
- Vorhees CV, Williams MT (2014) Assessing Spatial Learning and Memory in Rodents. *ILAR J* 55:310–332.
- Walf AA, Frye CA (2009) Using the Elevated Plus Maze as a Bioassay to Assess the Effects of Naturally Occurring and Exogenously Administered Compounds to Influence Anxiety-Related Behaviors of Mice. In: *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice* (Gould TD, Hrsg), S. 225–246. Totowa, NJ: Humana Press.

- Wang F, McIntosh AM, He Y, Gelernter J, Blumberg HP (2011a) The association of genetic variation in CACNA1C with structure and function of a frontotemporal system. *Bipolar Disord* 13:696–700.
- Wang F, Zhu J, Zhu H, Zhang Q, Lin Z, Hu H (2011b) Bidirectional Control of Social Hierarchy by Synaptic Efficacy in Medial Prefrontal Cortex. *Science* 334:693–697.
- Wendler E, de Souza CP, Vecchia DD, Kanazawa LKS, de Almeida Soares Hocayen P, Wöhr M, Schwarting RKW, Andreatini R (2016) Evaluation of 50-kHz ultrasonic vocalizations in animal models of mania: Ketamine and lisdexamfetamine-induced hyperlocomotion in rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 26:1900–1908.
- White JA, McKinney BC, John MC, Powers P a, Kamp TJ, Murphy GG (2008) Conditional forebrain deletion of the L-type calcium channel Ca V 1.2 disrupts remote spatial memories in mice. *Learn Mem* 15:1–5.
- White NR, Cagiano R, Moises AU, Barfield RJ (1990) Changes in mating vocalizations over the ejaculatory series in rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 104:255–262.
- Williams MT, Vorhees CV (2006) Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc* 1:848–858.
- Willner P (1984) The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology (Berl)* 83:1–16.
- Willuhn I, Tose A, Wanat MJ, Hart AS, Hollon NG, Phillips PEM, Schwarting RKW, Wöhr M (2014) Phasic Dopamine Release in the Nucleus Accumbens in Response to Pro-Social 50 kHz Ultrasonic Vocalizations in Rats. *J Neurosci* 34:10616–10623.
- Witt SH et al. (2014) Analysis of genome-wide significant bipolar disorder genes in borderline personality disorder. *Psychiatr Genet* 24:262–265.
- Wittchen HU, Jacobi F, Rehm J, Gustavsson A, Svensson M, Jönsson B, Olesen J, Allgulander C, Alonso J, Faravelli C, Fratiglioni L, Jennum P, Lieb R, Maercker A, van Os J, Preisig M, Salvador-Carulla L, Simon R, Steinhausen H-C (2011) The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 21:655–679.
- Wöhr M (2018) Ultrasonic communication in rats: appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations as social contact calls. *Behav Ecol Sociobiol* 72:14.
- Wöhr M, Borta A, Schwarting RKW (2005) Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: A dose-response study in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 84:228–240.
- Wöhr M, Houx B, Schwarting RKW, Spruijt B (2008) Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiol Behav* 93:766–776.
- Wöhr M, Kehl M, Borta A, Schänzer A, Schwarting RKW, Höglinger GU (2009) New insights into the relationship of neurogenesis and affect: Tickling induces hippocampal cell proliferation in rats emitting appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Neuroscience* 163:1024–1030.
- Wöhr M, Krach S eds. (2017) *Social Behavior from Rodents to Humans*. Cham: Springer International Publishing.
- Wöhr M, Rippberger H, Schwarting RKW, van Gaalen MM (2015) Critical involvement of 5-HT<sub>2C</sub> receptor function in amphetamine-induced 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 232:1817–1829.
- Wöhr M, Scattoni ML (2013) Behavioural methods used in rodent models of autism spectrum disorders: Current standards and new developments. *Behav Brain Res* 251:5–17.
- Wöhr M, Schwarting RKW (2007) Ultrasonic Communication in Rats: Can Playback of 50-kHz Calls Induce Approach Behavior? *PLoS One* 2:e1365.
- Wöhr M, Schwarting RKW (2008a) Ultrasonic calling during fear conditioning in the rat: no evidence for an audience effect. *Anim Behav* 76:749–760.

- Wöhr M, Schwarting RKW (2008b) Maternal Care, Isolation-Induced Infant Ultrasonic Calling, and Their Relations to Adult Anxiety-Related Behavior in the Rat. *Behav Neurosci* 122:310–330.
- Wöhr M, Schwarting RKW (2010a) Rodent ultrasonic communication and its relevance for models of neuropsychiatric disorders. *e-Neuroforum* 16:71–80.
- Wöhr M, Schwarting RKW (2010b) Activation of limbic system structures by replay of ultrasonic vocalization in rats. In: *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Brudzynski SM, Hrsg), S. 113–124. Academic Press.
- Wöhr M, Schwarting RKW (2012) Testing social acoustic memory in rats: Effects of stimulus configuration and long-term memory on the induction of social approach behavior by appetitive 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Neurobiol Learn Mem* 98:154–164.
- Wöhr M, Schwarting RKW (2013) Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. *Cell Tissue Res* 354:81–97.
- Wöhr M, Seffer D, Schwarting RKW (2016) Studying Socio-Affective Communication in Rats through Playback of Ultrasonic Vocalizations. In: *Current Protocols in Neuroscience*, S. 8.35.1-8.35.17. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Wojtowicz JM, Kee N (2006) BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat Protoc* 1:1399–1405.
- World Health Organization (2004) ICD-10: International statistical classification of diseases and related health problems: tenth revision, 2nd ed. World Health Organization.
- Wright JM, Gourdon JC, Clarke PBS (2010) Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology (Berl)* 211:1–13.
- Yau S, Li A, So K (2015) Involvement of Adult Hippocampal Neurogenesis in Learning and Forgetting. *Neural Plast* 2015:1–13.
- Yee N, Schwarting RKW, Fuchs E, Wöhr M (2012a) Juvenile stress potentiates aversive 22-kHz ultrasonic vocalizations and freezing during auditory fear conditioning in adult male rats. *Stress* 15:533–544.
- Yee N, Schwarting RKW, Fuchs E, Wöhr M (2012b) Increased affective ultrasonic communication during fear learning in adult male rats exposed to maternal immune activation. *J Psychiatr Res* 46:1199–1205.
- Yoshimizu T, Pan JQ, Mungenast AE, Madison JM, Su S, Ketterman J, Ongur D, McPhie D, Cohen B, Perlis R, Tsai LH (2015) Functional implications of a psychiatric risk variant within CACNA1C in induced human neurons. *Mol Psychiatry* 20:162–169.
- Zamponi GW (2015) Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases. *Nat Publ Gr* 15:19–34.
- Zanos P, Bhat S, Terrillion CE, Smith RJ, Tonelli LH, Gould TD (2015) Sex-dependent modulation of age-related cognitive decline by the L-type calcium channel gene *Cacna1c* (*Cav1.2*). *Eur J Neurosci* 42:2499–2507.
- Zernig G, Pinheiro BS (2015) Dyadic social interaction inhibits cocaine-conditioned place preference and the associated activation of the accumbens corridor. *Behav Pharmacol* 26:580–594.
- Zhang F, Lupski JR (2015) Non-coding genetic variants in human disease. *Hum Mol Genet* 24:R102–R110.
- Zhang Q, Chen J, Qin Y, Wang J, Zhou L (2018) Mutations in voltage-gated L-type calcium channel: Implications in cardiac arrhythmia. *Channels* 12:201–218.
- Zhang Q, Shen Q, Xu Z, Chen M, Cheng L, Zhai J, Gu H, Bao X, Chen X, Wang K, Deng X, Ji F, Liu C, Li J, Dong Q, Chen C (2012) The effects of CACNA1C gene polymorphism on spatial working memory in both healthy controls and patients with schizophrenia or bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 37:677–684.

- Zhou M, Li W, Huang S, Song J, Kim JY, Tian X, Kang E, Sano Y, Liu C, Balaji J, Wu S, Zhou Y, Zhou Y, Parivash SN, Ehninger D, He L, Song H, Ming G, Silva AJ (2013) mTOR Inhibition Ameliorates Cognitive and Affective Deficits Caused by Disc1 Knockdown in Adult-Born Dentate Granule Neurons. *Neuron* 77:647–654.
- Zhu Y, Zhou R, Yang R, Zhang Z, Bai Y, Chang F, Li L, Sokabe M, Goltzman D, Miao D, Chen L (2012) Abnormal neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice lacking 1,25-dihydroxy vitamin D3 (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). *Hippocampus* 22:421–433.

## 6 ANHANG

### 6.1 Nomenklatur

<i>CACNA1C</i>	Symbol für das Gen beim Menschen
<i>Cacnal1c</i>	Symbol für das Gen bei Tiermodellen
<i>Cacnal1c<sup>+/+</sup></i>	Tier mit vollständiger Kopie von <i>Cacnal1c</i> auf beiden Allelen (Wildtyp)
<i>Cacnal1c<sup>+/-</sup></i>	Tier mit Deletion von <i>Cacnal1c</i> auf einem Allel (Heterozygot)
<i>Cacnal1c<sup>-/-</sup></i>	Tier mit Deletion von <i>Cacnal1c</i> auf beiden Allelen (Knockout)

### 6.2 Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung/ Übersetzung
ACC	Anteriorer cingulärer Cortex
AHN	Adulte hippocampale Neurogenese
AMPH	Aphetamin
ANOVA	Varianzanalyse (engl. „Analysis of variance“)
ASD	Autismus-Spektrum-Störung (engl. „Autism spectrum disorder“)
BDNF	Vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (engl. „Brain-derived neurotrophic factor“)
bp	Basenpaare
BPD	Bipolare Störung (engl. „Bipolar disorder“)
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
CA1-3	Sektor 1-3 des Cornu ammonis
Cc	Corpus callosum
Cg1	Cingulärer Cortex Areal 1
Cg2	Cingulärer Cortex Areal 2
Ci	Cingulum
Cl	Clastrum
CPP	Konditionierte Platzpräferenz (engl. „Conditioned place preference“)
DCX	Doublecortin
DG	Gyrus dentatus (engl. „Dentate gyrus“)
dHC	Dorsaler Hippocampus
DSM-5	Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen 5 (engl. „Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5“)
DTI	Diffusions-Tensor-Bildgebung (engl. „Diffusion tensor imaging“)

EPM	Erhöhtes Plus-Labyrinth (engl. „Elevated plus maze“)
fCA1-3	Feld des CA1-3 (engl. „field of CA1-CA3“)
FM	Frequenzmoduliert
FST	Erzwungener Schwimmtest (engl. „Forced-Swim-Tests“)
FUST	Weiblicher Urin Riechtest (engl. „Female urine sniffing test“)
FXS	Fragiles-X Syndrom
GCL	Granularzellschicht (engl. „Granule cell layer“)
GFAP	Saures Gliafaserprotein (engl. „Glial fibrillary acidic protein“)
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
Hi	Hilus
IL	Infralimbischer Cortex
I. p.	Intraperitoneal
Ki-67	Kiel 67
LDT	Hell/Dunkel Test (engl. „Light/dark test“)
LTP	Langzeit-Potenzierung
MDD	Majore Depression (engl. „Major depressive disorder“)
Mo	Medialer orbitaler Cortex
Mol	Molekularschicht
mPFC	Medialer präfrontaler Cortex
mRNA	Boten-RNA (engl. „Messenger RNA“)
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Engl. „Mammalian target of rapamycin“
MWM	Morris-Wasserlabyrinth (engl. „Morris Water maze“)
NAc	Nucleus accumbens
NIH	National Institute of Health
OF	Offenfeldtest (engl. „Open field test“)
PFC	Präfrontaler Cortex
PGC	Psychiatric Genomics Consortium
PND	Postnatal Tag (engl. „Postnatal day“)
poly I:C	Polyinosinic-polycytidylic-Säure
PrL	Prälimbischer Cortex
PSA-NCAM	Polysialysiertes neurales Zelladhäsionsmolekül (engl. „Polysialylated neural-cell-adhesion molecule“)

RAM	Radialarmlabyrinth (engl. „Radial arm maze“)
RL	Umkehrlernen (engl. „Reversal learning“)
SCZ	Schizophrenie
SGZ	Subgranuläre Zone
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. „Single nucleotide polymorphism“)
SSRI	Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (engl. „Serotonin reuptake inhibitor“)
SVZ	Subventrikuläre Zone
TS	Timothy-Syndrom
TST	Schwanz-Suspensions-Test (engl. „Tail suspension test“)
USV	Ultraschallvokalisation
vACC	Ventraler anteriorer cingulärer Cortex
vHC	Ventraler Hippocampus

---

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: 50-kHz Ultraschallvokalisationen, die von weiblichen adulten <i>Cacna1c</i> <sup>+/+</sup> Ratten aufgenommen wurden .....	15
Abbildung 2: Schematische Darstellung der adulten hippocampalen Neurogenese bei Ratten (angepasst nach Mandyam und Koob, 2012) .....	28
<i>Anmerkung: die Abbildung wurde hinsichtlich der Abkürzung für den Hilus (Hi) und der gezeigten Zellmarker modifiziert.</i>	
Abbildung 3: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Dissertation .....	113

## 7 DANKSAGUNG

Im Allgemeinen ist eine Dissertation ein großes Vorhaben, welches nur durch die Zusammenarbeit vieler Personen abgeschlossen werden kann, daher möchte ich mich bei all den wunderbaren Menschen bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Markus Wöhr bedanken, der mir als Betreuer stets mit wissenschaftlichem Rat zur Seite stand, mein Interesse für die translationale Forschung an genetischen Nagetiermodellen förderte und mich stets zu motivieren wusste, wenn es diverse Hürden zu überwinden galt.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Rainer Schwarting, der mich bereits zu Beginn meines Studiums für die Verhaltensneurowissenschaften begeistern konnte, mir eine lehrreiche Zeit als „El Cheffe“ in der AG Schwarting ermöglichte und mich in meiner akademischen Laufbahn tatkräftig unterstützt.

Ein großes Dankschön richte ich an die jetzigen und ehemaligen Mitglieder der AG Schwarting Dr. Özge Sungur, Moria Braun, Dr. Liana Melo-Thomas, Maria Willadsen, Nivethini Sangarapillai, Martina Brähler-Haupt, Rukshona Kayumova, Annuska Berz und Dr. Theresa Kisko für die gemeinsame lehrreiche Zeit und die vielen wissenschaftlichen und privaten Unternehmungen der letzten Jahre.

Ein großer Dank geht an meine beiden Mitstreiter und Freunde Henning Krug und Markus Ebeling, die mir beide eine große Stütze während der Doktorandenphase waren. Ganz herzlich bedanke ich mich an dieser Stelle bei Dr. Dominik Seffer und Dr. Bradley van Paridon für ihre wertvollen Kommentare während des Schreibprozesses meiner Dissertation.

Zudem möchte ich mich bei den Studierenden, studentischen Hilfskräften und Praktikanten/innen Sophia Estel, Jens Hensen, Ingmar Conell, Ezgi Esen, Cüneyt Yildiz, Rebekka Obermeier, Darius Dietrich, Lars Tacke, Stephan Weingarten und Marco Bartz bedanken, die mich durch ihre Hilfe bei der Datenanalyse im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten und Tätigkeiten tatkräftig unterstützt haben.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Prof. Dr. Winfried Rief, der mir als Leiter des IPAMs im Rahmen des Marburger Modells eine Verknüpfung meiner Forschung mit der klinischen Weiterbildung zum psychologischen Psychotherapeuten ermöglichte.

## Danksagung

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Prof. Dr. Thomas Redecker und Andrea Steinhauer mit ihren jeweiligen Ehepartnern Claudia Dependahl und Matthias Steinhauer, meinen Geschwistern Tim Redecker, Lucas Redecker und Lara Redecker sowie meiner gesamten „Patchwork“ Familie, die mich jederzeit in dieser herausfordernden Phase unterstützen. Vielen lieben Dank an Robin Formanski für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Einen besonderen Dank richte ich an dieser Stelle an meine Partnerin Anh Thi Rodehuts Kors, die alle Höhen und Tiefen mit mir durchgestanden hat. Ich möchte auch meine Freunde erwähnen und bedanke mich für ihr Verständnis, wenn diese Arbeit zwischendurch an erster Stelle stand.

## **8 LEBENSLAUF**

Seite 146 enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Teil der elektronischen Publikation.

Seite 147 enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Teil der elektronischen Publikation.

Seite 148 enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Teil der elektronischen Publikation.

Seite 149 enthält persönliche Daten und ist deshalb nicht Teil der elektronischen Publikation.

## 9 ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation:

### „Effekte der *Cacnal1c* Haploinsuffizienz auf Sozialverhalten und adulte hippocampale Neurogenese bei Ratten“

selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Tobias Manuel Redecker