

Aus dem Institut für Anatomie  
Abteilung Neuroanatomie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Auswirkungen des Duftstoffes 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazolin auf das  
räumliche Lernverhalten und die mRNA Expression von cFos und dem  
Corticotropin Releasing Factor in einem Glutamat-Decarboxylase67 -  
Mausmodell**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Vorgelegt von Anja Stefanie Peine (geb. Kintzel)

aus Berlin

Magdeburg 2016

Für meinen inneren Schweinehund  
und  
Meine kleine Familie  
- Markus, Theodor und Alfred -

„Sometimes the questions are complicated and the answers are simple.“ (Dr. Seuss)

### Bibliographische Beschreibung

Peine, Anja Stefanie:

#### **Auswirkungen des Duftstoffes 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazolin auf das räumliche Lernverhalten und die mRNA Expression von c-Fos und dem Corticotropin Releasing Factor in einem Glutamat-Decarboxylase67-Mausmodell**

- 2016. - 92 Bl.: 26 Abb.

Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Dissertation

### Kurzreferat

Diese Arbeit untersucht die in der Neurowissenschaft gern eingesetzte Glutamat Decarboxylase 67kD Isoform (GAD67)-Mauslinie hinsichtlich des räumlichen Lernverhaltens im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (WT) und fragt nach möglichen Unterschieden in der Aktivierung von Stress-assoziierten Hirnarealen und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse. Bei GAD67-Mäusen ist ein GAD67-Allel durch den Einbau eines GFP-Allels, das unter dem Promoter des GAD67-Gens exprimiert wird, ausgeknockt. GAD67 ist ein Enzym, das für die Synthese von GABA, einem sehr wichtigen inhibitorischen Neurotransmitter, notwendig ist. Durch das Fehlen eines GAD67-Allels exprimieren die GAD67-Mäuse weniger GAD67 und synthetisieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nur halb so viel GABA. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels eines Radial-Arm-Labyrinths untersucht, ob sich die GAD67-Mäuse im räumlichen Lernverhalten von ihren WT-Wurfgeschwistern unterscheiden. Weiterhin wurde ermittelt, ob die Einwirkung von Stress mittels 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazolin (TMT) einen Einfluss auf das Abrufen des räumlichen Gedächtnisses hat. Mit Hilfe der quantitativen realtime-PCR erfolgte die Bestimmung der c-Fos und CRF-mRNA-Expression im ventralen Bulbus olfactorius (vBO), im Bettkern der Stria terminalis (BNST), dem periventriculären Nucleus des Hypothalamus (PVN), Amygdala, Hippocampus und Locus coeruleus (LC). Die Kortikosteronbestimmung zur Ermittlung des Stresslevels erfolgte aus dem Serum der Tiere. Im Vergleich zwischen GAD67 und WT-Tieren konnte gezeigt werden: 1) im Lernverhalten gibt es keinen Unterschied zwischen beiden Mausstämmen, 2) TMT verändert die räumliche Gedächtnisleistung unabhängig von Geschlecht oder Genotyp, 3) es kommt zu einer stärkeren Aktivierung des BNST bei männlichen GAD67-Tieren und einer geringeren Kortikosteronausschüttung, 4) GAD67-Tiere machen unter dem Kontrollduft mehr Fehler. Die Ergebnisse zeigen, dass GAD67-Tiere sich mit wenigen Einschränkungen nicht von den WT unterscheiden und somit ein geeignetes Mausmodell für die Verhaltensforschung darstellen.

### Schlüsselwörter

Amygdala, BNST, c-Fos, CRF, GABA, GAD67, Hippocampus, HPAA, PVN, Radial-Arm-Labyrinth, Stress, TMT

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Allgemeine Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2. Lernen und Gedächtnis</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2.1. Radial Arm Labyrinth</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2.2. Hippocampus</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2.3. Amygdala</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3. GABA</b> .....	<b>9</b>
<b>1.4. Stress</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4.1. TMT</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4.2. Riechbahn</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4.3. CRF und Hypothalamus – Hypophyse – Nebennierenrinden – Achse</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4.4. c-Fos</b> .....	<b>16</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1. Mausmodell</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2. Genotypisierung</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3. Duftstoff</b> .....	<b>18</b>
<b>2.4. Kortikosteron</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5. 8-Arm-Radiallabyrinth</b> .....	<b>19</b>
<b>2.6. Versuchsablauf</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6.1. Habituation im Labyrinth</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6.2. Räumliches Lernen</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6.3. Habituation in der Geruchsbox</b> .....	<b>22</b>
<b>2.6.4. Geruchsexposition und anschließendes räumliches Lernen</b> .....	<b>22</b>
<b>2.7. Isolation der Hirnareale</b> .....	<b>23</b>
<b>2.8. RNA-Isolierung und qrt-PCR</b> .....	<b>23</b>
<b>2.9. Statistik</b> .....	<b>24</b>
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1. Verhalten im Radial-Arm-Labyrinth</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1.1. Versuchstag 1-5 (Training) nach Geschlecht</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1.2. Räumliches Lernen vor Duftstoffexposition Versuchstage 1-5</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1.3. Laufzeit</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.4. Räumliches Lernen nach Duftstoffexposition (Versuchstag 6)</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2. mRNA-Expression</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2.1. Expression der CRF mRNA mittels qrt-PCR</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2.2. Expression der c-Fos-mRNA mittels qrt-PCR</b> .....	<b>36</b>

3.3. Kortikosteronkonzentration im Stammb Blut .....	41
4. Diskussion .....	43
5. Zusammenfassung.....	55
6. Literaturverzeichnis .....	57
7. Anhang.....	74
7.1. Danksagung.....	74
7.2. Erklärung .....	75
7.3. Persönliche Daten.....	77
8. Anlagen.....	79
8.1. Protokolle .....	79

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BLA	Basolaterale Amygdala
BNST	Bed Nucleus of the Stria terminalis - Bettkern
CA	Cornu ammonis
CeA	Zentraler Teil der zentromedialen Nuclei der Amygdala
CeL	Lateraler Teil der zentromedialen Nuclei der Amygdala
CeM	Medialer Teil der zentromedialen Nuclei der Amygdala
Cer	Cerebellum
CCK	Cholezystokinin
CRF	Corticotropin-Releasing-Factor – Corticotropin-freisetzender Faktor
DEP	Diethylphthalat
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GAD	Glutamat Decarboxylase
GAD65	Glutamat Decarboxylase 65kD Isoform
GAD67	Glutamat Decarboxylase 67kD Isoform
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HPAA	Hypothalamus – Hypophysen – Nebennierenrinden – Achse
IEG	Immediate early gene
LC	Locus coeruleus
m	Männlich
Mes	Mesencephalon
PLP	Pyridoxalphosphat
PVN	paraventriculärer Nucleus des Hypothalamus
PTSD	Posttraumatische Belastungsstörung
RAM	Radial-Arm-Labyrinth
RT-PCR	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion
TMT	2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazolin
vBO, dBO	ventraler und dorsaler Bulbus olfactorius
VIP	Vasointestinales Peptid
w	Weiblich
WT	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Schematische Darstellung des Radial-Arm-Labyrinthes.....	Seite 5
<b>Abbildung 2:</b>	Verarbeitung unterschiedlicher angstauslösender Stimuli mit unterschiedlichem Outcome	Seite 9
<b>Abbildung 3:</b>	Riechleitung beim Menschen.....	Seite 14
<b>Abbildung 4:</b>	Synthese von c-Fos.....	Seite 17
<b>Abbildung 5:</b>	Das verwendete Radial-Arm-Labyrinth.....	Seite 20
<b>Abbildung 6:</b>	Versuchsablauf räumliches Lernen.....	Seite 21
<b>Abbildung 7:</b>	Anzahl <i>Working Memory Error</i> Versuchstag 1-5 nach Genotyp und Geschlecht.....	Seite 25
<b>Abbildung 8:</b>	Anzahl <i>New Arm Entries</i> Versuchstag 1-5 nach Genotyp und Geschlecht.....	Seite 26
<b>Abbildung 9:</b>	Anzahl <i>Working Memory Error</i> und <i>New Arm Entries</i> Versuchstag 1-5 nach Genotyp.....	Seite 26
<b>Abbildung 10:</b>	Vergleich <i>Working Memory Error</i> im Vergleich der Versuchstage nach Genotyp.....	Seite 27
<b>Abbildung 11:</b>	Anzahl <i>New Arm Entries</i> nach Genotyp.....	Seite 28
<b>Abbildung 12:</b>	Laufzeit und Aktivität über die ersten fünf Versuchstage nach Genotyp.....	Seite 28
<b>Abbildung 13:</b>	Vergleich Anzahl <i>Working Memory Error</i> vor und nach Exposition nach Genotyp.....	Seite 29
<b>Abbildung 14:</b>	Vergleich <i>New Arm Entries</i> vor und nach Exposition nach Genotyp.....	Seite 30
<b>Abbildung 15:</b>	Laufzeit und Aktivität vor und nach Exposition nach Genotyp.....	Seite 30
<b>Abbildung 16:</b>	CRF-mRNA mit GAPDH als housekeeper-Gen.....	Seite 32
<b>Abbildung 17:</b>	CRF-mRNA mit $\beta$ -actin als housekeeper-Gen.....	Seite 34
<b>Abbildung 18:</b>	CRF-mRNA mit GAPDH und $\beta$ -actin als housekeeper-Gen im BNST.....	Seite 35
<b>Abbildung 19:</b>	CRF-mRNA mit GAPDH und $\beta$ -actin als housekeeper-Gen im LC.....	Seite 35
<b>Abbildung 20:</b>	C-Fos-mRNA mit GAPDH als housekeeper-Gen.....	Seite 37
<b>Abbildung 21:</b>	C-Fos-mRNA mit $\beta$ -actin als housekeeper-Gen.....	Seite 39
<b>Abbildung 22:</b>	C-Fos-mRNA mit GAPDH und $\beta$ -actin als housekeeper-Gen im BNST.....	Seite 40
<b>Abbildung 23:</b>	C-Fos-mRNA mit GAPDH und $\beta$ -actin als housekeeper-Gen im Hippocampus.....	Seite 40
<b>Abbildung 24:</b>	Kortikosterongehalt nach DEP- und TMT-Exposition nach Genotyp.....	Seite 41
<b>Abbildung 25:</b>	Kortikosterongehalt nach DEP- und TMT-Exposition nach Geschlecht.....	Seite 42
<b>Abbildung 26:</b>	Schnittebenen zur Entnahme der Hirnareale.....	Seite 82

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemeine Einleitung

Der Duftstoff 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) ist ein Bestandteil von Fuchskot. Dieses TMT wird inzwischen synthetisch hergestellt und häufig eingesetzt um Stress und unconditionierte Angst bei Nagetieren auszulösen. Präsentiert man naiven Mäusen diesen Duftstoff TMT, zeigen diese ein charakteristisches Verhalten wie z. B. *Freezing*. (Morrow *et al.*, 2000; Hebb, 2002; Fendt *et al.*, 2003; Buron *et al.*, 2007; Janitzky *et al.*, 2009)

TMT beeinflusst das Lernverhalten sowie Gedächtnisprozesse und aktiviert in spezifischer Art das limbische System wie die Amygdala, den Bettkern der Stria terminalis (BNST) und den paraventriculären Nucleus des Hypothalamus (PVN) sowie die downstream-Ziele im Hirnstamm (Fendt *et al.*, 2003; Figueiredo *et al.*, 2003; Day, H. E. W. *et al.*, 2004a; Fendt *et al.*, 2005; Myers and Rinaman, 2005; Müller and Fendt, 2006; Janitzky *et al.*, 2011; Hacquemand *et al.*, 2012). Es ist bekannt, dass das Maß an Stress darüber entscheidet, ob das Lernen positiv oder negativ beeinflusst wird. Jeder war schon einmal in einer stressigen Situation und hat die Erfahrung gemacht, dass er entweder eine großartige Leistung abrufen konnte (wie z.B. der Sportler in einem Wettkampf auch wenn das Training die Tage zuvor miserabel war) oder überhaupt nicht leistungsfähig war (z.B. ein Student in einer Prüfung, der vor einem Prüfer sitzt, den er fürchtet und ein sogenanntes „Blackout“ hat).

Kortikosteron spielt bei diesen Prozessen eine bedeutende Rolle. Es gibt jedoch Hinweise, dass auch Corticotropin Releasing Factor (CRF) bei der Beeinflussung der Gedächtnisleistung bedeutsam ist (Hsu *et al.*, 1998; Ferry *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012; Lozano *et al.*, 2013; Lucas *et al.*, 2013). CRF ist ein Neuropeptid, das die physiologische Antwort und das Verhalten auf Stress koordiniert. Dies geschieht durch die Aktivierung limbischer Strukturen, die mit Angst und Furcht in Verbindung gebracht werden wie die Amygdala und den BNST. Der BNST ist eine komplexe und heterogene Struktur, die in die Kontrolle der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPAA) und das Angstverhalten involviert ist. Nagetiere, die dem Duftstoff TMT ausgesetzt werden, zeigen eine gesteigerte neuronale Aktivierung des BNST, was durch das *immediate-early-gene* c-Fos angezeigt wird. Der BNST erhält Projektionen von der Amygdala, genauer gesagt aus dem zentralen Nucleus der Amygdala (CeA). Die Neurone in der CeA exprimieren sowohl GABA als auch CRF. Die Bedeutung von CRF im BNST und für das Angstverhalten ist bereits teilweise bekannt. CRF-Neurone im BNST sind vornehmlich GABAerg und exprimieren auch die



Glutamat-Decarboxylase 67kD Isoform (GAD67). Neurone aus dem BNST haben inhibitorische Projektionen zum PVN, sodass erhöhte CRF-Level im BNST wahrscheinlich wichtig sind für die Stress-induzierte Modulation der HPA-Achse (Champagne *et al.*, 1998; Kudo *et al.*, 2012; Dabrowska *et al.*, 2013; Sink *et al.*, 2013). Bei Zuständen wie Angst und Furcht scheint der GABAerge und CRF-Input zum BNST entscheidend für die Funktion des Nucleus und die Art des BNST-Outputs verantwortlich zu sein. Bei akutem Stress wird die Expression von GAD67 induziert, sodass angenommen werden kann, dass Veränderungen im GAD67-Gen zu einer Beeinflussung der komplexen Interaktion der GABA- und CRF-exprimierenden Neurone in der CeA, dem BNST und dem PVN führt und somit das Angstverhalten verändert.

In dieser Untersuchung beschäftigte ich mich mit der Auswirkung von durch TMT ausgelösten Stress auf das räumliche Lernen von Mäusen. Duftstoffe natürlicher Feinde sind als moderate Stressfaktoren geeignet, da sie eine angeborene Furchtreaktion hervorrufen und somit gut reproduzierbar sind. Diese Untersuchungen wurden an einer genetisch veränderten Mauslinie durchgeführt. In diesen Mäusen ist im Allel der GAD67 ein Gen für ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) eingebaut, das unter Kontrolle des GAD67-Promotors steht und markiert somit alle GABAergen Neurone (Tamamaki *et al.*, 2003). Als Kontrolle wurden C57Bl/6 (WT) Geschwistermäuse verwendet. Die GAD67-Tiere exprimieren jedoch nur halb so viel GAD67 wie die Wildtyp-Tiere. Diese GAD67-knockout Mäuse werden in verschiedenen Untersuchungen einschließlich in der Verhaltensforschung eingesetzt. Doch bislang gibt es nur wenige Untersuchungen zu möglichen Unterschieden zu WT-Tieren.

Neben der Untersuchung des Verhaltens wurde die mRNA-Expression von *c-Fos*, einem *immediate-early-gene*, und CRF in Hirnregionen bestimmt, welche für die olfaktorische Reizverarbeitung und für die Verarbeitung von Stress notwendig sind. Dies erfolgte mit Hilfe der quantitativen RT-PCR. Es wurden hier männliche und weibliche Tiere untersucht, um mögliche Geschlechtsunterschiede im Verhalten und der Genexpression zu ermitteln. Um das Stresslevel der Tiere einschätzen zu können, wurde die Kortikosteron-Konzentration im Serum bestimmt. Es ist bekannt, dass GABA regulatorisch auf die CRF-Ausschüttung im PVN wirkt. Somit wurde ebenfalls untersucht, ob sich Wildtyp- und transgene Mäuse bezüglich des Stresslevels unter TMT-induziertem Stress unterscheiden. Da bei den transgenen Mäusen ein GAD-Allel für die GABA-Produktion ausgeknockt ist, könnten sich diese Tiere bezüglich der CRF-Ausschüttung und konsekutiven Stressantwort von WT-Tieren unterscheiden.

## 1.2. Lernen und Gedächtnis

Das Gedächtnis ist eine Grundvoraussetzung für das Lernen. Gedächtnis kann als Merk- und Erinnerungsfähigkeit auf Grundlage von Engrammbildung beschrieben werden. Lernen wird definiert als Vermehrung individuellen Wissens mit anhaltender positiver oder negativer Verhaltensänderung (Pschyrembel, 2007). Die Plastizität der synaptischen Verbindungen bildet dabei eine entscheidende Grundlage für die Gedächtnisbildung und somit für das Lernen.

Das Gedächtnis wird unterteilt in ein sensorisches Gedächtnis, das in den Sinnesorganen entsteht; das Kurzzeitgedächtnis, das nach derzeitiger Erkenntnis im Hippocampus repräsentiert ist; und das Langzeitgedächtnis, das in den Assoziationscortices abgebildet wird (Klinke *et al.*, 2005). Dabei ist das sensorische Gedächtnis das kurzlebigste mit einer Dauer von <1s. Es handelt sich um den Informationsgehalt, den das Sinnesorgan ungefiltert aufnimmt und unter anderem an den Hippocampus und die Amygdala weiterleitet. Dort findet eine Selektion der Information nach Relevanz statt. Diese gefilterte Information gelangt in das Kurzzeitgedächtnis, das eine zeitliche Kapazität von einigen Sekunden bis Minuten hat. Eine Unterform des Kurzzeitgedächtnisses ist das Arbeitsgedächtnis, bei dem der präfrontale Kortex eine bedeutende Funktion hat. Es gibt dem Organismus die Möglichkeit, sich den individuellen Gegebenheiten der Situation anzupassen (Klinke *et al.*, 2005). Beim Übergang von Wissen aus dem Kurzzeit- in das Langzeitgedächtnis gibt es die Modelle der Langzeitpotenzierung (LTP) und der Langzeitdepression (LTD), die beschreiben, welche Vorgänge dazu führen, dass Wissen konsolidiert wird. Das Langzeitgedächtnis hat einen Bestand von Stunden, Tagen, Jahren bis hin zum lebenslänglichen Wissen. Qualitativ lässt sich das Gedächtnis unterscheiden in Faktenwissen (explizit, deklarativ), welches sich in ein semantisches (Weltwissen, von der Person unabhängiges Wissen) und ein episodisches (Tatsachen aus dem eigenen Leben wie Geburtsdatum und -ort) unterteilt. Zum anderen in das Fähigkeitswissen (implizit, nicht-deklarativ), das häufig unbewusst abgerufen wird und wiederum unterteilt werden kann. Man unterscheidet das prozedurale Gedächtnis (automatisierte Handlungsabläufe, wie Fahrradfahren), die Bahnung (Ergänzung unvollständiger Objekte oder Wörter), nicht assoziatives Lernen (Habituation) und assoziatives Lernen (Pawlow'sche Konditionierung).

Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass die Schaltkreise des expliziten und impliziten Gedächtnisses weitgehend unabhängig voneinander fungieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass Faktenwissen vorwiegend über Hippocampus, ento- und perirhinalen Kortex, präfrontalen Kortex, Gyrus cinguli und Ncll. anteriores et dorsomedialis thalami vermittelt wird. Wohingegen das Fähigkeitswissen über Amygdala und Corpus striatum realisiert wird (Baddeley, 2003; Klinke *et al.*,

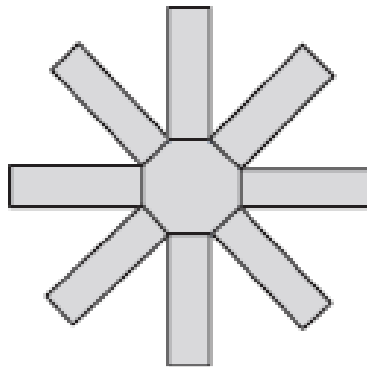
2005). Um das räumliche Lernen zu untersuchen, wurden im Laufe der Zeit verschiedene Verhaltensmodelle entwickelt. Die bekanntesten sind das Radial-Arm-Labyrinth (RAM) und das Morris watermaze.

### 1.2.1. Radial Arm Labyrinth

Das Radial-Arm-Labyrinth (RAM) wurde 1976 von Olton und Samuelson entwickelt, um das räumliche Lernen und die Fähigkeit zur Gedächtnisbildung bei Ratten zu untersuchen (Olton and Samuelson, 1976). Der ursprüngliche Aufbau hatte 8 gleich gebaute Arme, die von einer zentralen Plattform ausgingen (siehe Abb. 1). Am Ende eines jeden Armes war Futter versteckt. Nach jedem Besuch eines Armes musste das Tier zunächst zur zentralen Plattform zurück, um sich dann für einen neuen Arm zu entscheiden. Inzwischen wurden auch RAM-Versuche durchgeführt mit drei bis hin zu 48 Armen (Cole and Chappell-Stephenson, 2003; Dubreuil *et al.*, 2003). Daneben gibt es Versuchsvariationen, die nicht jeden Arm belohnen, sondern nur bestimmte Arme (z.B. nur jeden zweiten). Auf diese Weise lernen die Tiere bestimmte Arme zu ignorieren (Jarrard, 1978). Neben dem RAM gibt es noch verschiedene andere Versuchsaufbauten, um Lernleistungen von Ratten und Mäusen zu testen:

- Lashley III Maze – untersucht wird räumliches Lernen (Blizard *et al.*, 2006; Bressler *et al.*, 2010)
- Passiv Avoidance - untersucht wird das assoziative Lernen (Nategh *et al.*, 2016; Shiga *et al.*, 2016)
- Spatial Water Maze - diese Versuchsanordnung setzt die Schwimffähigkeit der Tiere voraus. Auch hier wird das räumliche Lernen untersucht (Bensalem *et al.*, 2016; Tong *et al.*, 2016).
- Konditionierung nach Pawlow
- Open Field Test of Exploration - je nach Versuchsanordnung kann hiermit das Angstverhalten oder assoziatives Lernen untersucht werden (Pavlova and Rysakova, 2015).

War das RAM zunächst nur für Ratten entwickelt und getestet worden, weil man annahm, dass Mäuse derartige Zusammenhänge nicht lernen könnten, so wurde 1983 ein RAM für Mäuse entwickelt und gezeigt, dass auch Mäuse mit einigen Abweichungen derartige Lernleistungen erbringen können (Pick and Yanai, 1983; Matzel *et al.*, 2003; Tarragon *et al.*, 2012). Vorteil des RAM ist, dass ein natürliches Suchverhalten der Tiere ausgenutzt wird. Im Gegensatz dazu sind Versuchsanordnungen wie das Morris Water Maze unnatürlich, da Ratten und besonders Mäuse Angst vor Wasser haben und dieses in der freien Wildbahn meiden.



**Abbildung 1**

Schematische Darstellung des Radial-Arm-Labyrinthes nach Olton. Abbildung aus Terragon et al. 2012

In einigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Tiere verschiedene Mechanismen entwickeln, um das Labyrinth zu absolvieren. Häufig fand sich ein Ablaufen des Labyrinthes im oder gegen den Uhrzeigersinn (Crusio and Schwegler, 2005). Des Weiteren fand sich das Ablaufen nach einer bestimmten Sequenz (z.B. immer den gegenüberliegenden Arm oder immer vom selben Arm aus startend) (Mandolesi *et al.*, 2009). Die Orientierung an Umweltstimuli in der Umgebung ist möglich, was in meinen Experimenten beim räumlichen Lernen eingesetzt wurde. Zuletzt konnte auch gezeigt werden, dass Tiere eine „mapping-Strategie“ entwickelten, bei der eine interne Repräsentation der Umwelt erstellt wird (Packard *et al.*, 1989; Jarrard, 1993; Stupien *et al.*, 2003). Dabei spielen sogenannte „place“-Zellen im Hippocampus eine Rolle.

### 1.2.2. Hippocampus

Als eine wichtige Region für das Lernen soll hier der Hippocampus näher beschrieben werden. Der Hippocampus ist ein Teil des limbischen Systems, welches aus verschiedenen Kortexarealen, Kerngebieten und Fasersystemen besteht, die saumförmig um das Dienzephalon angeordnet sind und daher auch seinen Namen hat (lat. Limbus = Saum). Der Name des Hippocampus leitet sich vom Seepferdchen ab, da er in der Form einem Seepferdchen ähnelt. Der Hippocampus ist entwicklungsgeschichtlich ein älterer Gehirnabschnitt, der als Allocortex bezeichnet wird und einen spezifischen histologischen Aufbau aufweist (Stratum moleculare, Stratum radiatum, Stratum lucidum, Stratum pyramidale und Stratum oriens). Der Gyrus dentatus zeigt einen etwas modifizierten Aufbau mit Stratum moleculare, Stratum granulare und Stratum multiforme.

Man kann den Hippocampus in rostro-kaudaler Richtung topographisch in 3 Abschnitte unterteilen. Dabei unterscheidet man einen ventralen, intermediären und einen dorsalen Abschnitt, wobei die exakte anatomische Begrenzung bislang nicht genau definiert werden konnte (Fanselow and Dong, 2010). So konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass der dorsale Hippocampus mehr für kognitive Aspekte von Angst und Gedächtnisbildung eine Rolle zu spielen scheint, währenddessen

der ventrale Hippocampus die emotionalen und im Zusammenhang mit diesem Ereignis stehenden Aspekte verarbeitet. (Fanselow and Dong, 2010; Müller *et al.*, 2012)

Der Hippocampus erhält unterschiedliche Afferenzen, vorwiegend glutamaterg, überwiegend über den Tractus perforans mit Axonen aus dem entorhinalen Kortex. Über den Tractus perforans erreichen die Afferenzen die Dendriten der Körnerzellen in der Molekularschicht des Gyrus dentatus. Diese unipolaren Körnerzellen besitzen wiederum Afferenzen, die als Moosfasern bezeichnet werden, die in CA3 glutamaterg die Dendriten der Pyramidenzellen im Stratum lucidum erreichen. Die Axone der Pyramidenzellen erreichen zum einen als Efferenzen über die Fimbria hippocampi die nachgeschalteten Zentren: Kortex, Hypothalamus, Amygdala und die Corpora mamillaria. Ein anderer, größerer Teil erreicht als Schaffer-kollateralen die Dendriten der Pyramidenzellen in CA1 und Subiculum, die nun wiederum über Synapsen auf den Axonen des Tr. perforans modulierend wirken. Aufgrund dieser trisynaptischen, kettenartigen Verschaltung wird auch von einem unidirektionalen Schaltkreis gesprochen.

Eine entscheidende Rolle spielt der Hippocampus für das Arbeits- und Langzeitgedächtnis (Duarte-Guterman *et al.*, 2015). Im Hinblick auf das räumliche Gedächtnis konnte gezeigt werden, dass die Neurogenese im Gyrus dentatus maßgebend ist (Winocur *et al.*, 2006). Im Hinblick auf die Regulation der Gedächtniskonsolidierung konnte gezeigt werden, dass die Amygdala stark involviert ist, indem sie die neuronale Plastizität vor allem im Hippocampus beeinflusst (Ferry *et al.*, 1999). Wie bereits bekannt ist, ist die Amygdala unabdingbar für die Entstehung von Emotionen. Die bestehende Beeinflussung durch die Amygdala unterstützt die Theorie, dass die Stärke einer Erinnerung im Verhältnis zu ihrer emotionalen Signifikanz reguliert wird (Ferry *et al.*, 1999).

### **1.2.3. Amygdala**

Die Amygdala ist eine entscheidende Region für das olfaktorische Gedächtnis und Teil des limbischen Systems. Die Amygdala wurde als erstes von Burdach im frühen 19. Jahrhundert entdeckt und beschrieben. Sie befindet sich im ventralen, anteriomedialen Teil des Temporallappens und besteht aus mehreren Kerngruppen. Derzeit sind 13 Kerngebiete bekannt, die nochmals in Untergruppen unterteilt werden und innerhalb der Untergruppen selbst als auch zwischen den Kerngruppen vielfältige Verbindungen aufweisen (Swanson and Petrovich, 1998; Sah *et al.*, 2003; Gross and Canteras, 2012). Die Kerngruppen und Unterkerne werden unterteilt nach Zytoarchitektur, Histochemie und Verbindungen zu anderen Kerngebieten. (Swanson and Petrovich, 1998; Sah *et al.*, 2003)

Im Folgenden werden einige wichtige Kerne für diese Arbeit vorgestellt. Diese Regionen sind die phylogenetisch alte kortikomediale Gruppe und die jüngere basolaterale Gruppe (BLA). Die

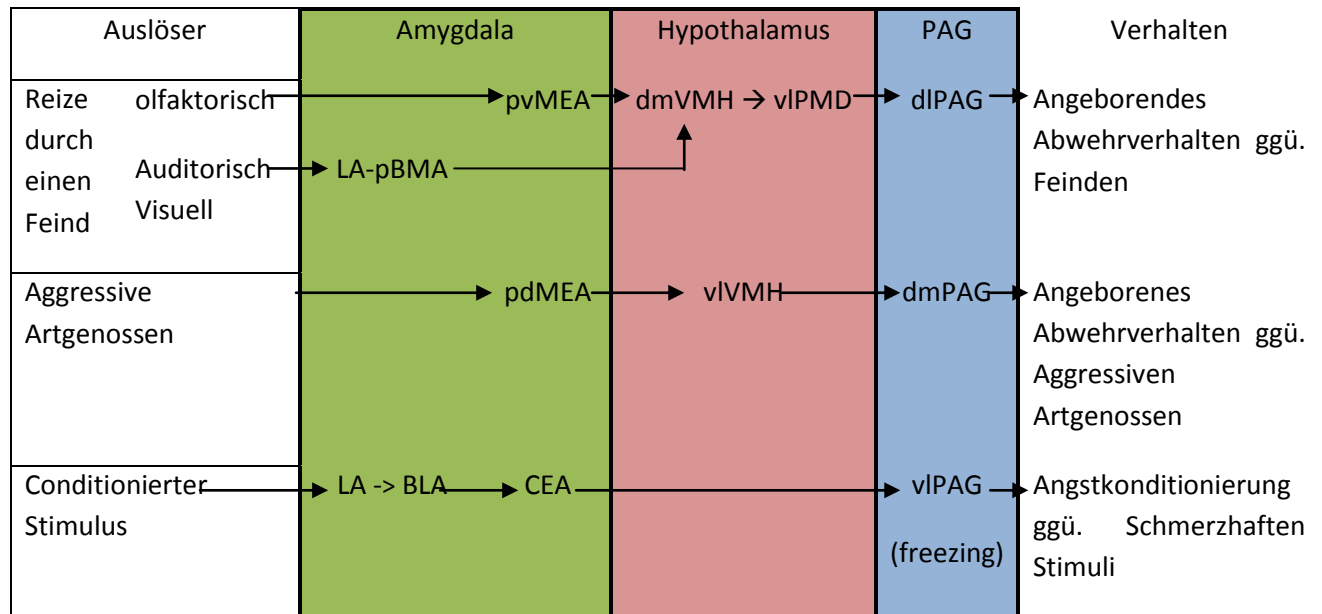
kortikomediale Gruppe kann nochmals in eine oberflächliche Gruppe von Nuclei unterteilt werden und in eine centromediale Kerngruppe. Die centromediale besteht aus einem zentralen (CeA), einem medialen (CeM) und dem amygdaloiden Teil des BNST. (Sah *et al.*, 2003) Die zentromediale Gruppe erhält Efferenzen aus dem Bulbus olfactorius und ist selbst Ursprung der Stria terminalis. Die basolaterale Gruppe hat Verbindungen zum präpiriformen und entorhinalen Cortex und damit Input u.a. aus dem optischen und akustischen System. Über die Stria terminalis (vorwiegend peptiderg) ist die Amygdala mit den Septumkernen, der Regio praeoptica und weiteren Kernen des Hypothalamus verbunden. Durch Verbindung der Stria terminalis mit der Stria medullaris besteht zudem Verbindung zu den Habenulakernen.

Die Neurone in der BLA bestehen zum überwiegenden Teil (ca. 80%) aus glutamatergen Neuronen. Die restlichen Neurone sind GABAerge Interneurone. Die zentrale Amygdala (CeA) wird in einen medialen (CeM) und einen lateralen (CeL) Teil unterteilt und enthält ebenfalls GABAerge Neurone. Immunhistochemisch zeigt sich das als Band aus GABAergen Neuronen, das ununterbrochen durch das Striatum läuft. Die CeA ist der primäre Output der Amygdala von der aus durch Efferenzen zum präfrontalen Kortex die Antwort auf Angst und Furcht beeinflusst wird. Die CeA erhält Afferenzen von Thalamus und kortikalen Regionen (Sah *et al.*, 2003). Die BLA hat Projektionen zur CeL. Diese ist wiederum reziprok mit der CeM verbunden, welche über Verbindungen zu Hypothalamus und Hirnstamm ebenfalls die vegetative Antwort auf Angst mitbewirkt. Zwischen BLA und CeA befinden sich GABAerge Neurone, die als Interneurone fungieren und in der CeA im Sinne einer feedforward-Inhibition wirken. Es konnte gezeigt werden, dass es in der CeA „ON“-Zellen und „OFF“-Zellen gibt. Projektionen aus der BLA aktivieren die „ON“-Zellen, die dann wiederum die tonisch aktiven „OFF“-Zellen inhibieren. Bei den „OFF“-Zellen handelt es sich um GABAerge Zellen. Die „OFF“-Zellen projizieren zur CeM, sodass bei einer Aktivierung aus der BLA eine Disinhibition in der CeM entsteht. Der CeA fungiert als output-Nucleus, über ihn gibt es Verbindungen zu Hypothalamus, zentralem Grau und dem dorsalen Nucleus des N.vagus (Rodrigues *et al.*, 2009).

Die Amygdala ist maßgeblich an der Erzeugung von Emotionen, besonders von Angst und Furcht beteiligt. Es gibt derzeit jedoch mehr Arbeiten, die sich mit der Beteiligung der Amygdala an der Erzeugung von Angst beschäftigen, als mit ihren anderen Funktionen, wie z.B. ihrem Einfluss auf Aggression, Sexualverhalten und Nahrungsaufnahme (LeDoux, 2012). Eindrücklich zeigt dies das sogenannte Klüver-Bucy-Syndrom, bei dem eine bilaterale Schädigung des Temporallappens mit Beteiligung der Amygdala vorliegt. Rhesusaffen, die einen solchen Schaden aufweisen, zeigen ein charakteristisches Verhaltensmuster: sie sind ungehemmt in ihrem Sexualtrieb, explorieren alles mit dem Mund, wobei diese Gegenstände auch ungezielt gefressen werden, sie zeigen eine erhöhte Ablenkbarkeit durch visuelle Reize sowie ein fehlendes Angst- und Furchtverhalten. Eine besondere

Rolle bei der Angstkonditionierung scheint die laterale Amygdala (LA) zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass molekulare Veränderungen in der LA zur Konsolidierung des Angstgedächtnisses führt und eine Verletzung der LA zu einer fehlenden Angstkonditionierung (Bahar *et al.*, 2004; Dudai, 2004; Rodrigues *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2009).

Im Alltag werden die Begriffe Angst und Furcht oft synonym gebraucht. In der Wissenschaft hingegen muss zwischen diesen beiden Begriffen unterschieden werden. So handelt es sich bei Angst um ein nicht-objektbezogenes, irrationales Gefühl des Bedroht-seins, wohingegen Furcht ein objektbezogenes, rationales Gefühl ist. In der Psychologie wird Angst als ein Zustand definiert, der dazu führen soll, dass die Situation, die zur Angst führt, beendet wird. Zudem wird hier unterschieden in Angst als irrationalen Zustand und Furcht als rationalen Zustand. So ist der Zustand, der einen vor dem Tiger im Urwald davon laufen lässt Furcht. Kann hingegen kein konkretes Ereignis oder ein Gegenstand benannt werden (z.B. bei einem Gewitter oder der Urwald allgemein ohne Tiger), so spricht man von Angst (Adolphs, 2013; LeDoux, 2013). Es lässt sich weiterhin die angeborene und erlernte Angst unterscheiden. Angeborene Angst vor Fressfeinden bringt einen Überlebensvorteil für eine Spezies. Erlernte Ängste sind z.B. räumliche Assoziationen mit einem Fressfeind. Einige Untersuchungen konnten inzwischen zeigen, dass es verschiedene Schaltkreise für unterschiedliche Arten von Angst gibt; der Angst vor Schmerzen, Angst vor Fressfeinden und Angst vor Aggression von Artgenossen (Gross and Canteras, 2012). In Abb. 2 sind die verschiedenen Schaltkreise dargestellt.



**Abbildung 2 (modifiziert nach Gross und Canteras, 2012)**

Dargestellt sind die parallel verlaufenden Verschaltungen, die die verschiedenen Qualitäten der Angst vermitteln. Es erfolgt eine jeweils unabhängig voneinander verlaufende Verarbeitung. Involviert sind verschiedene Nuclei der Amygdala, der Hypothalamus sowie das periaquäduktale Grau (PAG).

**Beteiligte Strukturen in der Amygdala:** laterale Amygdala (LA), posteriorer Teil der basomedialen Amygdala (pBMA), posteroventraler Teil des medialen Amygdala (pvMEA), posterodorsaler Teil der medialen Amygdala (pdMEA), zentrale Amygdala (CEA)

**Beteiligte Strukturen im Hypothalamus:** ventromedialer Hypothalamus (VMH), dorsomedialer Teil der VMH (dmVMH), ventrolateraler VMH (vVMH), ventrolateraler Teil der PMD (vIPMD), dorsomedialer PMD (dIPMD)

**Beteiligte Strukturen im PAG:** dorsomedialer Teil des PAG (dmPAG), ventrolateraler Teil des PAG (vIPAG)

Über eine direkte Verbindung zwischen Thalamus und Amygdala werden schnelle und ungefilterte Informationen über einen angstausslösenden Stimulus direkt an die Amygdala geleitet, die sich der bewussten Kontrolle entziehen (LeDoux, 1992, 2000). Über cortico-amygdaläre Verbindungen erhält die Amygdala langsamere, jedoch detailliertere Informationen (Rodrigues *et al.*, 2009).

### 1.3. GABA

GABAerge Neurone spielen eine entscheidende Rolle im zentralen Nervensystem, indem sie inhibitorisch und damit regulierend auf andere Neurone wirken. Sie sind von entscheidender Funktion in der Informationsverarbeitung. Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass GABA im Laufe der neocorticalen Gehirnentwicklung in neonatalen Mäusen eine exzitatorische (depolarisierende) und dennoch dämpfende Funktion übernimmt (Kirmse *et al.*, 2015). Wohingegen es im weiteren Verlauf der Entwicklung nur noch eine inhibitorische Wirkung entfaltet. Aber nicht nur auf neuronaler Ebene spielt GABA eine wichtige Rolle, auch auf endokriner Ebene ist es ein wichtiger Mitspieler. Es wirkt z.B. hemmend auf die Glucagonsekretion bei der Ausschüttung von Insulin (Erdö and Wolff, 1990) als auch auf die Somatostatin-Sezernierung (Robbins and Landon,



1983; Sorenson *et al.*, 1991). Da GABAerge Neurone konventionell histochemisch mittels markierten Antikörpern (z.B. gegen GAD67, GAD65 oder Kalziumbindende Proteine wie Calbindin und Calretinin) dargestellt werden und sich anschließend häufig Beschränkungen für weitere histochemische Untersuchungen desselben Materials ergeben, stellte Tamamaki mit seinen Mitarbeitern 2003 ein genetisch verändertes Mausmodell (heterozygote knock-in-Tiere) her, dessen GABAerge Neurone das Protein GFP produzierten und damit fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden können. Dabei unterliegt GFP dem endogenen GAD67-Promoter, so dass Zellen, die GABA exprimieren auch GFP produzieren und somit alle GABAergen Neurone vormarkiert sind.

Durch die GAD wird Glutamat zu GABA umgewandelt. Beim Menschen, Mäusen und anderen Säugetieren sind zwei Gene bekannt, die für eine solche Decarboxylase codieren, GAD1 und GAD2 (Erlander *et al.*, 1991). Diese Gene codieren zum einen für GAD65 und zum anderen für GAD67. GAD65 und 67 unterscheiden sich nicht nur durch ihr Molekulargewicht (65K Dalton vs. 67K Dalton), sondern auch in Aminosäuresequenz, Ladung, Antigenität und Vorkommen. Im Hirn werden GAD65 und 67 in den gleichen Arealen exprimiert, jedoch in unterschiedlich starkem Ausmaß (Erlander *et al.*, 1991). Es konnte gezeigt werden, dass GAD65 den größten Teil des apo-GAD Reservoirs im Hirn ausmacht, wohingegen GAD67 fast vollständig gesättigt mit Pyridoxalphosphat (PLP) vorliegt (Kaufman *et al.*, 1991). Unter depolarisierenden Bedingungen verbindet sich PLP mit apo-GAD womit die GABA-Synthese unter neuronaler Aktivität zuzunehmen scheint (Miller and Walters, 1979; Kass *et al.*, 2014; Modi *et al.*, 2015). Die Verteilung von GAD65 und 67 ist in den Neuronen unterschiedlich. GAD65 konnte eher in den Axonen nachgewiesen werden, GAD67 hingegen in Zellkörpern und Dendriten (Erlander *et al.*, 1991). Dabei kommt GAD65 membrangebunden vor, wohingegen GAD67 zytosolisch vorliegt (Kass *et al.*, 2014).

In der Amygdala vermitteln GABAerge Interneurone eine feed-forward-Inhibition zwischen BLA und CeA und inhibieren so den Output der CeA (Royer *et al.*, 1999). Aus der genauen Klärung des Mechanismus verspricht man sich einen Therapieansatz für Angststörungen (Marek *et al.*, 2013). Die GABAerge Transmission spielt aber auch eine wichtige Rolle in der Regulation limbischer Strukturen und des PVN. So konnte gezeigt werden, dass es bei chronischem Stress zu einer Hochregulierung von GAD65 im PVN kommt (Ziegler and Herman, 2002b). Dies scheint jedoch von der Art des Stressors abhängig zu sein. So konnten unterschiedliche Effekte in der Regulierung von GAD65 und GAD67 im Hippocampus, der Amygdala und dem BNST gezeigt werden (Müller *et al.*, 2015).

#### 1.4. Stress

Stress ist definiert als die Reaktion eines Organismus auf verschiedene unspezifische Reize (Pschyrembel, 2007). Ganz allgemein unterscheidet man zwei Formen des Stresses, den Eustress und den Distress. Eustress wird dabei als eher positiv für den Organismus gesehen und stellt somit die Stressform dar, an die sich der Organismus anpassen kann und somit leistungssteigernd wirkt. Als Distress wird jene Stressform bezeichnet, an die sich der Organismus nicht anpassen kann und so zu Überforderung des Organismus führt.

Hans Selye war der erste Wissenschaftler, der sich mit dem Zusammenhang zwischen Stress und Gesundheit beschäftigte (Szabo *et al.*, 2012). Aus Läsionsuntersuchungen bei Tieren weiß man inzwischen, dass unterschiedliche Stressoren unterschiedlich verarbeitet werden. So ließ sich nachweisen, dass Stressoren wie eine neue Umgebung, Einschränkung beim Futter oder im Lebensraum sowie bei der klassischen Angstkonditionierung, abhängig sind vom limbischen System. Dagegen konnte man zeigen, dass Stressoren, die aus unmittelbarem physischen Stress bestehen (wie Hypoxämie oder Ether) unabhängig vom limbischen System verarbeitet werden. Solche Stressoren haben über viszerale Efferenzen eine direkte Verbindung zum PVN (Herman and Cullinan, 1997).

Als Stressoren bezeichnet man stressauslösende Stimuli, die sehr unterschiedlich sein können, wie z.B. Hitze, Kälte, chemische Noxen, Lärm, Gerüche, psychosoziale Faktoren (u.a.). Was vom Organismus als Eu- und Distress empfunden wird ist individuell sehr verschieden. Unter Laborbedingungen wird Stress bei Mäusen durch Fressfeindgerüche, Fußschocks, erzwungenes Schwimmen, kalte Temperaturen, Kochsalzinjektionen und räumliche Beschränkungen ausgelöst. Dabei wird eine Unterscheidung in akuten, andauernden und chronischen Stress in Abhängigkeit von der Dauer der Stresseinwirkung getroffen.

Experimentell lässt sich Stress durch verschiedene Modelle untersuchen. Eine Möglichkeit dafür wäre, dass ein Versuchstier zwar durch eine Scheibe getrennt aber zumindest sichtbar mit einem Fressfeind konfrontiert wird (Wallace and Rosen, 2000; Belzung *et al.*, 2001; Apfelbach *et al.*, 2005; Rosen *et al.*, 2005). Eine andere Möglichkeit ist, mittels olfaktorischer Stimuli dem Versuchstier das Vorhandensein eines Fressfeindes vorzutäuschen (Dielenberg *et al.*, 2001; Hebb, 2002; Dias Soares *et al.*, 2003; Hebb, A. L. O. *et al.*, 2003; Day, H. E. W. *et al.*, 2004a; Hebb, A. L. O. *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Fendt *et al.*, 2005; Laska *et al.*, 2005; Buron *et al.*, 2007; Endres and Fendt, 2007, 2008, 2009; Janitzky *et al.*, 2009; Horii *et al.*, 2010; Mackenzie *et al.*, 2010; Fitzpatrick *et al.*, 2011; Janitzky *et al.*, 2011; Matsukawa *et al.*, 2011; Kessler *et al.*, 2012; Asok *et al.*, 2013). Ratten und Mäuse sind in der Lage, bestimmte Duftstoffe ihrer Fressfeinde zu erkennen und darauf zu reagieren. In natürlicher

Umgebung vermeiden sie diese Areale. Unter Laborbedingungen, in denen man die Tiere kontrolliert diesen Duftstoffen aussetzen kann, reagieren die Tiere mit Aktivierung der Stressachse (Dielenberg *et al.*, 2001; Dias Soares *et al.*, 2003; Matsukawa *et al.*, 2011) sowie mit Verhaltensänderungen wie *freezing* (Erstarren) oder *avoidance* (Vermeidungsverhalten) (Belzung *et al.*, 2001; Endres *et al.*, 2005; Buron *et al.*, 2007; Endres and Fendt, 2009; Fitzpatrick *et al.*, 2011). Es gibt verschiedene Duftstoffe, bei denen bekannt ist, dass sie eine derartige Stressreaktion hervorrufen können. Dieses sind: Katzengeruch aus Urin oder Fell (Dielenberg *et al.*, 2001; Staples *et al.*, 2008; Staples *et al.*, 2009; Staples, 2010), Frettchengeruch, Uringeruch von Predatoren und TMT aus Fuchskot – um nur einige zu nennen.

### 1.4.1. TMT

2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) ist ein Duftstoff, der sowohl bei Füchsen als auch bei Mardern in den Analdrüsen gebildet, sezerniert und mit dem Kot ausgeschieden wird. Das TMT kann chemisch hergestellt werden und bietet somit optimale Bedingungen, um ihn kontrolliert und reproduzierbar einzusetzen. Mäuse und Ratten zeigen eine angeborene Angst darauf. Ratten und Mäuse reagieren auf die Wahrnehmung von TMT mit meidendem Verhalten oder mit *freezing*. So konnte in einigen Untersuchungen gezeigt werden, dass TMT ein spezifisches Muster des limbischen Systems aktiviert mit der Amygdala, dem BNST, dem PVN im Hypothalamus sowie dessen Zielgebiete im Hirnstamm (Fendt *et al.*, 2003; Day, H. E. W. *et al.*, 2004a; Fendt *et al.*, 2005; Janitzky *et al.*, 2009). Wird eine dieser Strukturen in ihrer Funktion blockiert, so bleibt das typische Verhalten (*avoidance* oder *freezing*) aus (Endres and Fendt, 2008). Alternative Duftstoffe zur Induzierung von Angst sind Phenylethylalkohol (PEA) oder Urin von Predatoren.

### 1.4.2. Riechbahn

Die angstaustösenden Duftstoffe wie TMT oder PEA werden über das olfaktorische System verarbeitet. Die Duftmoleküle gelangen zunächst mit der Atemluft in die Nasenhaupthöhle und von dort in die mit Riechepithel ausgekleidete Regio olfactoria auf der Concha nasales superior, wo die Duftmoleküle an die Rezeptoren andocken. Prinzipiell werden für den Menschen 7 Grundgerüche unterschieden: Campher, Moschus, blumig, Pfefferminz, ätherisch, faulig und stechend. Die Wahrnehmungsschwelle (die Geruchsintensität bei der man feststellt, dass es nach etwas riecht) liegt deutlich unter der Erkennungsschwelle (die Geruchsintensität an der man einen Geruch konkret benennen kann). Bei Tieren existiert darüber hinaus das sogenannte Vomeronasalorgan, das der Wahrnehmung von Pheromonen und somit dem Sexualverhalten dient. Dessen Existenz ist beim Menschen jedoch umstritten und wird vermutlich stark zurück gebildet.

Der Mensch besitzt ca. 30 mio. Riechzellen und insgesamt ca. 350 verschiedene olfaktorische Rezeptortypen (Klinke *et al.*, 2005). Die Maus besitzt nur ca. 5 mio Riechzellen, jedoch werden bei der Maus ca. 1300 Rezeptortypen exprimiert (Castro, 2009). Da es weit mehr als 350 verschiedene Gerüche gibt, wird diese Vielfalt beim Menschen mittels verschiedener Aktivierungsmuster der Riechzellen ermöglicht. Die Sinneszellen bilden mit ihren Axonen die Fila olfactoria, die durch die Lamina cribrosa und anschließend als Nervus olfactorius zum Bulbus olfactorius ziehen und hier zunächst enden.

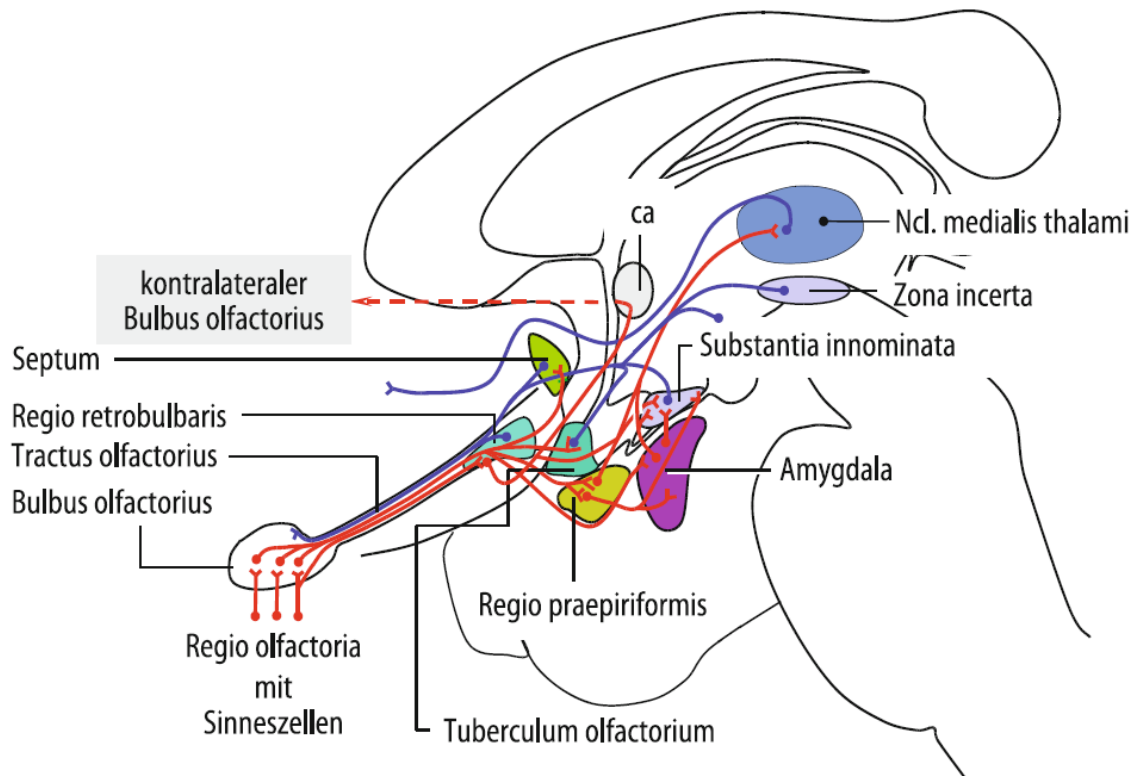
Der Bulbus olfactorius zeigt histologisch eine komplexe Schichtung:

Stratum fibrosum, Stratum glomerulosum, Stratum plexiforme externum, Stratum mitrale, Stratum plexiforme internum, Stratum granulosum.

Im Stratum granulosum finden sich die sogenannten Glomeruli. Dabei handelt es sich um Synapsen, in denen die Afferenzen aller Rezeptorzellen mit demselben Rezeptortyp auf eine Mitral- bzw. Büschelzelle projizieren. Die Steuerung dieser Ordnung und Wachstumssteuerung ist noch Gegenstand aktueller Forschungen. Die Mitralzellen sind glutamaterg und Büschelzellen sowie die Periglomerularzellen sind dopaminerg. Zudem ließen sich Neuropeptide, unter anderem NPY im Bulbus nachweisen. (Busch-Sørensen *et al.*, 1989)

Im Bulbus findet zum einen eine Umschaltung auf das zweite Neuron, sogenannte Projektionsneurone statt und zum anderen findet eine Modulation durch Interneurone statt. Die Interneurone sind vorwiegend GABAerg. Die wesentlichen Verbindungen sind in Abb. 3 dargestellt. Über den Tractus olfactorius werden die Impulse weitergeleitet und über die Regio retrobulbaris besteht über die Commissura anterior eine Verbindung zum kontralateralen Bulbus, dem ipsilateralen Palaeocortex sowie Thalamus und Hypothalamus. Im weiteren Verlauf teilt sich der Tractus olfactorius in die Stria lateralis und Stria medialis. Die Striae medialis zieht zum Tuberculum olfactorius und zu Kerngebieten im Septum. Von den Ncll. septales gehen Afferenzen zum Bulbus olfactorius. Es gibt zudem Verbindungen vom Tuberculum und primären Riechhirn zu Habenula und Formatio reticularis. Die Stria lateralis zieht über verschiedene Bahnen weiter. Zum einen existiert eine Verbindung über die Area praepiriformis zum Hippocampus. Daneben gibt es eine Verbindung über die Amygdala zum Hypothalamus und dem orbitofrontalen Kortex. Ein Teil dieses Sinnessystems projiziert also ohne Umschaltung im Thalamus in den Kortex. Zudem besteht noch eine Verbindung über die Area praepiriformis mit dem Thalamus. Die Verbindung zum Hippocampus sorgt für die Verknüpfung eines Duftes mit einem Ort oder einer Situation. Die Verbindung zu Amygdala und orbitofrontalen Kortex ist für die Verknüpfung eines Duftes mit einer Emotion verantwortlich und die Verbindung zum Thalamus sorgt für die Identifikation eines Duftstoffes. In der Amygdala

konvergieren die Informationen aus der Geruchsidentifikation und den übrigen sensorischen Informationen im CeA. Wird eine Situation hier als bedrohlich bewertet, so wird zum einen das Tier dieses als Angst wahrnehmen und über die Verbindung zum Hypothalamus wird die HPAA aktiviert und die entsprechende Reaktion initiiert (Sah *et al.*, 2003).



**Abbildung 3**  
Verbindungen zwischen den verschiedenen Gebieten des Riechhirns beim Menschen.  
Afferenzen (rot) sowie Efferenzen (blau). Ca= Commissura anterior.  
(Amunts *et al.*, 2010)

### 1.4.3. CRF und Hypothalamus – Hypophyse – Nebennierenrinden – Achse

Eine Anpassung des Organismus an die Umweltbedingungen erfolgt über die Hypothalamus – Hypophysen – Nebennierenrinden – Achse (HPAA). Im Hypothalamus wird CRF im kleinzelligen Anteil des Nucleus paraventricularis (PVN) gebildet (Swanson *et al.*, 1983; Ziegler and Herman, 2002b; Dabrowska *et al.*, 2013), das in der Hypophyse eine Freisetzung von ACTH bewirkt. Dabei ist CRF der Hauptstimulus zur Freisetzung von ACTH. Es sind jedoch auch ADH, Noradrenalin, CCK, Angiotensin II und VIP als ACTH-freisetzende Stimuli bekannt. ACTH wiederum bewirkt eine Freisetzung vor allem von Glukokortikoiden und eine Modulation von Adrenalin und Noradrenalin aus der Nebenniere. CRF wurde erstmals von Vale charakterisiert, der nach einem Aktivator der HPAA suchte und diesen in Form von CRF fand. CRF wird vorwiegend in den parvozellulären Zellen des PVN gebildet, konnte jedoch auch im BNST, der CeA, LC und im Nucleus raphe dorsalis nachgewiesen werden (Cummings *et al.*, 1983; Snyder *et al.*, 2012). Je nachdem in welcher Region CRF in Neuronen exprimiert wird,

besitzen die Neurone unterschiedliche Neurotransmitter. Im PVN sind CRF-Neurone glutamaterg, im BNST hingegen GABAerg (Dabrowska *et al.*, 2013).

Der BNST ist ein weiterer Kern, der auch an der Regulation der HPA-Achse beteiligt ist. Es ist bekannt, dass dieser bei beiden Geschlechtern unterschiedlich strukturiert ist (Janitzky *et al.*, 2014). Zwischen der Amygdala und dem BNST gibt es starke GABAerge Verbindungen, was auf Interaktionen zwischen CRF und GABA schließen lässt und es wurde gezeigt, dass CRF die Wirkung von GABA verstärkt (Davis *et al.*, 1997; Kash and Winder, 2006; Janitzky *et al.*, 2014). Es gibt Hinweise darauf, dass CRF einen gedächtnismodulierenden Einfluss hat. Da die Freisetzung von CRF eine Aktivierung des limbischen Systems, wie die Amygdala und den BNST, zur Folge hat und diese Gehirnregionen einen Einfluss auf die Plastizität im Hippocampus haben, scheint ein Einfluss auf das räumliche Gedächtnis erklärbar.

Während Adrenalin und Noradrenalin den Körper in Alarmbereitschaft versetzen und den Organismus so in die Lage versetzen, auf Gefahren schnellstmöglich zu reagieren, bewirken Glukokortikoide eine vermehrte Energiebereitstellung, indem sie die Glukoneogenese aktivieren und vermehrt Glukose aus den Leberzellen freisetzen. Damit erhöht sich der Blutzuckerspiegel und dem Organismus stehen genügend Reserven zur Verfügung. Daneben haben Glukokortikoide Wirkung auf den Fett- und den Eiweißstoffwechsel, indem sie den Eiweißabbau in Muskulatur und Knochen fördern. Die freigesetzten Aminosäuren werden der Glukoneogenese zugeführt. Im Fettgewebe werden Fette lipolytisch gespalten und freie Fettsäuren freigesetzt. All diese Mechanismen dienen der Bereitstellung von Energie. Glukokortikoide bewirken daneben eine Verringerung der zirkulierenden Lymphozyten sowie Granulozyten, hemmen also die Immunabwehr. In hohen Konzentrationen haben sie aldosteronähnliche Wirkung und bewirken eine Natriumretention sowie Kaliumausscheidung und heben auf diesem Weg den Blutdruck. Durch seine Lipophilie kann Cortisol ohne Probleme die Blut-Hirn-Schranke überwinden und so in Hypothalamus, Hippocampus und Hypophyse an die Glukokortikoidrezeptoren binden. Über ein negatives Feedback bewirkt Cortisol letztlich eine verringerte Ausschüttung von CRF, womit auch die zirkulierende Glukokortikoidmenge abnimmt. Die Halbwertszeit natürlicher Glukokortikoide liegt zwischen 30 und 90 Minuten.

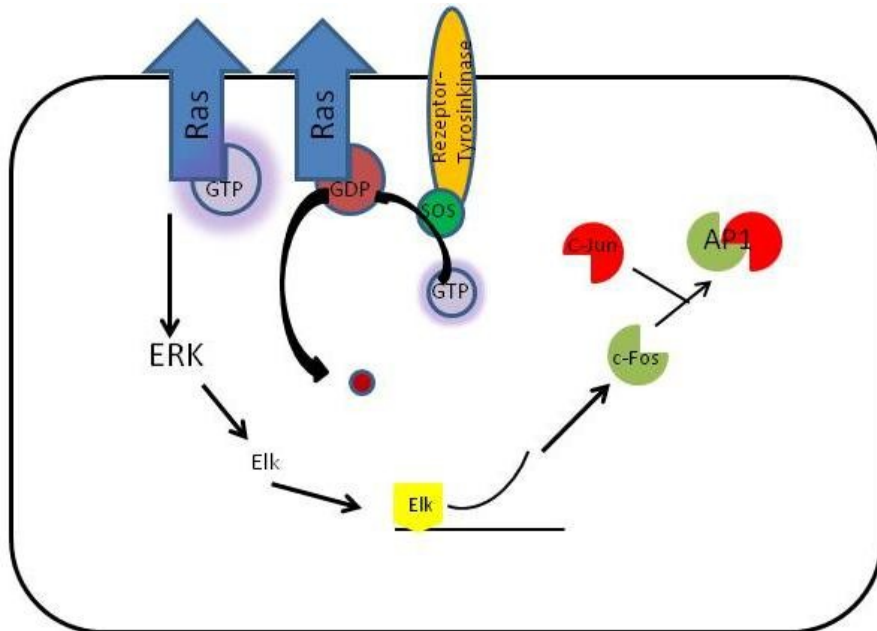
Die CRF-Ausschüttung und somit die basale Glukokortikoidmenge unterliegt einer zirkadianen Rhythmik. Ein Minimum wird in den Abendstunden erreicht, das Maximum liegt in den frühen Morgenstunden. Daneben gibt es eine stimulierte Freisetzung von Cortisol durch z.B. körperliche Aktivität, Stress und niedrige Blutzuckerspiegel im Blut. Ein Sekretionsgipfel von Cortisol lässt sich ca. 20 Minuten danach nachweisen.

#### 1.4.4. c-Fos

C-Fos ist ein Protoonkogen, gehört zu den *immediate-early-genes* (IEG) und ist eines der ersten IEG, die identifiziert werden konnten (Kelly *et al.*, 1983; Greenberg and Ziff, 1984).

Weitere bekannte Vertreter der IEG sind Proteine der Jun- und Myc-Familie. IEG sind Gene, deren Expression in ruhenden Zellen (G0-Phase) nicht detektierbar ist, unter Stimulation der Zelle jedoch eine sehr schnell induzierte Transkription zeigen. Zeitlich wird die Grenze etwas ungenau innerhalb von Minuten gezogen. IEG sind Gene, die ohne vorherige Proteinbiosynthese transkribiert werden können. Die Halbwertszeit der mRNA von c-Fos ist mit 10-20min sehr kurz. Während die Transkription der IEG unabhängig von Proteinen induziert wird, ist die Beendigung der Transkription (shut-off) dagegen abhängig von der Proteinsynthese neuer Proteine (Sheng and Greenberg, 1990). Das c-Fos-Protein wirkt als Dimer mit c-Jun in Form eines AP1 (Aktivator Protein) als Transkriptionsfaktor. AP1 realisiert und stimuliert die Transkription zahlreicher Matrix-Metalloproteinasen, Wachstumsfaktoren, Zellzyklusregulatoren, zelltypspezifischer Genprodukte und Apoptoseregulatoren und ist somit maßgeblich an Zellwachstum, -differenzierung und Apoptose beteiligt. Durch diese Beteiligung bei Zellwachstum und -differenzierung ist c-Fos wie bereits erwähnt ein Protoonkogen, das bei Veränderung zu Entartung der Zelle führen kann und dann als Onkogen bezeichnet wird. Tatsächlich wurde eine Überexpression von c-Fos in verschiedenen Carcinomen nachgewiesen (Smith *et al.*, 1999; Milde-Langosch, 2005; Kharman-Biz *et al.*, 2013). Die Transkription von c-Fos wird durch verschiedene Faktoren initiiert (Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, alkylierende Agenzien, Stressfaktoren) und reguliert dann die weitere Genexpression. Aktiviert wird c-Fos über den Ras/Fos-Weg. Ras-GDP (inaktive Form) ist über einen Lipidanker an der Zellmembran gebunden und wird durch aktivierte Rezeptortyrosinkinasen rekrutiert. In der Rezeptortyrosinkinase befindet sich der SOS-Komplex (ein GTP-Austauschfaktor, der GDP gegen GTP tauscht). Dieser SOS-Komplex bindet Ras-GDP und aktiviert es zu Ras-GTP. Über die MAP-Kinase-Kaskade wird über ERK (Extrazellulär Signal-regulierte Kinase) der Transkriptionsfaktor Elk aktiviert, der letztlich die Transkription von c-Fos induziert. Über die ebenfalls auf dem MAP-Kinase-Weg aktivierte Januskinase wird Jun phosphoryliert, das so aktiviert mit c-Fos dimersiert und den aktiven Transkriptionsfaktor AP1 bildet. AP1 kann jedoch neben der Kombination aus c-Fos und c-Jun auch aus anderen Komponenten der Fos-, Jun- und ATF-Familie zusammengesetzt sein. AP1 spielt eine wichtige Rolle in der Apoptose, wohingegen die alleinige Rolle von c-Fos bei der Apoptose umstritten ist (Angel and Karin, 1991; Herrera *et al.*, 1996; Klinke *et al.*, 2005). So konnte bereits gezeigt werden, dass Lymphozytenkulturen, die kein c-Fos exprimieren ein normales Apoptoseverhalten zeigten im Vergleich zur c-Fos-exprimierenden Kontrollkultur (Ameyar *et al.*, 2003; Bierbaum, 2003). In dieser

Untersuchung dient c-Fos m-RNA dem Nachweis der Aktivierung von Neuronen in Hirnregionen nach von TMT-Exposition.



**Abbildung 4**

Dargestellt ist die Synthese von AP1 in der Zelle. Ras-GDP ist in der Zellmembran verankert. Mittels SOS-Komplex wird GDP gegen GTP ausgetauscht. Dadurch wird mittel ERK (Extrazellulär Signal-regulierte Kinase) Elk aktiviert. Elk bindet an die DNA und bewirkt die Transkription von c-Fos. C-Fos dimerisiert mit c-Jun zu AP1, einem aktiven Transkriptionsfaktor.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Mausmodell

Um GABAerge Neurone zu markieren und sie somit nicht mehr immunhistochemisch darstellen zu müssen, fügten Tamamaki et al. das Gen für das grün-fluoreszierende Protein (GFP knock-in) in das Genom von embryonalen Stammzellen ein mit nachfolgender Zucht in C57Bl/6 Mäusen (Tamamaki *et al.*, 2003). Da dieses Gen unter der Kontrolle des Promotors des GAD67-Gens steht, wird das GFP nur in GABAergen Neuronen mit der GAD67-Isoform exprimiert.

In dieser Arbeit wurden 24 adulte heterozygote GAD67-GFP knock-in Mäuse (GAD67) (13 Männchen, 11 Weibchen) und 24 adulte C57Bl/6 als Wildtyp-Geschwistertiere (WT) (12 Männchen, 12 Weibchen) im Alter von 12-20 Wochen untersucht. In den GAD67 Mäusen ist ein Allel des GAD67-Gens mit einem Gen für GFP markiert. Die Tiere stammen aus einer Zucht aus heterozygoten GAD67-GFP- und C57Bl/6-Mäusen. Die Tiere wurden in durchsichtigen Boxen in Gruppen zu 2-5 Mäusen mit einem 12h:12h Tag:Nacht Rhythmus mit Wasser und Futter ad libitum gehalten. Alle Experimente wurden nach den gesetzlichen Vorschriften der EU (Direktive 2010/63/EU) und dem deutschen Tierschutzgesetz ausgeführt, genehmigt vom Landesverwaltungsamt, Sachsen-Anhalt (A7., 2-581 Uni MD)

### 2.2. Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte mittels RT-PCR und Gelelektrophorese aus Schwanzproben der Mäuse (siehe Anhang, S.79).

Folgende Primer wurden verwendet:

TR GFP-8: CTG CTT GTC GGC CAT GAT ATA GAC G

TR-1b: GGC ACA GCT CTC CCT TCT GTT TGC

TR-3: GCT CTC TCG CGT TCC GAC AG

Zur Erkennung des GFP-Allels wurden die Primer TR-3 und TR GFP-8 eingesetzt, zur Erkennung des GAD 67 WT-Allels die Primer TR3 und TR1b.

### 2.3. Duftstoff

Als Duftstoff setzten wir 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazolin (TMT; Phero Tech, Delta, Canada) als synthetische Substanz, welche dem ursprünglich aus Fuchskot isoliertem Stoff gleicht, ein. Als geruchsloser Kontrollduftstoff wurde Diethylphthalat (DEP; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) verwendet.

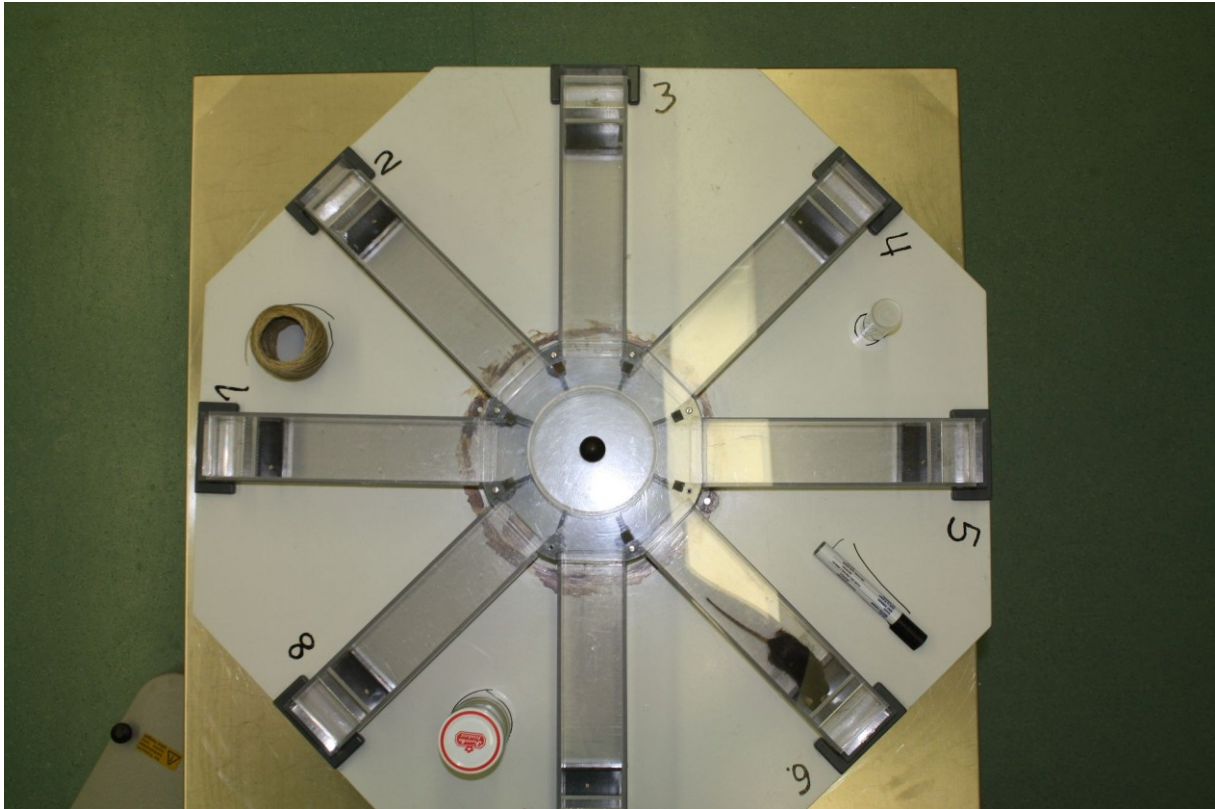
## 2.4. Kortikosteron

Die Bestimmung des Kortikosteron-Wertes im Serum erfolgte mit Hilfe eines Radioimmunoassay (RIA)-Kits. Die Anwendung erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers. (Corticosterone, <sup>125</sup>I RIA Kit, MP Biomedicals GmbH, Eschwege, Germany) Das Blut der Mäuse wurde nach Dekapitation sofort zentrifugiert (7500g, 5min, 4°C) und das Serum bei -20°C eingefroren. Die Bestimmung der Kortikosteronwerte erfolgte entsprechend den Anweisungen des Herstellers. Zur Bestimmung wurde zu den Proben und Standards Kortikosteron I<sup>125</sup> und anschließend der Kortikosteron-Antikörper zugesetzt. Eingesetzt wurden jeweils 10µl Serum, die anschließend 1:200 verdünnt wurden (Phosphatpuffer mit Ziege-anti-Kaninchen IgG).

Hierbei wird das mit Radioisotopen (<sup>125</sup>I) markiertes Kortikosteron verwendet, das mit dem dazu gegebenen Antikörper mit einer genau definierten Konzentration reagiert. Steigt der Anteil an nicht markiertem Kortikosteron in der zu untersuchenden Probe, so nimmt der Anteil des markierten Kortikosterons ab. Anschließend wird das nicht gebundene markierte Kortikosteron entfernt und die Aktivität mit einem Gamma-Counter (LKB Wallace Turku Finnland) bestimmt. Mithilfe von Standards (25 bis 1000ng/ml) wurden die CORT-Konzentrationen berechnet. Der interne Variationskoeffizient des RIA beträgt  $4,6 \pm 3\%$ . (Protokoll siehe Anhang, S. 79)

## 2.5. 8-Arm-Radiallabyrinth

Die Wände des Labyrinthes bestehen aus durchsichtigem Plexiglas (Abb. 5). In der Mitte befindet sich eine Plattform, von der acht gleich große Arme abgehen (25cm x 6cm x 6cm). Sowohl die Arme als auch die zentrale Plattform haben einen abnehmbaren, durchsichtigen Deckel, um die Mäuse im Labyrinth platzieren als auch entfernen zu können. Am Ende jedes Armes befindet sich als Sichtschutz eine kleine Barriere aus schwarzem, undurchsichtigem Kunststoff. Dahinter wurde die Belohnung in Form von kleinen (ca. 1 x 1 x 1mm) Futterpellets platziert. Auf diese Weise konnten die Mäuse bei Betreten der Arme nicht sehen, ob sie diesen bereits betreten und das Futter gefressen hatten oder nicht. Die Tiere sind so gezwungen, sich an äußeren Markierungen zu orientieren. Als Orientierungsmöglichkeit dienten vier Objekte, die sich außerhalb des Labyrinthes befanden. Das Labyrinth stand immer in der gleichen Orientierung im Labor und der Beobachter immer am gleichen Punkt zum Labyrinth. Dadurch, dass die Arme alle von der zentralen Plattform ausgehen, waren die Tiere nach jedem Betreten eines Armes gezwungen, in die Mitte des Labyrinthes zurückzukehren und konnten erst von dort einen neuen Arm aufsuchen. Somit hatte jede Maus mit Betreten des Zentrums stets acht Wahlmöglichkeiten.

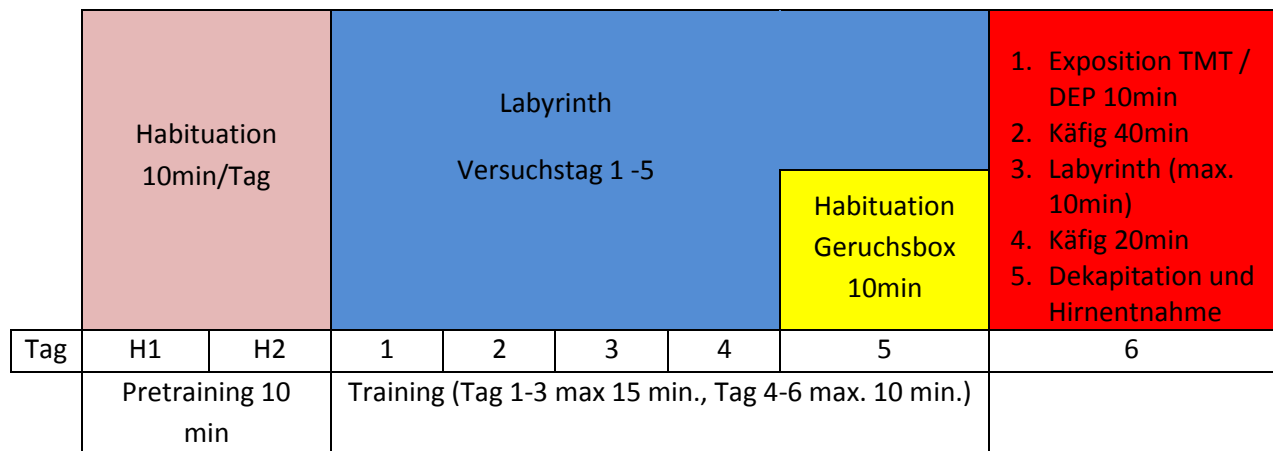


**Abbildung 5**

Darstellung des verwendeten Radial-Arm-Labyrinthes. Es handelt sich um acht vollkommen identische von einer zentralen Plattform ausgehende Arme, an deren Ende sich eine Barriere aus schwarzem, undurchsichtigem Plexiglas befindet. Hinter dieser Barriere sind die Futterbelohnungen platziert. Die Maus wird in der zentralen Plattform in das Labyrinth gesetzt und kann frei zwischen den acht Armen wählen (hier in Arm Nr. 6). An einigen Stellen sind optische Hinweise außerhalb des Labyrinthes positioniert (hier z.B. eine Knäuel, ein Marker, ein Glasbehälter sowie eine Kunststoffdose).

## 2.6. Versuchsablauf

In Abb. 6 ist der Versuchsablauf dargestellt.



**Abbildung 6**

Dargestellt ist der Versuchsablauf des räumlichen Lernens unter TMT/DEP-Einwirkung am letzten Tag (6).

Trainingsablauf (0 = Habituation; Tage 1-5 Training im Labyrinth; Am 5. Tag nach dem Training im Labyrinth Habituation in der Duftbox; Tag 6 = Exposition mit TMT oder DEP, Training im Labyrinth 40 min nach Exposition, Dekapitation 20 min. nach dem Training)

### 2.6.1. Habituation im Labyrinth

Zum Kennenlernen des Labyrinthes (Habituation, Tag H1 und H2, Abb. 6) wurden die Tiere am Tag zuvor gewogen und einzeln in Käfige gesetzt. Für die Habituation und das Training wurde das Futter rationiert, damit die Tiere 10-15% ihres Körpergewichtes verloren. Der Zugang zu Wasser war uneingeschränkt gegeben. Ziel war es, das reduzierte Körpergewicht für die Zeit der Habituation und die 6 Versuchstage konstant bei 85-90% des Ausgangsgewichts zu halten. Die Habituation fand an 2 Tagen vor dem Versuch für je 10min statt. Dabei durften sich die Mäuse frei im Labyrinth bewegen. Nach jeder Maus wurde das Labyrinth gereinigt. Die Reihenfolge der Mäuse wurde ausgelost und während der Habituation und dem Training beibehalten. Nach jedem Tag wurden die Arme des Labyrinthes, zur Vermeidung des Orientierens an internen Markierungen, um 45° gedreht. Die Habituation und das Training fanden jeweils zur gleichen Tageszeit statt. Auf die Habituation folgten unmittelbar die fünf Versuchstage sowie der finale Versuchstag mit Geruchsexposition, Labyrinth und anschließender Tötung durch Dekapitation.

### 2.6.2. Räumliches Lernen

An den folgenden 5 Versuchstagen (Tag 1-5, Abb. 6) wurden die Tiere zuerst gewogen. Es wurden immer alle Arme belohnt und die Reihenfolge der Mäuse wie in der Habituation beibehalten. Die Mäuse wurden jeweils in die Mitte des Labyrinths gesetzt und dies als Start gezählt. Jede Maus wurde mit dem Kopf in die gleiche Richtung gesetzt. Die Mäuse sollten alle 8 Belohnungen

einsammeln. Sobald ein Tier einen Arm mit allen vier Pfoten betreten hatte wurde der Arm als betreten gewertet. Als Ende galt, wenn die Maus alle Arme besucht und die Belohnungen gefressen hatte. Bei Tieren, die das Labyrinth nicht erfolgreich abschließen konnten wurde der Versuch nach 15min (Tag 1-3), bzw. 10min (Tag4-5) beendet. Als Fehler, *working memory error* (WME), gilt ein wiederholt betretener Arm, nachdem die Belohnung gefressen wurde oder das Betreten eines Armes ohne Fressen der Belohnung. Als zweiter Parameter wurde das Betreten neuer Arme, *new arm entries* (NAE), während der ersten 8 Armbesuche registriert. Daneben ermittelten wir die Laufzeit und berechneten die Aktivität. Auch beim Training wurden nach jedem Tag die Arme des Labyrinths um 45° gedreht, um zu verhindern, dass sich die Tiere an Markierungen innerhalb des Labyrinthes orientieren.

### **2.6.3. Habituation in der Geruchsbox**

Vor der eigentlichen Geruchsexposition wurden die Tiere an die Umgebung gewöhnt, in der die Geruchsexposition stattfand. Dies geschah am 5.Versuchstag nach dem Training im Labyrinth (siehe Abb. 6). Dazu wurden die Tiere nacheinander und einzeln für 10min in die PVC-Boxen (30x30x30cm) gesetzt, 35µl Aqua dest. auf einen Filterpapierstreifen pipettiert und dieser durch einen Seitenschlitz der Box eingebracht. Die Box stand dabei unter einem Abzug. Für beide Duftstoffe, TMT sowie DEP, gab es zwei separate Boxen, die identisch gebaut sind. Die Mäuse wurden bereits zur Habituation entsprechend der finalen Duftexposition in der zugehörigen Box ohne TMT oder DEP habituiert. Dazu wurden sie vorher den Gruppen zugelost. Nach jeder Maus erfolgte eine gründliche Reinigung der Box.

### **2.6.4. Geruchsexposition und anschließendes räumliches Lernen**

Am letzten Versuchstag (Tag 6, Abb. 6) wurden die Mäuse vor dem Test im Radial-Labyrinth für 10min einem Duftstoff in einer PVC-Box (30x30x30cm) ausgesetzt. Dabei konfrontierten wir sie entweder mit 35µl TMT oder mit 35µl DEP. In den GAD67- und WT-Gruppen wurde die DEP und TMT-Exposition zufällig verteilt. Nachdem die Mäuse einzeln in die Box gesetzt wurden, wurde der entsprechende Duftstoff auf einen Filterpapierstreifen pipettiert und durch einen Seitenschlitz der Box eingebracht. Die Box stand unter einem Abzug, um zu verhindern, dass die Raumluft mit den Duftstoffen kontaminiert wird. Nach 10min. wurden die Mäuse aus der Box entfernt, in ihre Käfige zurück gesetzt und die Boxen gründlich gereinigt. Nach der Exposition kamen die Tiere zurück in ihren Käfig und verblieben dort 40min. Anschließend wurden die Mäuse wie an den Versuchstagen 1-5 in das Labyrinth gesetzt und beobachtet. (siehe 2.6.2)

## 2.7. Isolation der Hirnareale

Am 6. Tag erfolgte 20 min nach dem Test im Labyrinth die Dekapitation der Mäuse (Abb. 6). Die sechs entnommenen Hirnareale (ventraler Bulbus olfactorius (vBO), Bed Nucleus of the Stria terminalis (BNST), Amygdala (Amyg), paraventriculärer Nucleus des Hypothalamus (PVN), Locus coeruleus (LC), Hippocampus (Hipp)) wurden sofort in RNAlater-Lösung eingelegt und zunächst über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Proben in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C eingefroren bis zur weiteren Verarbeitung. (Detaillierte Darstellung der Arealentnahme siehe S. 82)

## 2.8. RNA-Isolierung und qrt-PCR

Die RNA wurde mittels Trizol-Chloroform-Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert. Das detaillierte Protokoll findet sich im Anhang (S. 82). Von jeder Probe wurden 1,5 µg RNA mit einer reversen Transkriptase (RevertAid H-Minus First Strand cDNAsynthesiskit, Fermentas) und oligo-dT-Primer in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente dann zur Quantifizierung der c-Fos und CRF mRNA-Expression in den Hirnregionen. Dazu wendeten wir die quantitative real time PCR (qrt-PCR) an und setzten  $\beta$ -actin und GAPDH als housekeeper-Gene ein. Für die Durchführung der qrt-PCR wurde der iCycler (Bio-Rad, Laboratories Inc., Hercules, California, USA) mit der SOFTWARE ICycler IQ (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA) und SYBR Green Supermix mit Fluorescein (Thermo Scientific, Fermentas, Waltham, MA, USA) als Detektionssystem verwendet.

Folgende Primer wurden dabei eingesetzt:

**c- Fos** (Effizienz 97,4%)

forward 5' CTG TCA ACA CAC AGG ACT TTT 3' ; reverse 5' AGG AGA TAG CTG CTC TAC TTT G 3'

**CRF** (Effizienz 99,4%)

forward 5' GGG AGA GGC GGT CGG AGG AG 3' ; reverse 5' TGC TCT GCC CGG GCC ATT TC 3'

**$\beta$ -actin** (Effizienz 95,8%)

forward 5' ACC AAC TGG GAC GAT ATG GAG AAG A 3';reverse 5' CGC ACG ATT TCC CTC TCA GC 3'

**GAPDH** (Effizienz 94,2%)

forward 5' CTT CAC CAC CAT GGA GAA GGC 3'; reverse 5' GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG 3'

Angewendet wurde ein 2-Schritt-Programm, der mit einer Denaturierung (5min, 95°C) anfang, gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (30s, 95°C) und dem Annealing / Extension (60s / 60°C). Zum Ausschluss von fehlerhaften Amplikons erfolgte eine Schmelzkurven-Analyse. Der Schwellenwert zur Ermittlung der Ct-Werte befand sich in der linearen Phase der Amplifikation.

## **2.9. Statistik**

Für die Datenerfassung wurde die Software IBM SPSS Statistics, Version 22 (SPSS Inc. Chicago, USA) verwendet. Mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test wurde auf Normalverteilung geprüft. Der Levene-Test wurde zur Prüfung der Varianzhomogenität angewendet. Varianzanalysen (ANOVA) wurden für jede einzelne Hirnregion verwendet einschließlich einer Korrektur nach Bonferroni. Der Greenhouse-Geysler-Test fand bei Ablehnung von Sphärizität Anwendung. Es konnten aufgrund der zweistufigen Zwischensubjektfaktoren keine post-hoc-Analysen durchgeführt werden. Deshalb wurden für Einzelvergleiche zwischen GAD67 und WT-Gruppen der T-Test für gleiche und der Welch-Test für ungleiche Varianzen angewendet.

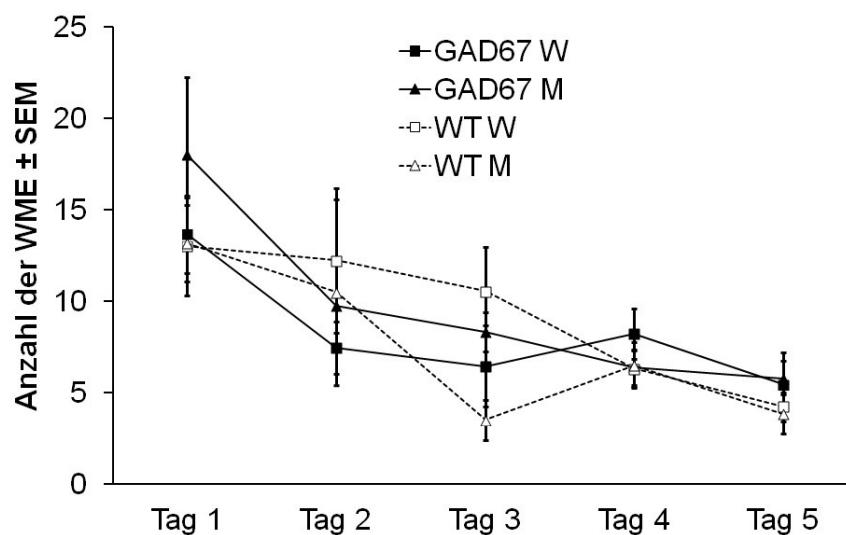
### 3. Ergebnisse

In dieser Untersuchung ging es um die Klärung, ob der Verlust eines GABA-Allels und die reduzierte Menge an GABA einen Einfluss auf das Lernverhalten zeigen. Zusätzlich interessierte uns, ob es eine Veränderung in Stress-assoziierten Hirnarealen und somit eine Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HPAA) gibt.

#### 3.1. Verhalten im Radial-Arm-Labyrinth

##### 3.1.1. Versuchstag 1-5 (Training) nach Geschlecht

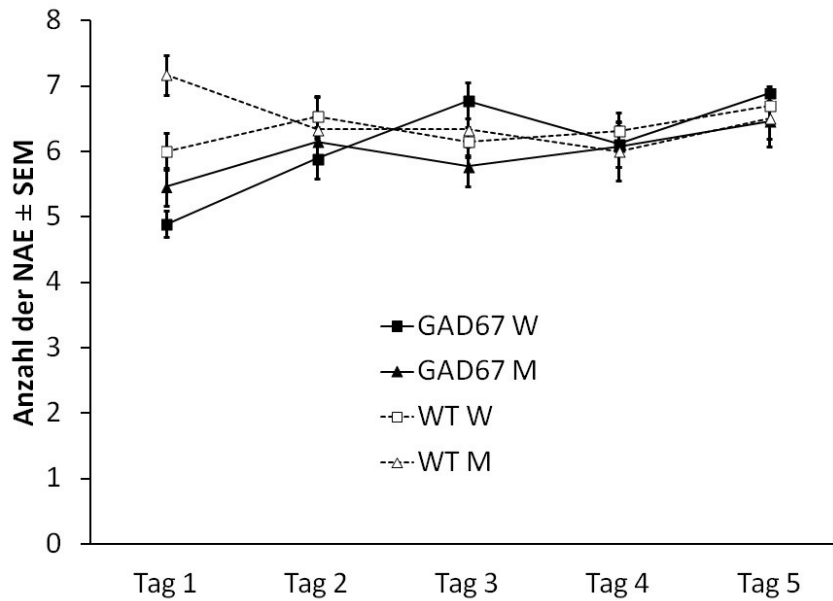
Eine Varianzanalyse (ANOVA) mit den Faktoren Genotyp, Duftexposition und Geschlecht für die Parameter WME und NAE zeigten keine Geschlechtsunterschiede (Abb. 7 und 8; WME: Faktor Geschlecht  $F(1,34)=0,592$ ;  $P=0,71$ ; Interaktion Geschlecht und Genotyp  $F(2,33)=0,290$ ;  $P=0,91$ ; Interaktion Geschlecht und Exposition  $F(2,33)=1,466$ ;  $P=0,24$ ; NAE: Faktor Geschlecht  $F(1,34)=1,389$ ;  $P=0,27$ ; Interaktion Geschlecht und Genotyp  $F(2,33)=2,494$ ;  $P=0,062$ ; Interaktion Geschlecht und Exposition  $F(2,33)=0,274$ ;  $P=0,92$ ).



**Abbildung 7**

Anzahl der WME bei GAD67 und WT Weibchen (W) und Männchen (M) an den ersten 5 Versuchstagen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gezeigt.



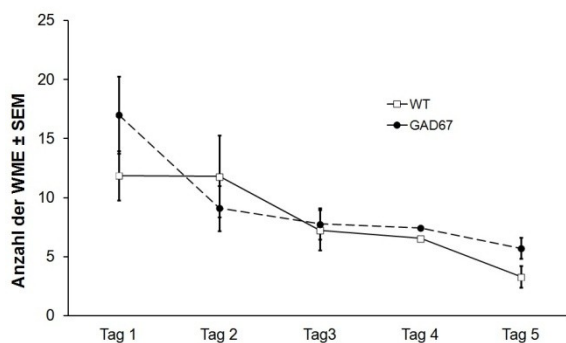


**Abbildung 8**

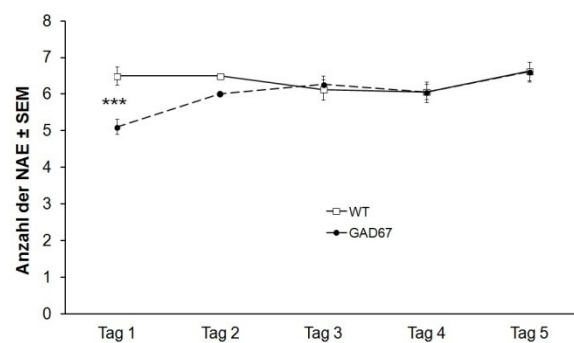
Anzahl der NAE bei GAD67 und WT Weibchen (W) und Männchen (M) an den ersten 5 Versuchstagen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gezeigt.

Somit können die Daten der männlichen und weiblichen Mäuse für die weiteren Untersuchungen der Verhaltensdaten im 8-Arm Radiallabyrinth zusammengefasst werden (Abb. 9).

## WME



## NAE

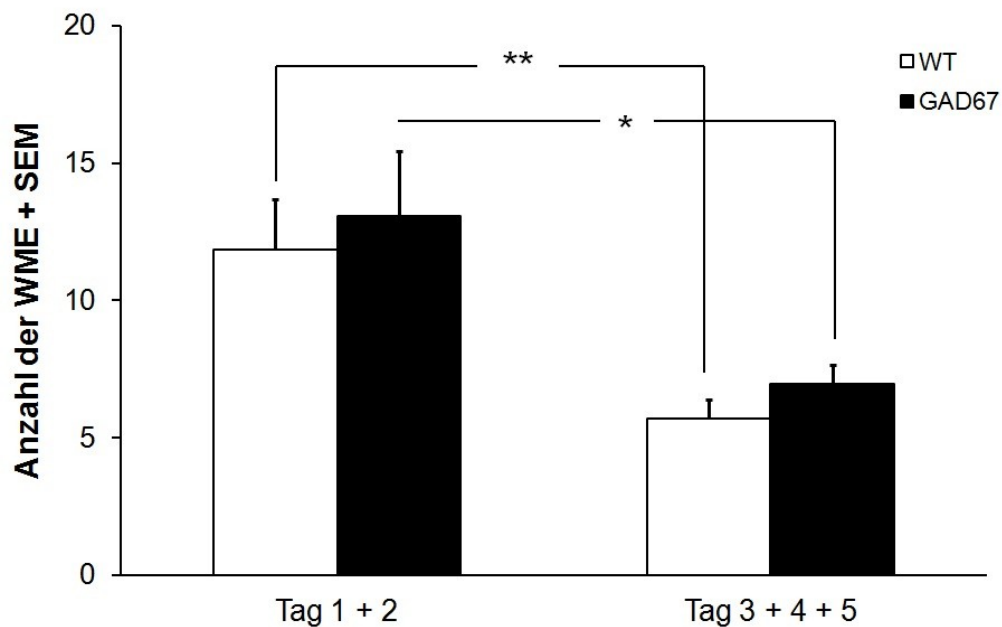


**Abbildung 9**

Anzahl der der WME und NAE bei GAD67 und WT an den ersten 5 Versuchstagen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei den WME gezeigt. Bei den NAE unterscheiden sich die Gruppen am ersten Tag signifikant (T-Test \*\*\*  $P < 0,001$ ).

### 3.1.2. Räumliches Lernen vor Duftstoffexposition Versuchstage 1-5

Vor der Duftexposition wurden die Mäuse an 5 aufeinanderfolgenden Tagen im 8-Arm Radiallabyrinth getestet. Eine Varianzanalyse (ANOVA) für die WME zeigt keinen Genotyp-Effekt und auch keinen Effekt der zufällig ausgewählten und danach mit TMT oder DEP exponierten Gruppen. (Faktor Genotyp  $F(1,34)=1,092$ ;  $P=0,39$ ; Faktor Exposition  $F(1,34)=0,463$ ;  $P=0,80$ ; Interaktion Genotyp und Exposition  $F(2,33)=0,696$ ;  $P=0,63$ ). Beide Gruppen, GAD67 und WT können ihre Leistung im räumlichen Lernen verbessern (T-Test GAD67  $P<0,05$ ; WT  $P<0,01$ ). Sie zeigen eine Abnahme der WME vom Tag 1 und 2 von  $13,1\pm 2,4$  (GAD67) bzw.  $11,8\pm 1,8$  (WT) auf  $7,0\pm 0,7$  (GAD67) und  $5,7\pm 0,7$  (WT) an den Tagen 3 bis 5 (Abb. 10).



**Abbildung 10**

Vergleich der Anzahl der WME an den ersten beiden und letzten drei Versuchstagen bei GAD67 und WT Mäusen. Signifikante Unterschiede wurden zwischen Tag 1+2 und Tag 3+4+5 bei beiden Gruppen gezeigt. Genotyp-Unterschiede waren nicht nachweisbar.

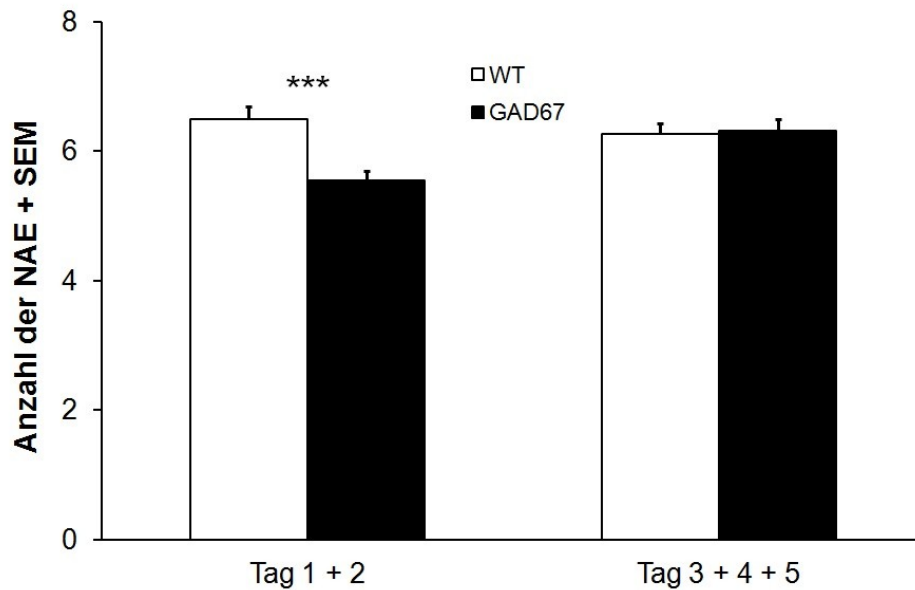
Die Werte stellen Mittelwerte der Tage 1 und 2 (Tag 1+2) bzw. 3,4 und 5 (Tag 3+4+5) dar.

(T-Test \*\*  $P<0,01$  \* $P<0,5$ )

Es fand sich kein Unterschied der im weiteren Verlauf mit TMT oder DEP exponierten Gruppen und alle Mäuse zeigten eine Abnahme der Fehler. Dies zeigt, dass der Verlust eines GAD67-Allels bei den GAD67 Mäusen nicht zu einem schlechteren räumlichen Lernen führt.

Bei den NAE findet sich in der ANOVA ein signifikanter Unterschied zwischen GAD67 und WT (Faktor Genotyp  $F(1,34)=4,329$ ;  $P<0,005$ ; Faktor Exposition  $F(1,34)=1,283$ ;  $P=0,30$ ; Interaktion Genotyp und Exposition  $F(2,33)=0,377$ ;  $P=0,86$ ). Die GAD67 Mäuse starten mit einem signifikant (T-Test  $P<0,001$ ) schlechteren Wert bei den NAE= $5,1\pm 0,2$  gegenüber den WT mit eine NAE= $6,5\pm 0,2$ . Am Ende ist die

Anzahl der NEA in beiden Gruppen praktisch gleich (GAD67 NAE= 6,6±0,2, WT NAE=6,6±0,2) (Abb. 11). Eine Verbesserung konnte hier in beiden Gruppen nicht beobachtet werden.



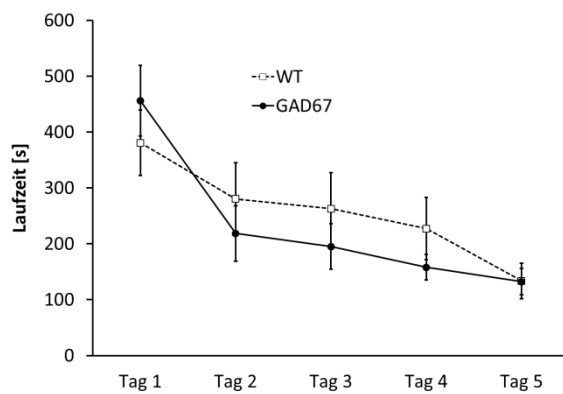
**Abbildung 11**

Anzahl der NAE bei GAD67 und WT. Ein signifikanter Unterschied besteht am Anfang zwischen GAD67 und WT. (T-Test \*\*\*P<0,001).

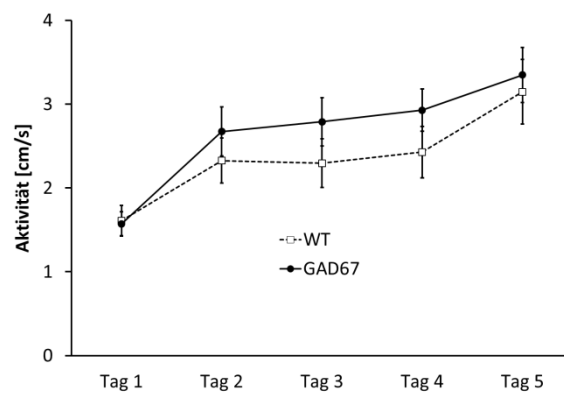
### 3.1.3. Laufzeit

Sowohl in den Laufzeiten (Zeit bis zum Fressen der letzten Belohnung, maximal 600s) als auch in den Aktivitäten (=Anzahl der besuchten Arme x 50cm / Laufzeit) unterscheiden sich die GAD67 und WT Mäuse an den ersten 5 Tagen nicht (Abb. 12).

#### Laufzeit



#### Aktivität

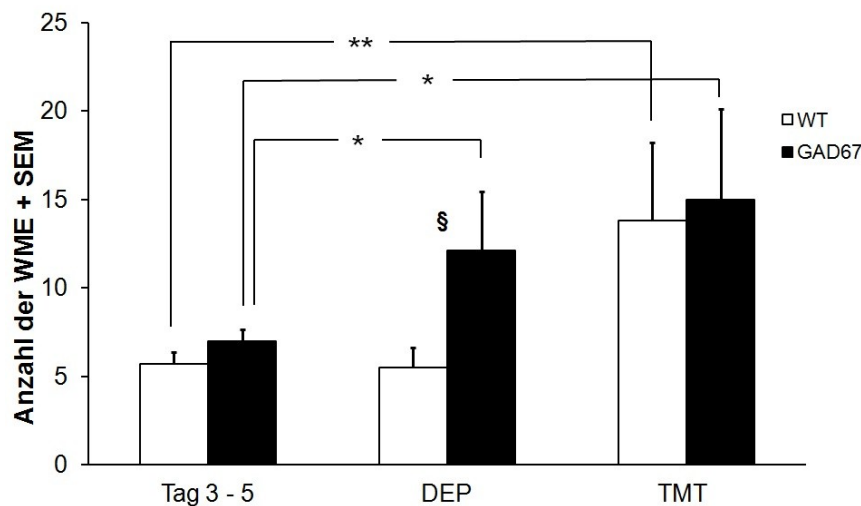


**Abbildung 12**

Laufzeit und Aktivität bei GAD67 und WT an den ersten 5 Versuchstagen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gezeigt.

### 3.1.4. Räumliches Lernen nach Duftstoffexposition (Versuchstag 6)

Unmittelbar nach dem letzten Tag im 8-Arm Radiallabyrinth wurden die Tiere an die Expositionsboxen habituieret. Die Mäuse wurden dann 24 Stunden nach dem letzten Tag im 8-Arm Radiallabyrinth in einer baugleichen Box für 5min mit TMT bzw. DEP exponiert. Die Auswahl der Tiere wurde per Zufall vorher ausgelost. Nach einer Wartezeit von 40min in der Homebox wurden sie noch einmal im 8-Arm Radiallabyrinth getestet. Hierbei zeigen die GAD67 und WT Gruppen nach der TMT Exposition eine signifikante Verschlechterung der räumlichen Lernleistung. Eine ANOVA mit Genotyp und Exposition als Faktoren ergibt einen signifikanten Expositionseffekt für die WME ( $F(1,34)=5,684$   $p<0,05$ ). Keine signifikanten Effekte konnten für den Faktor Genotyp ( $F(1,34)=0,433$   $P=0,51$ ) oder eine Interaktion zwischen Genotyp und Exposition ( $F(2,33)=2,429$   $P=0,13$ ) gezeigt werden. Die Anzahl der WME steigen bei den GAD67 Mäusen von  $7,0\pm 0,7$  (Mittelwert Tag 3-5) auf  $15,0\pm 5,1$  und für WT von  $5,7\pm 0,7$  auf  $13,8\pm 4,4$  nach TMT-Exposition. Ein post-hoc T-Test für ungleiche Varianzen (Welch-Test) zwischen Tag 3-5 und Tag 6 nach TMT-Exposition zeigen eine signifikante Verschlechterung für GAD67 ( $P<0,02$ ) und WT ( $P<0,01$ ) Tiere. Die Exposition mit der Kontrollsubstanz DEP ergab bei den WME einen signifikanten Anstieg nur bei den GAD67 Mäusen ( $WME=12,1\pm 3,3$ ;  $F(1,16)=6,229$   $P<0,05$ ) jedoch nicht bei den WT ( $WME=5,5\pm 1,1$ ;  $F(1,18)=0,282$   $P=0,60$ ). Beim Vergleich der WME nach DEP Exposition am Tag 6 mit einem post-hoc Test (Welch-Test für ungleiche Varianzen) ergibt einen Trend zwischen GAD67 und WT ( $P=0,07$ ) Nach TMT Exposition findet sich kein Unterschied zwischen GAD67 und WT (Abb. 13).

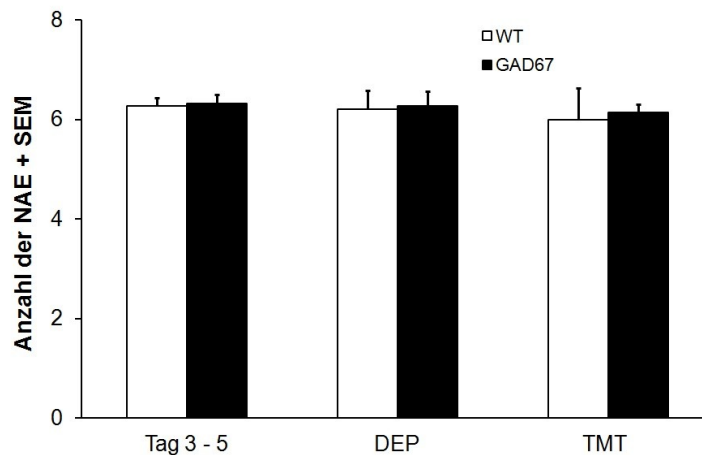


**Abbildung 13**

Vergleich der Anzahl der WME vor (Tag 3-5) und nach TMT- bzw. DEP-Exposition bei GAD67 und WT Mäusen. Signifikante Unterschiede zwischen Tag 3+4+5 und TMT bei beiden Gruppen und nach DEP wurden nur für GAD67 gezeigt. Nach DEP zeigt sich ein Trend zwischen GAD67 und WT. Im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Tieren konnte kein Effekt gezeigt werden.

(T-Test \*\*  $P<0,01$  \* $P<0,5$  § $P=0,07$ )

Bei den NAE zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, weder zwischen den beiden Expositionen noch zwischen den beiden Genotypen (ANOVA: Exposition  $F(1,34)=0,623$   $P=0,435$ ; Genotyp  $F(1,34)=0,015$   $P=0,90$ ). Auch konnte keine Veränderung zwischen Tag 3-5 und dem Expositionstag in den NAE beobachtet werden (T-Test: GAD67 TMT  $P=0,58$ ; DEP  $P=0,28$ ; WT TMT  $P=0,92$ ; DEP  $P=0,35$ ; Abb. 14).

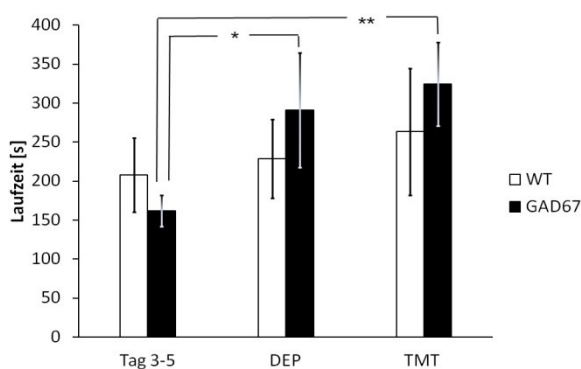


**Abbildung 14**

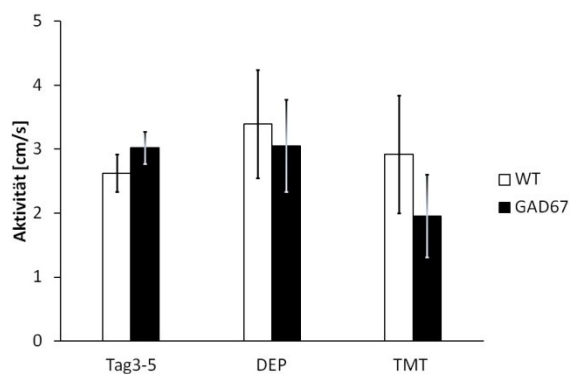
Anzahl der NAE vor (Tag 3-5) und nach der TMT- bzw. DEP-Exposition bei GAD67 und WT. Es konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

In der Laufzeit zeigen sich keine signifikanten Genotypunterschiede zwischen den verschiedenen Expositionen (ANOVA: Exposition  $F(2,32)=0,238$   $P=0,79$ ; Genotyp  $F(2,32)=0,734$   $P=0,49$ ). Allerdings benötigen die GAD67 Mäuse signifikant länger sowohl nach DEP (T-Test  $P<0,05$ ) als auch nach TMT Exposition (T-test  $P<0,01$ )(Abb. 15). Ebenso unterscheiden sich die GAD67 und WT nicht in der Aktivität, weder nach TMT noch nach DEP Exposition (ANOVA: Exposition  $F(2,32)=0,316$   $P=0,73$ ; Genotyp  $F(2,32)=1,017$   $P=0,37$ )(Abb. 15).

### Laufzeit



### Aktivität



**Abbildung 15**

Laufzeit und Aktivität vor (Tag 3-5) und nach der TMT- bzw. DEP-Exposition bei GAD67 und WT. In der Laufzeit benötigen die GAD67 länger nach TMT- und DEP-Exposition. Bei der Aktivität traten keine signifikanten Unterschiede auf. (T-Test \*\*  $P<0,01$  \* $P<0,5$ )

## 3.2. mRNA-Expression

### 3.2.1. Expression der CRF mRNA mittels qrt-PCR

Hier sind die quantifizierten Werte der CRF-mRNA im BNST, Amygdala, Hippocampus, PVN, LC, und vBO mit zwei verschiedenen housekeeper-Genen dargestellt. Die Untersuchungen erfolgten primär mit dem GAPDH-Gen (Abb. 16) und wurden dann mit dem  $\beta$ -actin Gen (Abb. 17) wiederholt. Die qrt-PCR-Ergebnisse sind mit der deltaCT-Darstellung gezeigt, bei der ein niedriger deltaCT-Wert eine höhere mRNA-Expression des zu untersuchenden Gens, in diesem Fall CRF bzw. c-Fos, bedeutet. Da jeder Faktor nur aus zwei Parametern besteht, analysierten wir die Unterschiede in den untersuchten Hirnregionen mittels Welch-Test.

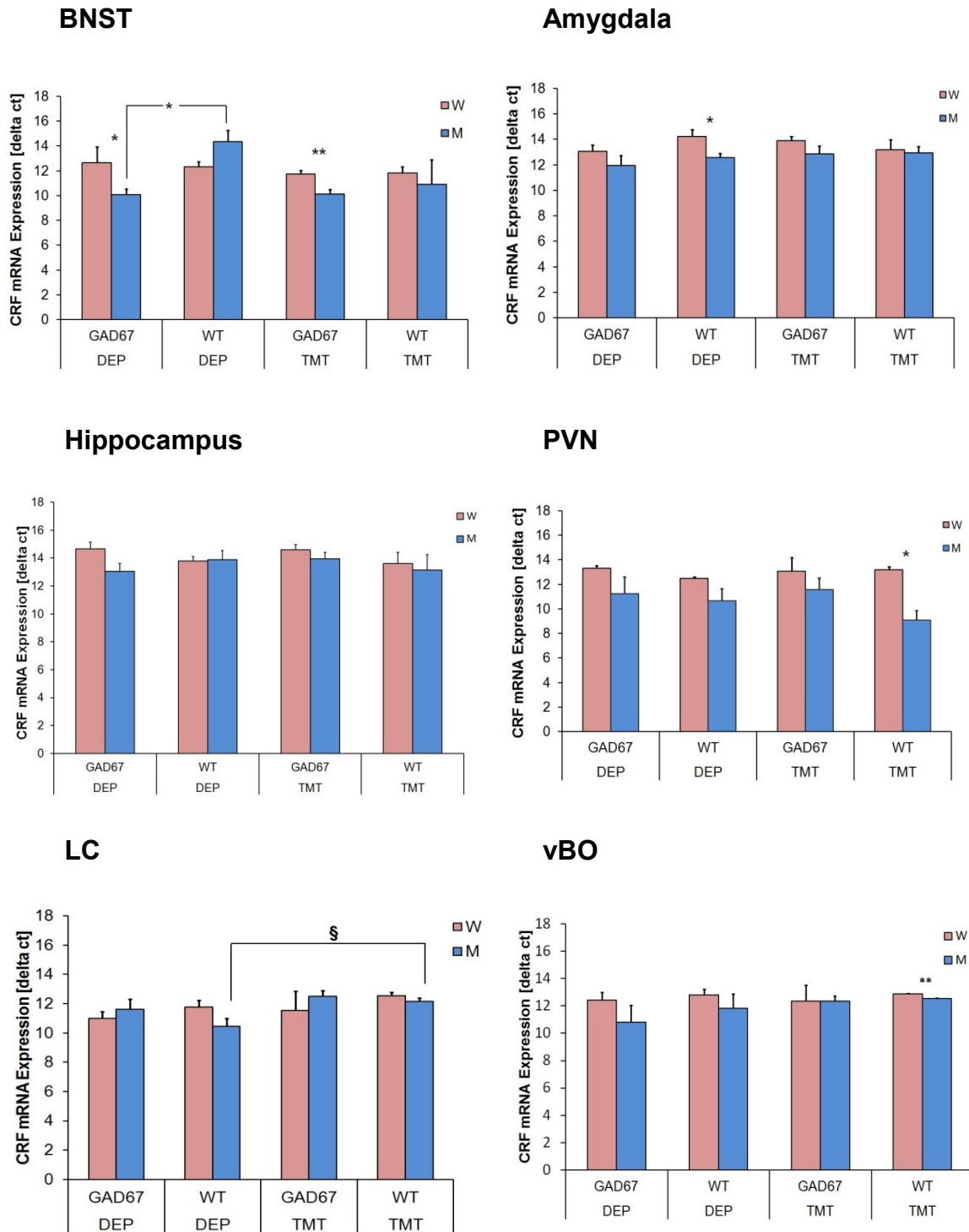
Eine Varianzanalyse (ANOVA) für die dargestellten Hirnregionen mit den Faktoren Genotyp (GAD67 und WT), Exposition (DEP und TMT) sowie dem Geschlecht zeigen signifikante Effekte in der CRF-Expression. Ich möchte hier vor allem auf die gezeigten signifikanten Änderungen eingehen. Bei der Quantifizierung der CRF-mRNA mit GAPDH als *housekeeper* Gen konnten signifikante Effekte für den BNST, die Amygdala, den PVN und den LC gezeigt werden.

Im BNST (Abb. 16) zeigt die ANOVA einen Genotypeneffekt ( $F(1,44)=5,85$   $p<0,05$ ) und weiterhin einen Expositionseffekt ( $F(1,44)=5,925$   $p<0,05$ ). Daneben sind sowohl die Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht ( $F(1,44)=7,157$   $p<0,02$ ) und Genotyp, Exposition und Geschlecht ( $F(1,44)=4,100$   $p=0,05$ ) signifikant. Der Welch-Test als Folgetest für ungepaarte Proben mit ungleichen Varianzen zeigte signifikant erhöhte CRF-mRNA Werte im BNST männlicher GAD67 Mäuse verglichen mit weiblichen GAD67. Dieser Anstieg konnte sowohl nach DEP- ( $P<0,05$ ) als auch nach TMT-Exposition ( $P<0,01$ ) beobachtet werden. Weiterhin zeigen die männlichen GAD67 Mäuse signifikant erhöhte mRNA-Werte für CRF nach DEP-Exposition ( $P<0,05$ ) verglichen mit männlichen WT. Dieser Unterschied tritt nicht bei TMT-Exposition auf. Auch weibliche Mäuse zeigen im BNST keine signifikanten Effekte.

In der Amygdala und dem PVN (Abb. 16) konnten signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Mäusen gezeigt werden (Amygdala:  $F(1,41)=5,983$   $p<0,05$ ; PVN:  $F(1,25)=9,473$   $p<0,01$ ). Ein Nachfolgetest für ungleiche Varianzen (Welch-Test) zeigte für Männchen eine höhere CRF-mRNA Expression nach DEP-Exposition in der Amygdala ( $P<0,05$ ) bzw. nach TMT-Exposition im PVN ( $P<0,05$ ) verglichen mit Weibchen.

Im LC (Abb. 16) konnten ein signifikanter Expositionseffekt ( $F(1,25)=7,112$   $p<0,02$ ) und eine signifikante Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht ( $F(1,25)=5,237$   $p<0,05$ ) gezeigt werden. Allerdings konnten im Folgetest keine signifikanten Unterscheide mehr gezeigt werden.

Für die Regionen Hippocampus und vBO (Abb. 16) zeigte die ANOVA keine Unterschiede.



**Abbildung 16**

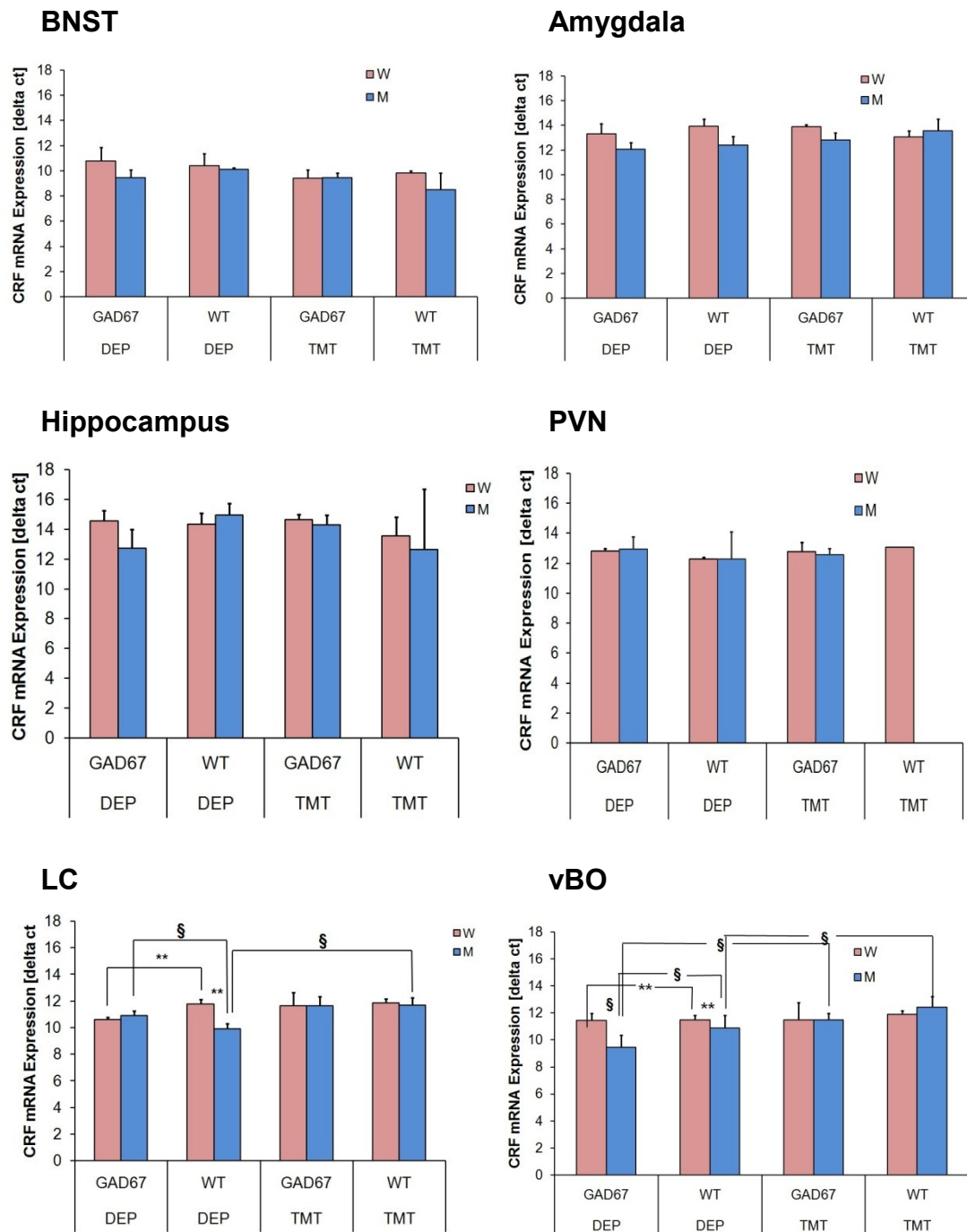
CRF-mRNA Expression mit **GAPDH** als *housekeeper*-Gen in weiblichen (W) und männlichen (M) GAD67 und WT Mäusen nach DEP- bzw. TMT-Exposition und 8-Arm Radiallabyrinth in verschiedenen Hirnregionen. Die mRNA-Expressionen sind als deltact-Wert + SEM gezeigt. (T-Test \*\* P<0,01 \* P<0,05 § P<0,1).

Die Ergebnisse der CRF-mRNA Expression zeigen deutliche Unterschiede im BNST zwischen männlichen und weiblichen GAD67, dabei konnte bei den GAD67-Männchen erhöhte CRF-Werte nachgewiesen werden.

Weiterhin führt schon die Exposition des Kontrollduftstoffes DEP in der Amygdala bei männlichen WT zu höheren CRF-mRNA Expression, wohingegen diese im PVN durch den TMT Duftstoff erhöht wird.

Im Vergleich dazu wurden die Proben mit einem weiteren *housekeeper* Gen, dem  $\beta$ -actin analysiert. Hierbei ergaben sich deutlich weniger signifikante Unterschiede. Die signifikanten Unterschiede in der Amygdala ( $F(1,26)=5,077$   $p<0,05$ ) und dem LC ( $F(1,25)=7,668$   $p<0,05$ ) wurden bestätigt. In der Amygdala zeigten die Folgetests keine Unterschiede (Abb. 17). Im LC konnten bei den WT nach DEP-Exposition ein Unterschied zwischen Männchen und Weibchen gezeigt werden, sowie ein Unterschied zwischen GAD67 und WT bei den Weibchen nach DEP-Exposition (Abb. 17). Die mit GAPDH als *housekeeper*-Gen dargestellten Unterschiede im BNST und PVN zeigten sich in der qrt-PCR mit  $\beta$ -actin als *housekeeper*-Gen leider nicht (Abb. 17). Allerdings konnte hier im vBO ein signifikanter Expositionseffekt ( $F(1,25)=6,121$   $p<0,05$ ) ermittelt werden. Im Nachfolgetest zeigten sich jedoch keine Unterschiede (Abb. 17).

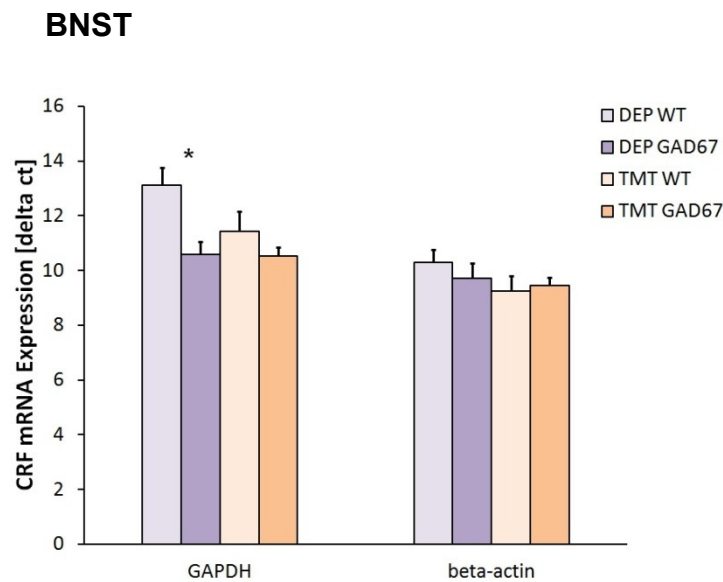




**Abbildung 17**

CRF-mRNA Expression mit  $\beta$ -actin als *housekeeper*-Gen in weiblichen (W) und männlichen (M) GAD67 und WT Mäusen nach DEP- bzw. TMT-Exposition und 8-Arm Radiallabyrinth in verschiedenen Hirnregionen. Die mRNA-Expressionen sind als delta ct-Wert + SEM gezeigt. (T-Test \*\*  $P < 0,01$  \*  $P < 0,05$  §  $P < 0,1$ ).

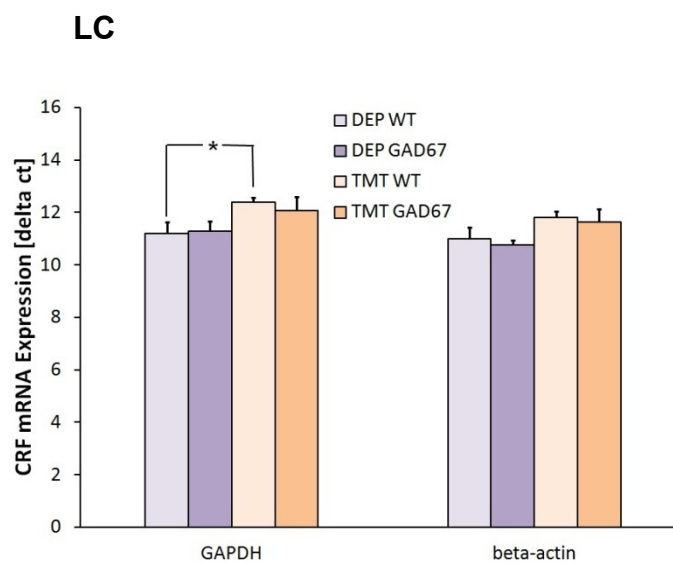
Vergleicht man, wie bei den Verhaltensdaten, männliche und weibliche Mäuse gemeinsam so ergeben sich für den BNST ein Genotyp-Unterschied nach DEP-Exposition ( $P < 0,05$ ), nicht jedoch nach TMT-Exposition ( $P = 0,17$ ). Dies konnte nur bei den Ergebnissen mit dem *housekeeper*-Gen GAPDH, nicht jedoch mit dem *housekeeper*-Gen  $\beta$ -actin gezeigt werden (Abb. 18). Weiterhin unterscheiden sich dabei die WT in ihrer Reaktion auf DEP- und TMT-Exposition (Abb.19)



**Abbildung 18**

CRF-mRNA Expression mit **GAPDH** und  **$\beta$ -actin** als *housekeeper*-Gen im **BNST**.

Weibliche und männliche Mäuse wurden gemeinsam betrachtet. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich zwischen GAD67 und WT nach DEP-Exposition mit GAPDH. mRNA-Expressionen sind als deltact-Wert + SEM gezeigt. (T-Test \*  $P < 0,05$ ).



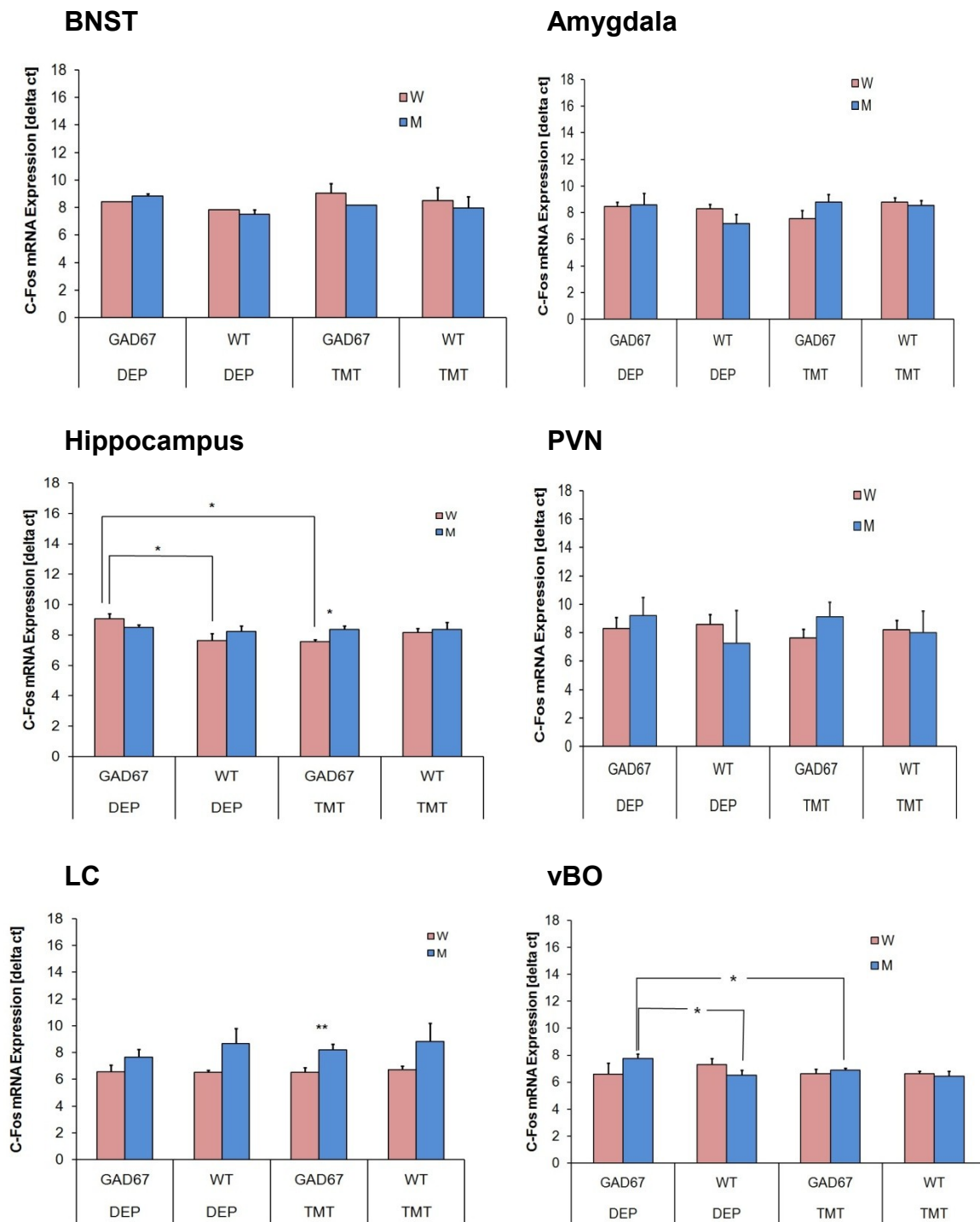
**Abbildung 19**

CRF-mRNA Expression mit **GAPDH** und  **$\beta$ -actin** als *housekeeper*-Gen im **LC**. Weibliche und männliche Mäuse wurden gemeinsam betrachtet. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich bei den WT zwischen DEP- und TMT-Exposition mit GAPDH. mRNA-Expressionen sind als deltact-Wert + SEM gezeigt. (T-Test \*  $P < 0,05$ ).

### 3.2.2. Expression der c-Fos-mRNA mittels qrt-PCR

Eine Varianzanalyse (ANOVA) für die dargestellten Hirnregionen mit den Faktoren Genotyp (GAD67 und WT), Exposition (DEP und TMT) sowie dem Geschlecht zeigen nur einige signifikante Effekte in der c-Fos Expression. Mit dem *housekeeper*-Gen GAPDH (Abb. 20) ergibt sich in der ANOVA lediglich für die Amygdala eine signifikante Interaktion zwischen der Exposition und dem Geschlecht ( $F(1,26)=6,284$   $p<0,05$ ). Ein Nachfolgetest zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Die in der Abbildung dargestellten Signifikanzen beruhen auf einzelnen T-Tests mit den jeweiligen Gruppen. So zeigen sich Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen GAD67 Mäusen nach TMT-Exposition im LC und Hippocampus. Daneben zeigen sich im Hippocampus Unterschiede bei weiblichen Mäusen. Zum einen unterscheiden sich weibliche GAD67 und WT Mäuse nach DEP-Exposition und bei den weiblichen GAD67 Mäusen gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen der DEP- und TMT-Exposition.

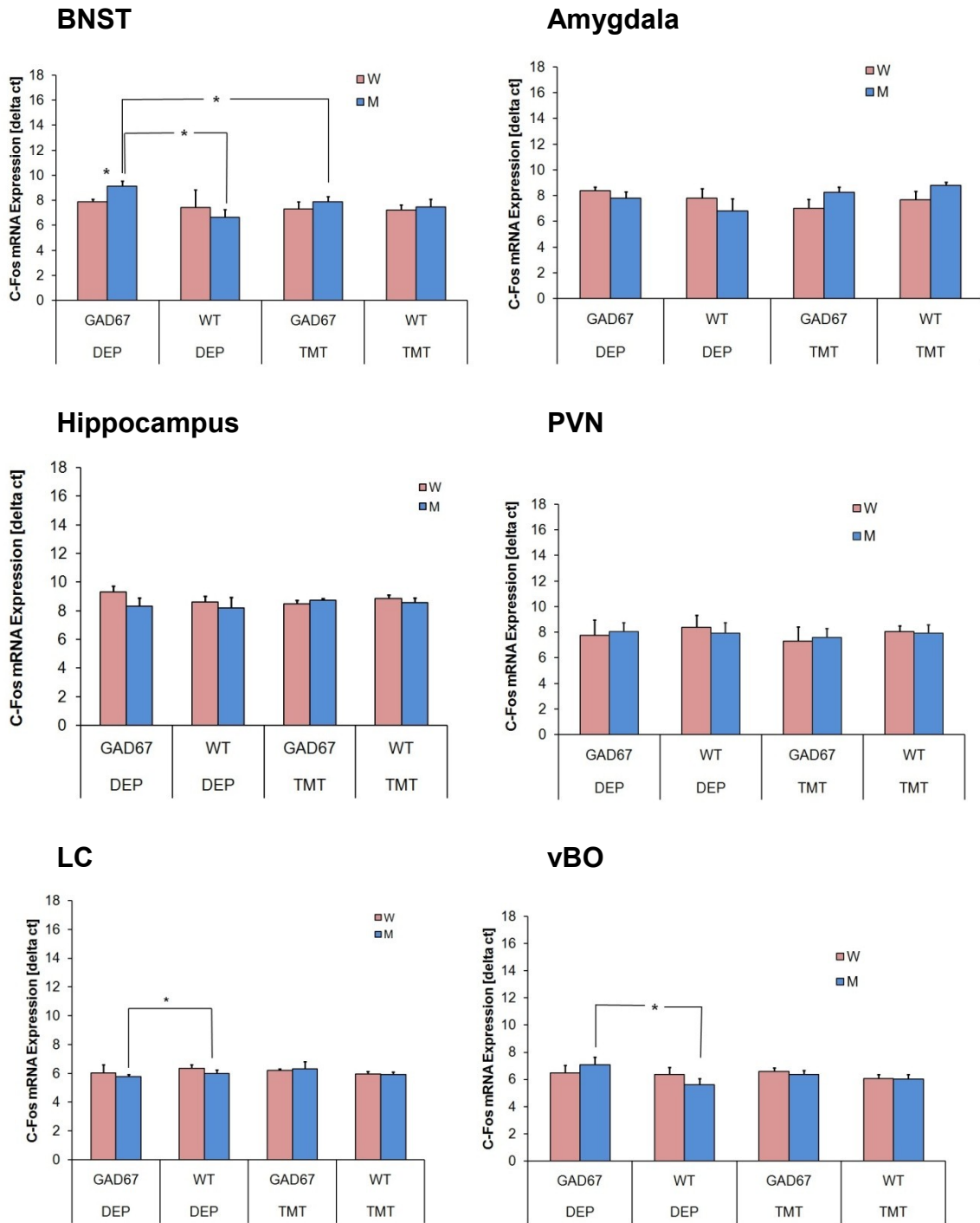


**Abbildung 20**

C-Fos-mRNA Expression mit **GAPDH** als *housekeeper*-Gen in weiblichen (W) und männlichen (M) GAD67 und WT Mäusen nach DEP- bzw. TMT-Exposition und 8-Arm Radiallabyrinth in verschiedenen Hirnregionen. Die mRNA-Expressionen sind als deltact-Wert + SEM gezeigt. (T-Test \*\* P<0,01 \* P<0,05 § P<0,1).

Auch bei der Bestimmung der c-Fos-mRNA Expression wurden die Proben im Vergleich mit einem weiteren *housekeeper*-Gen, dem  $\beta$ -actin analysiert (Abb. 21). Hierbei ergaben sich etwas mehr signifikante Unterschiede. Diese Unterschiede finden sich im LC als Geschlechtereffekt ( $F(1,72)=10,542$   $p<0,01$ ), im Hippocampus als Interaktion von Genotyp und Exposition ( $F(1,56)=5,232$   $p<0,05$ ) und im vBO als Interaktion zwischen Genotyp und Geschlecht ( $F(1,61)=4,121$   $p<0,05$ ). Hier ergeben die Folgetests lediglich im vBO eine signifikant höhere c-Fos-mRNA Expression in männlichen GAD67 nach DEP-Exposition verglichen mit männlichen WT ( $P<0,05$ ).

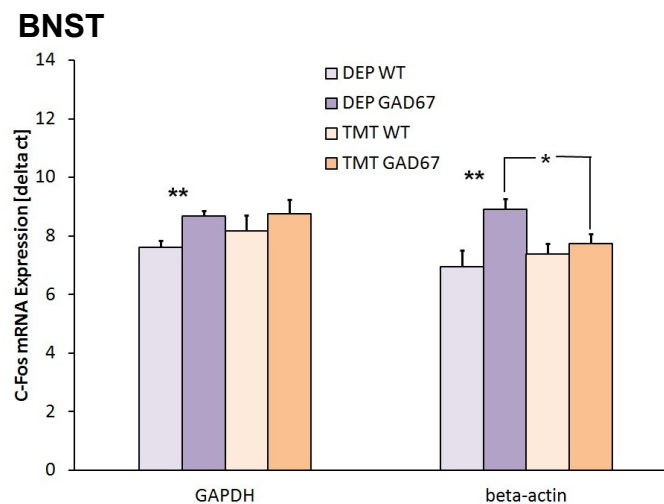
Die in der Abbildung dargestellten Signifikanzen beruhen auf einzelnen T-Tests mit den jeweiligen Gruppen. So zeigen sich Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen GAD67 Mäusen nach DEP-Exposition im BNST. Daneben zeigen sich im BNST Unterschiede bei männlichen Mäusen. Hier zeigen männliche GAD67 Mäuse nach DEP-Exposition eine geringere c-Fos Expression als männliche WT und die GAD67 Mäuse exprimieren ebenfalls weniger c-Fos nach TMT Exposition.



**Abbildung 21**

C-Fos-mRNA Expression mit  $\beta$ -actin als *housekeeper*-Gen in weiblichen (W) und männlichen (M) GAD67 und WT Mäusen nach DEP- bzw. TMT-Exposition und 8-Arm Radiallabyrinth in verschiedenen Hirnregionen. Die mRNA-Expressionen sind als delta ct-Wert + SEM gezeigt. (T-Test \*  $P < 0,05$ ).

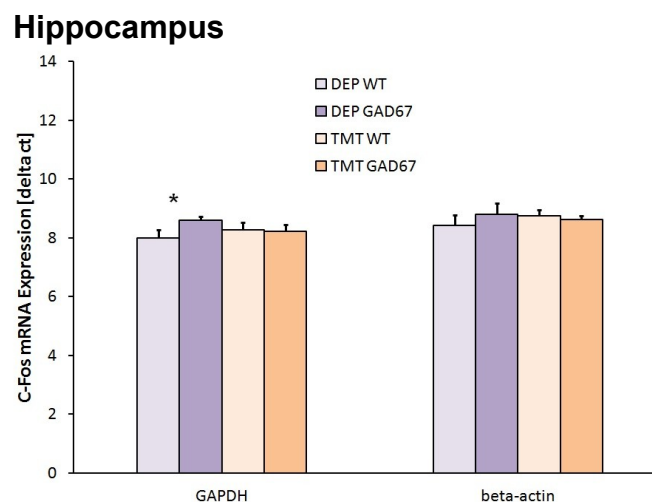
Untersucht man wieder die männlichen und weiblichen Tiere zusammen so zeigen sich einige Unterschiede. Im BNST findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen GAD67 und WT nach DEP-Exposition sowohl bei Einsatz des *housekeeper*-Gen GAPDH ( $P < 0,01$ ) als auch  $\beta$ -actin ( $P < 0,01$ ). Daneben unterscheiden sich die GAD67 Mäuse bei der Exposition ( $P < 0,05$ ) (Abb. 22). Im Hippocampus findet sich ebenfalls ein Unterschied zwischen den Genotypen nach DEP-Exposition ( $P < 0,05$ ), allerdings nur bei Verwendung des *housekeeper*-Gens GAPDH (Abb. 23). Weitere signifikante Unterschiede konnten nicht gezeigt werden.



**Abbildung 22**

**C-Fos-mRNA Expression mit GAPDH und  $\beta$ -actin als *housekeeper*-Gen im BNST.**

Weibliche und männliche Mäuse wurden gemeinsam betrachtet. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich zwischen GAD67 und WT nach DEP-Exposition mit GAPDH und  $\beta$ -actin, sowie zwischen GAD67 nach DEP- bzw. TMT-Exposition. mRNA-Expressionen sind als  $\Delta$ -Wert + SEM gezeigt. (T-Test \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$ ).

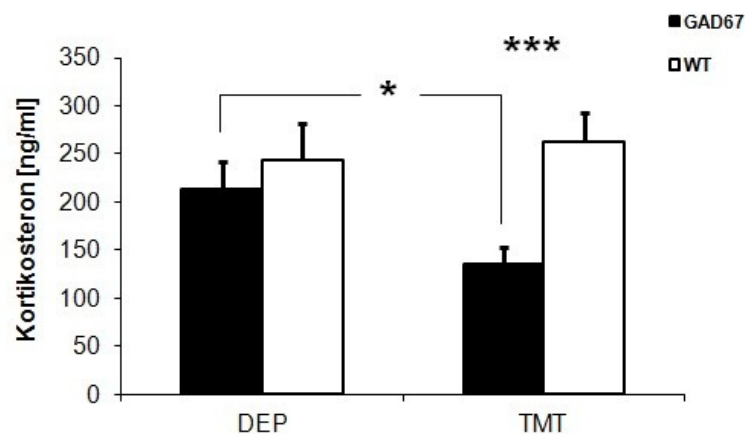


**Abbildung 23**

**C-Fos-mRNA Expression mit GAPDH und  $\beta$ -actin als *housekeeper*-Gen im Hippocampus.** Weibliche und männliche Mäuse wurden gemeinsam betrachtet. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich zwischen GAD67 und WT nach DEP-Exposition mit GAPDH. mRNA-Expressionen sind als  $\Delta$ -Wert + SEM gezeigt. (T-Test \*  $P < 0,05$ ).

### 3.3. Kortikosteronkonzentration im Stammblood

Die Kortikosteron-Werte der Mäuse unterscheiden sich signifikant (Abb. 24). Zum einen führt eine TMT-Exposition bei den GAD67 Mäusen zu einer signifikant niedrigeren Kortikosteronfreisetzung als bei den WT (T-Test,  $P < 0,0001$ ). Eine DEP-Exposition führt nicht zu unterschiedlichen Kortikosteronwerten ( $P = 0,51$ ). Daneben führt bei den GAD67 Mäusen eine TMT-Exposition überraschenderweise zu einer geringeren Freisetzung von Kortikosteron im Vergleich zu einer DEP-Exposition (T-Test,  $P < 0,05$ ). Bei den WT ist kein Unterschied festzustellen zwischen einer DEP- oder TMT-Exposition (T-Test  $P = 0,67$ ).



**Abbildung 24**

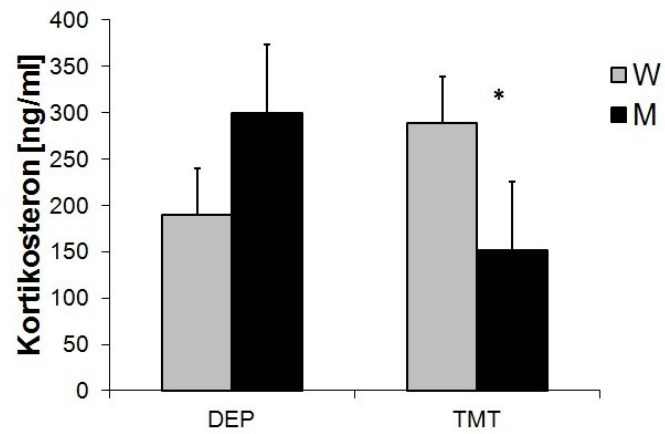
Kortikosteronwerte nach TMT- bzw. DEP-Exposition in GAD67 und WT Mäusen.

Signifikante Unterschiede nach TMT-Exposition und zwischen DEP- und TMT-Exposition bei GAD67.

Wert + SEM gezeigt. (T-Test \*\*\*  $P < 0,0001$  \*  $P < 0,05$ ).

Im Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Tieren zeigte der T-Test einen signifikanten Unterschied bei den TMT-exponierten Tieren ( $p < 0,05$ ). Dabei hatten die männlichen Tiere deutlich weniger Kortikosteron im Serum als die weiblichen Tiere (Abb. 25). Im Vergleich der männlichen und weiblichen Tiere in Bezug auf den Genotyp konnten im T-Test keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden.





**Abbildung 25**

Kortikosteronwerte nach TMT- bzw. DEP-Exposition in weiblichen (W) und männlichen (M) Mäusen. GAD67 und WT-Tiere wurden zusammengefasst, es fand hier keine Unterscheidung nach Genotyp statt. Signifikante Unterschiede nach TMT-Exposition treten auf. Wert + SEM gezeigt. (T-Test \*  $P < 0,05$ ).

## 4. Diskussion

Diese Untersuchung ging der Frage nach, ob sich GAD67 und WT-Tiere im Lernverhalten unterscheiden und ob sich der geringere Gehalt an GABA bei GAD67-Mäusen auf das Lernverhalten unter akutem, durch TMT induziertem Stress auswirkt. Zudem wurde untersucht, ob sich ein Unterschied in der Aktivierung von olfaktorisch- und Stress-assoziierten Kerngebieten im Hirn ergibt. Der Stresslevel wurde durch Bestimmung des Plasma-Kortikosterongehaltes untersucht.

In meinen Untersuchungen zeigten sich bezüglich des Verhaltens bei GAD67 und WT eine signifikante Abnahme der WME innerhalb der ersten fünf Trainingstage und somit eine deutliche Steigerung der Leistung im räumlichen Lernen. Unterschiede zwischen GAD67 und WT wurden nicht beobachtet. Lediglich zu Beginn der Untersuchung zeigte sich bei GAD67-Mäusen ein schlechterer Wert für die *New Arm Entries* (NAE) im Vergleich zu den WT, was aber schon am 2. Trainingstag ausgeglichen wurde. Somit kann gezeigt werden, dass der Verlust eines Gad67-Allels nicht zu einer schlechteren räumlichen Lernleistung führt.

Am Expositionstag zeigten sich für GAD67 als auch für WT-Tiere nach TMT-Exposition eine Zunahme der WME und somit eine Verschlechterung der Lernleistung. Bei DEP-Exposition als Kontrolle zeigte sich nur für die GAD67-Tiere eine Verschlechterung der Lernleistung. Dabei unterscheiden sich GAD67 und WT nach DEP-Exposition nicht signifikant. Für die Laufzeit ergab sich eine Zunahme bei den GAD67-Tieren sowohl nach DEP- als auch nach TMT-Exposition. Allerdings unterscheiden sich auch hier die GAD67 und WT nicht.

Bezüglich der CRF-Expression in Relation zum *housekeeper* GAPDH zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen GAD67-Tieren im BNST. Männliche GAD67-Tiere zeigen dabei signifikant höhere Werte unter TMT als weibliche. Unter DEP-Exposition zeigten die männlichen GAD67-Tiere zudem eine höhere CRF-Expression im BNST im Vergleich zu den männlichen WT. Bei TMT-Exposition konnte zwischen den männlichen GAD67 und WT kein Unterschied in der CRF-Expression im BNST gezeigt werden.

In der Amygdala konnte ein Unterschied in der CRF-Expression für DEP-exponierte WT-Tiere gezeigt werden, wobei die männlichen Tiere eine signifikant höhere Expression zeigten. Im PVN zeigte sich der gleiche Unterschied allerdings nach TMT.

Mit einem zweiten *housekeeper* wollten wir das Ergebnis bestätigen, jedoch ließen sich deutlich weniger Unterschiede mit  $\beta$ -actin als *housekeeper* darstellen. Im vBO fand sich eine höhere c-Fos-Expression bei männlichen GAD67 nach DEP verglichen mit den WT. Nach TMT zeigte sich ein

signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen GAD67 sowohl im LC als auch im Hippocampus. Ebenfalls im LC und Hippocampus fand sich bei den weiblichen GAD67 eine signifikant höhere c-Fos-Expression nach TMT im Vergleich zu DEP.

Im Hinblick auf die Kortikosteronwerte fand sich bezogen auf den Genotyp bei den GAD67-Tieren der geringste Kortikosteronwert nach TMT. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den WT als auch im Vergleich zu den DEP-exponierten GAD67. In Bezug auf das Geschlecht zeigte sich im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Tieren bei männlichen Tieren unter TMT die geringste Kortikosteronkonzentration. Im Vergleich zu DEP ließ sich keine Signifikanz darstellen.

Bei GAD67-Mäusen ist die Expression von GABA signifikant reduziert (Tamamaki *et al.*, 2003) und im Vergleich zu WT-Mäusen besteht die Hypothese, dass dies einen Einfluss auf Schaltkreise im Gehirn haben könnte. So zeigen Patientinnen mit diagnostizierter PTSD (Post-Traumatic Stress Disease) reduzierte Werte für GABA (Vaiva *et al.*, 2004; Vaiva *et al.*, 2006) sowie eine reduzierte Aktivität der GABA-Rezeptoren (Southwick *et al.*, 1999). Umgekehrt konnte GABA als abschwächender Faktor bei Depression identifiziert werden (Herman and Cullinan, 1997). Diese Untersuchung ging unter anderem der Frage nach, ob der geringere Gehalt an GABA bei GAD67-Tieren einen Einfluss auf das Lernverhalten, die Stressachse sowie die Expression von c-Fos und CRF in Hirnarealen beeinflusst, die mit der Verarbeitung von olfaktorischen sowie angstauslösenden Reizen assoziiert sind. Bezüglich des Lernverhaltens ließ sich zeigen, dass es keinen Einfluss hat. So konnte bereits in vorhergehenden Untersuchungen gezeigt werden, dass es bei männlichen Tieren keinen Unterschied zwischen GAD67 und WT-Tieren gibt (Janitzky *et al.*, 2011). In meiner Untersuchung konnten diese Ergebnisse durch den Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Tieren ergänzt werden. Die GAD67-Tiere gingen zwar mit einer signifikant geringeren Anzahl an NAE am Tag 1 in die Versuche, es ließ sich jedoch eine Angleichung der beiden Genotypen nach dem ersten der fünf Trainingstage zeigen. Auch an den Expositionstagen ließen sich zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede darstellen. In Bezug auf die Expression in stressassoziierten Hirnarealen ließen sich Unterschiede darstellen, die jedoch mit den zwei verwendeten *housekeeper*-Genen keine übereinstimmenden Ergebnisse zeigten. Ein Unterschied ließ sich jedoch im Kortikosteronlevel nach TMT-Exposition darstellen.

Die von Tamamaki berichtete Verringerung der GABA-Synthese auf 50% im Vergleich zu nicht manipulierten Tieren wurde unter Normalbedingungen untersucht (Tamamaki *et al.*, 2003). Die Tiere waren nicht unter Stress und mussten keine Lernaufgaben erfüllen. Unter Basalbedingungen kann dies also durchaus zutreffen. Wie jedoch im Einleitungsteil dargestellt, gibt es nicht nur GAD67 sondern auch GAD65. Beide Enzyme sind für die GABA-Synthese im Hirn verantwortlich. Die Aktivität beider Enzyme ist von PLP abhängig und GAD67 liegt unter Normalbedingungen in apo-GAD67-Form

vor. Erst bei Zellaktivität wird das Enzym durch PLP aktiviert (Erlander *et al.*, 1991). Es ist also durchaus denkbar, dass die Enzymaktivität trotz geringerer Menge an GAD67 deutlich steigerbar ist. Zudem ist vorstellbar, dass kompensatorisch bei Zellaktivität mehr GAD65 synthetisiert wird und auf diesem Wege ebenfalls eine deutliche Steigerung der GABA-Synthese erfolgen kann. Soweit meine Literaturrecherche ergab, hat es bislang keine Untersuchungen in dieser Richtung bei den GAD67-Mäusen gegeben. Hier wäre es sicherlich sinnvoll in der Zukunft weitere Untersuchungen durchzuführen.

Dass mit Einsatz von zwei *housekeeper*-Genen keine übereinstimmenden Ergebnisse erzielt werden konnten, verwundert zunächst. Eingesetzt wurde das zweite *housekeeper*-Gen  $\beta$ -actin, um die Ergebnisse untermauern zu können. Man muss zunächst erwähnen, dass sich die Primer von GAPDH und  $\beta$ -actin zwar nur gering, aber dennoch in den Effizienzen unterscheiden. Zudem unterscheiden sich die CT-Werte von GAPDH und  $\beta$ -actin um fast einen halben Zyklus. Dabei zeigt GAPDH einen niedrigeren CT-Wert womit also mehr GAPDH in den Zellen exprimiert wird als  $\beta$ -actin. Da c-Fos und CRF im Verhältnis zu den *housekeepern* bestimmt werden (delta ct), könnte also eine geringe Menge von  $\beta$ -actin bewirken, dass die ohnehin kleinen Differenzen nicht als signifikant erkannt werden.

GAPDH findet breiten Einsatz als *housekeeper*-Gen, da es als Baustein des Energiestoffwechsels ubiquitär in jeder Zelle exprimiert wird. Allerdings variiert die Expression zwischen den einzelnen Zelltypen stark, in Fibroblasten z.B. ließ sich eine relativ hohe Expression nachweisen, wohingegen in Leukozyten eine relativ geringe Expression darstellbar ist (Szabo *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von GAPDH durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst werden kann, z.B. durch oxidativen Stress und Hypoxie (Graven *et al.*, 1994; Ito *et al.*, 1996; Feldhaus, L.M. and Liedtke, A.J., 1998; Zhong and Simons, 1999). Offensichtlich ist die Funktion von GAPDH abhängig von seinem Phosphorylierungszustand (Kawamoto and Caswell, 1986; Laschet *et al.*, 2004). Mittels Autophosphorylierung kann GAPDH Kinase-Aktivität erlangen, z.B. am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor. Da die Mäuse eine Woche lang mit wenig Futter versorgt wurden, um den Anreiz zur Futtersuche im Labyrinth zu erhöhen, wurde über die mögliche Hypoglykämie oxidativer Stress ausgelöst. Sie erhielten zwar uneingeschränkten Zugang zu Wasser, das Futter wurde jedoch so rationiert, dass die Tiere ca. 85-90% ihres Ausgangsgewichtes erreichen sollten und dies 6 Tage halten mussten. Das war jedoch nicht einfach steuerbar, die Gewichtsschwankungen waren gerade zu Beginn sehr stark, während der Versuchsreihe hatten die Tiere durchschnittlich 83% ihres Ausgangsgewichtes und lagen somit leicht unter dem vorgegebenen Gewichtsziel.

Möglicherweise wurde durch den stärkeren Gewichtsverlust und den niedrigen Blutzuckerspiegel zusätzlicher Stress induziert und so ein ubiquitär erhöhter Level auch an c-Fos erreicht, sodass sich Unterschiede nicht darstellen ließen. In einer Untersuchung von Angeles-Castellanos *et al.* konnte bei

futterdeprivierten Mäusen eine c-Fos-Induktion in der Amygdala (BLA und CeA), im BNST, dem lateralen Septum, dem präfrontalen Kortex und im PVN gezeigt werden. Im Hippocampus konnte kein Anstieg dargestellt werden (Angeles-Castellanos *et al.*, 2007). Es ist also möglich, dass ein Teil meiner Ergebnisse durch diesen Futterstress überlagert sind und somit keine alleinigen Effekte des TMT zeigen. Gerade für den BNST konnte gezeigt werden, dass c-Fos bei Futter- und Belohnungserwartung erhöht ist (Moncho-Bogani *et al.*, 2005; Valdés *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnte in einer Untersuchung von Kessler gezeigt werden, dass es nach TMT-Exposition zu einem Anstieg der Aktivität im dorsalen periaquäduktalen Grau kam. Dieser Aktivitätsanstieg wurde mittels fMRI dargestellt. Es ließ sich jedoch kein Anstieg des c-Fos in dieser Region nachweisen (Kessler *et al.*, 2012). Somit kann man schließen, dass nicht jede Aktivierung einer Hirnregion zwangsläufig eine Erhöhung von c-Fos zur Folge hat. Hier sind sicher weiterführende Untersuchungen nötig.

Beta-actin als Bestandteil des Zytoskeletts einer jeden Zelle wird ebenfalls häufig als housekeeping-Gen eingesetzt. Für  $\beta$ -actin konnte jedoch gezeigt werden, dass die mRNA von  $\beta$ -actin gerade bei reifen Neuronen in den Dendriten aufbewahrt und bei Bedarf exprimiert wird (Dahm *et al.*, 2007). Es kann also auch hier vermutet werden, dass es im Laufe der Versuche zu einer Induktion und Speicherung von  $\beta$ -actin-mRNA in den Dendriten und somit zu einem Einfluss auf die Werte gekommen sein kann.

Die berechnete Aktivität der Tiere im Radiallabyrinth ist u.a. Ausdruck ihrer Neugier. In der freien Wildbahn stellt die angeborene Angst vor Fressfeinden oder Hinweisen auf die Anwesenheit eines Fressfeindes (wie der Duft) einen überlebenswichtigen Vorteil für das Individuum dar und hängt von der Aktivierung der Amygdala und des BNST ab. Diese Hirnregionen beeinflussen die endogene Plastizität im Hippocampus und können so die Entstehung eines räumlichen Gedächtnisses beeinflussen (Diamond *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2008). Eine reduzierte Aktivität kann dabei als Zeichen von Angst interpretiert werden (Heinrichs *et al.*, 1992; Roseboom *et al.*, 2007) und eine extrem verminderte Aktivität kann als Zeichen einer angst-assoziierten Psychopathologie gedeutet werden (Roseboom *et al.*, 2007). TMT als Duft eines Fressfeindes ist ein geeigneter Kandidat, um eine unconditionierte Angst bei Mäusen und so reproduzierbar ein ängstliches Verhalten wie freezing, Vermeidung oder verminderte Aktivität auszulösen (Dielenberg *et al.*, 2001; Blanchard *et al.*, 2003; Apfelbach *et al.*, 2005). Es konnte jedoch nicht in allen Studien eine eindeutige angstausslösende Wirkung gezeigt werden (Dielenberg *et al.*, 2001). In Untersuchungen zeigte sich bei Ratten, dass Katzengeruch oder die direkte Exposition zu einem Feind wirkungsvoller ist als TMT (Wallace and Rosen, 2000; Fendt *et al.*, 2003). Möglicherweise können diese unterschiedlichen Ergebnisse von der Spezies oder auch von der eingesetzten Konzentration abhängig sein (Takahashi *et al.*, 2005). Bei

meinen Versuchen zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg der Fehler nach TMT-Exposition sowohl bei WT als auch GAD67-Tieren, womit von einer wirksamen Menge auszugehen ist, die zuverlässig einen Stressreiz dargestellt hat. Bei den GAD67-Tieren zeigt sich darüber hinaus eine deutliche Zunahme der Laufzeit. Auch das kann als Zeichen für Stress gewertet werden. Jedoch ist bei den GAD67-Tieren unter DEP-Exposition ebenfalls eine Zunahme sowohl bei den WME als auch bei der Laufzeit zu verzeichnen. Für die GAD67-Tiere konnte bereits eine erhöhte Stressempfindlichkeit gezeigt werden (Janitzky *et al.*, 2011). Akuter Stress erhöht die GAD67-Expression im BNST (Krettek and Price, 1978) und der Verlust des GABAergen Tonus führt zu einer verstärkten Antwort der HPAA bei akutem Stress (Dent *et al.*, 2007). Eine intakte GABAerge Antwort im BNST scheint somit entscheidend für die normale Regulation von angst-assoziiertem Verhalten (Sajdyk *et al.*, 2008). Unter basalen Bedingungen inhibiert GABA den BNST tonisch. So kann die verringerte GABA-Synthese im BNST bei GAD67-Tieren zu einer Disinhibition und somit zu einem gesteigerten Angstverhalten führen (Sajdyk *et al.*, 2008). Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass eine Disinhibition GABAerger Neurone in der perinucleären Zone um den BNST zu einer Aktivierung GABAerger Neurone im BNST und somit eine Aktivierung der HPAA zur Folge hat (Dabrowska *et al.*, 2013). In diesem Modell kann man annehmen, dass bereits die neue Box während der Habituation vor dem letzten Testtag im Radiallabyrinth einen Stressfaktor darstellt. Dafür spricht auch, dass die GAD67-Tiere an den ersten Tagen mehr Fehler machten und weniger neue Arme betraten. So dass auch bei den ersten zwei Versuchstagen noch davon ausgegangen werden könnte, dass das Labyrinth und somit die neue Umgebung für die GAD67-Tiere einen Stressfaktor darstellt. Untermauert werden könnte das möglicherweise durch die Ergebnisse im Hippocampus. Für Stress durch einen räumlichen Stimulus wird die HPAA über den Hippocampus aktiviert, wohingegen bei Hunger oder Schmerz eine direkte Verbindung zum PVN besteht (Ziegler and Herman, 2002a). Hier ist der Hippocampus nicht für die Verarbeitung des Stressors notwendig. Leider kann das in meinen Ergebnissen so nicht gezeigt werden, da sich im Hippocampus nur ein Unterschied zwischen den weiblichen WT und GAD67-Tieren unter DEP-Exposition findet. Hier haben jedoch die WT Tiere die höhere c-Fos-Expression. Bei den weiblichen GAD67-Tieren findet sich jedoch eine stärkere c-Fos-Expression unter TMT-Exposition, womit möglicherweise der Duft in Verbindung mit der Box einen zusätzlichen Stressor darstellt und es sich möglicherweise um einen Kombinationseffekt handelt. Ob die Box allein tatsächlich einen Stressor für die Tiere darstellt, sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Tatsächlich konnte in einer Untersuchung von Nikaido und Nakashima gezeigt werden, dass eine TMT-Exposition in Kombination mit einer unbekanntem Umgebung zu einer stärkeren Aktivierung der HPAA mit höheren ACTH-Werten als im Vergleich einer TMT-Exposition in einer bekannten Umgebung (Nikaido and Nakashima, 2009).

C-Fos gehört zu den eingangs bereits erläuterten immediate-early-genes, die maximale mRNA-Expression wird nach ca. 20min erreicht. Die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Expression variiert in der Literatur jedoch stark und scheint abhängig vom untersuchten Zelltyp zu sein (Sheng and Greenberg, 1990; Roseboom *et al.*, 2007). In nachfolgenden Untersuchungen könnte geklärt werden, ob ein kürzeres Zeitintervall von Exposition bis zur Entnahme der Hirnareale einen Einfluss auf die bestimmten c-Fos- und CRF-Werte hat. So konnte von der Arbeitsgruppe um Day eine starke Zunahme der c-Fos-Expression 30 min. nach TMT-Exposition im BNST, der Amygdala, dem Bulbus olfactoris, dem PVN und LC gezeigt werden (Day, H. E. W. *et al.*, 2004a). Bei CRF zeigt sich hingegen ein peak nach ca. 60min. (Moldow *et al.*, 1987; Rouwette *et al.*, 2011).

Der LC spielt bei der Aufmerksamkeit eine große Rolle (Ziegler and Herman, 2002b). Wie in den Ergebnissen gezeigt, ist die c-Fos-Expression mit GAPDH als Marker im LC nach TMT-Exposition bei weiblichen Tieren signifikant erhöht. Diese scheinbar erhöhte Aufmerksamkeit spiegelt sich jedoch nicht im Verhalten wider, da zwischen männlichen und weiblichen Tieren kein Unterschied dargestellt werden konnte.

Es konnte gezeigt werden, dass CRF die Aktivität im LC beeinflusst. Es wird eine Modulation über das monoaminerge System angenommen (Snyder *et al.*, 2012) und es konnte ein U-förmiger Zusammenhang gezeigt werden (Luine *et al.*, 1996; Beylin and Shors, 1998; de Kloet, E. R. *et al.*, 1999; Faraji *et al.*, 2011). Geringe Mengen CRF führen demnach zu einer kognitiven Leistungssteigerung, wohingegen hohe Mengen CRF durch ein erhöhtes Noradrenalinlevel und konsekutive Inhibierung des präfrontalen Kortex einen gegenteiligen Effekt bewirken (Snyder *et al.*, 2012). Interessanterweise konnte man zeigen, dass verschiedene Entladungsmuster im LC mit unterschiedlichen Verhaltensmustern korreliert sind. Bei einer phasisch, synchron feuernenden Aktivität konnte beobachtet werden, dass das Verhalten unverändert fortgeführt wird. Dagegen fand sich bei hoher tonischer Aktivität mit erhöhten spontanen Entladungen und verringerter Synchronität ein labiles Aufmerksamkeitsverhalten mit einer Veränderung zum vorher gezeigten Verhalten. Es wird angenommen, dass CRF, das akut im Stress freigesetzt wird, dazu führt, dass das Verhalten geändert wird und so ein anderes Ergebnis der Situation erzielt werden soll (Snyder *et al.*, 2012).

Bei weiblichen Ratten reagieren die Neurone im LC sensitiver auf CRF als bei den männlichen Tieren (Bangasser *et al.*, 2010). Auch die Übertragung der Signale an den CRF-Rezeptoren ist anders als bei den männlichen Tieren. Es wird ein organisatorischer Effekt von Testosteron in der Embryonalphase sowie an kritischen Entwicklungszeitpunkten angenommen (Bangasser *et al.*, 2010). Gerade Frauen sind häufiger von stressassoziierten psychischen Erkrankungen betroffen als Männer (Kessler *et al.*, 1993; Marcus *et al.*, 2005; Bangasser *et al.*, 2010). So konnte eine östrogenabhängige Regulierung der CRF-Gene gezeigt werden und so eine mögliche CRF-Dysregulierung, wie sie bei solchen

Erkrankungen gezeigt werden konnte, erklärt werden (Vamvakopoulos and Chrousos, 1993; Vamvakopoulos, 1995). Gerade bei Erkrankungen wie melancholischer Depression und PTSD konnte eine sehr hohe CRF-Aktivität und LC-Aktivierung gezeigt werden, die eine übermäßige Erregung unterstützt (Gold *et al.*, 1996; Southwick *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2000; Gold and Chrousos, 2002; O'Donnell *et al.*, 2004).

Sowohl bei Frauen als auch bei weiblichen Nagetieren konnte in Untersuchungen beobachtet werden, dass die hypothalamische CRF-Expression erhöht ist und bestimmte Stressoren ausschließlich bei weiblichen Vertretern das CRF im Hypothalamus erhöhen (Frederiksen *et al.*, 1991; Viau *et al.*, 2005; Desbonnet *et al.*, 2008; Iwasaki-Sekino *et al.*, 2009). Ermöglicht wird das scheinbar durch ein Östrogen-Response-Element an den Genen für CRF sowie ein CRF-Binding-Protein (Bohler *et al.*, 1990; Vamvakopoulos and Chrousos, 1993; Speert *et al.*, 2002; van de Stolpe, A. *et al.*, 2004). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass eine intraperitoneale Applikation von ACTH bei weiblichen Ratten zu einem deutlich höheren Plasmakortikosteron führte als bei männlichen (Kitay, 1961). Wurde männlichen Ratten jedoch vor einer Stressexposition Östradiol gegeben, so kam es auch bei männlichen Ratten zu einer stärkeren ACTH-Ausschüttung unter Stress. Dieser Kortikosteron-erhöhende Effekt von Östrogen beruht auf einer verlängerten ACTH-Sekretion (Burgess and Handa, 1992) wahrscheinlich durch eine Störung des negativen Feedbacks am Glucocorticoidrezeptor im PVN, die über den Östrogenrezeptor-alpha vermittelt wird (Weiser and Handa, 2009).

CRF-Neurone im BNST sind GABAerg und somit inhibitorisch. Zudem unterscheiden sich die CRF-Neurone nicht nur in den Transmittern, sondern auch im Expressionsmuster für weitere Neuropeptide wie z.B. Oxytocin im PVN (Dabrowska *et al.*, 2013). CRF aus dem PVN spielt zum einen in der Aktivierung der HPAA eine bedeutende Rolle, indem es die klassische endokrine Antwort auf Stress in Gang setzt (Herman and Cullinan, 1997). Zum anderen ist es in Schaltkreise für Angstverhalten in Folge von Duftstoffexposition involviert (Takahashi, 2014). Bislang sind zwei Rezeptoren (CRFR) bekannt, über die CRF wirkt. Dabei handelt es sich um CRFR1 und CRFR2. Von CRFR2 sind bislang drei Splicevarianten bekannt, die in CRFR2 $\alpha$ , CRFR2 $\beta$  und CRFR2 $\gamma$  unterschieden werden und CRF ist höher affin zu CRFR1 als zu CRFR2 (Bale, 2005). CRFR1 scheint für das Angstverhalten von entscheidender Bedeutung zu sein. So konnte man durch Blockade von CRFR1 (durch knock-out-Mäuse und durch medikamentöse Blockade) eine Verminderung der Angstreaktion zeigen. Es kam zu einer Zunahme des explorativen und Sexualverhaltens bei Mäusen (Habib *et al.*, 2000). Die Rolle von CRFR2 scheint noch nicht so klar, man vermutet bislang jedoch einen modulierenden Effekt auf die Wirkung von CRFR1 (Bale, 2005). In Mäusen, bei denen der CRFR2 ausgeknockt war, konnte ein Anstieg des Angstverhaltens nachgewiesen werden (Bale *et al.*, 2000). In diesen Mäusen war ein Anstieg der CRF-Expression in der CeA detektierbar, was die erhöhte



Angstreaktion erklären könnte. Wurden beide Rezeptoren unterdrückt, so kam es nur zu einer geringen Angstantwort mit signifikant geringeren ACTH- und Kortikosteronwerten im Serum (Bale *et al.*, 2002). Aufgrund der anxiolytischen Effekte bei Blockade von CRFR1 ist dieser Rezeptor inzwischen interessantes Zielobjekt für neue Antidepressiva geworden. Möglicherweise führt also die gemeinsame Freisetzung von CRF mit GABA zu einer verstärkenden Wirkung durch prä- und/oder postsynaptische Effekte. Es ist somit durchaus möglich, dass es durch die geringere GABA-Synthese bei den GAD67-Tieren zu einer kompensatorisch verstärkten CRF-Synthese kommt, wie in dieser Arbeit für den BNST bei GAD67 gezeigt wird.

Eine CRF-Überexpression konnte auch für Erkrankungen wie PTSD gezeigt werden (Herman and Cullinan, 1997; Flandreau *et al.*, 2012; Sink *et al.*, 2013). Von dieser Erkrankung sind Frauen häufiger betroffen als Männer (Palanza *et al.*, 2001; Bangasser and Valentino, 2014). In meiner Untersuchung konnte eine signifikant erhöhte CRF-Expression in der Amygdala bei männlichen Tieren nach Exposition mit DEP im Vergleich zu weiblichen Tieren dargestellt werden. In der Amygdala gibt es eine hohe Dichte an CRF-Neuronen in der CeA (Heinrichs *et al.*, 1992), deren CRF-Expression bevorzugt durch psychologischen Stress aktiviert wird (Aguilar-Valles *et al.*, 2005). TMT ist für das Tier ja nur ein Zeichen dafür, dass ein potenzieller Fressfeind in der Nähe ist. Somit kann man TMT ohne erkennbare Anwesenheit eines Fressfeindes durchaus auch als psychologischen Stressor einstufen. So scheint der Anstieg von CRF in der Amygdala zu zeigen, dass es bei männlichen Tieren zu einer stärkeren Stressantwort gekommen ist. Bei Tieren, bei denen es in der CeA zu einer Überexpression von CRF kommt, konnte ein verstärktes angstähnliches Verhalten gezeigt werden. Zurückgeführt wurde dies auf eine veränderte CRF-Signalkaskade im BNST (Sink *et al.*, 2013). Solch ein Effekt kann auch bei meiner Untersuchung in den Verhaltensergebnissen gezeigt werden. Ein Anstieg von CRF in der Amygdala (insbesondere der CeA) nach Stress (in Form von Fußschocks, Konfrontation mit einer Katze oder einem Frettchen u.a.) konnte von verschiedenen Gruppen ebenfalls dargestellt werden (Roseboom *et al.*, 2007). Es gibt jedoch auch Untersuchungen bei denen keinerlei CRF-Anstieg in der Amygdala dargestellt werden konnte. Möglicherweise ist der CRF-Anstieg von der Art des Stressors und anderen Faktoren wie zum Beispiel dem Tierstamm abhängig. In den Untersuchungen, in denen sich bislang jedoch ein Anstieg des CRF darstellen ließ, war der stärkste Effekt für die CeA darstellbar. Die CeA ist ein wichtiger Baustein in der Wahrnehmung und Interpretation von bedrohlichen Zeichen aus der Umwelt, die mit einer Gefahr für das Individuum verbunden sein können (Amaral, 2002; LeDoux, 2003). Roseboom konnte mit seinem Team den stärksten Anstieg von CRF in der MeA darstellen. Die MeA hat einen modulatorischen Effekt auf die HPA. Läsionen oder medikamentöse Inhibition der MeA führten zu einer Blockierung des freezing-Verhalten bei Exposition gegenüber Fuchs- und Katzenduft (Li *et al.*, 2004; Apfelbach *et al.*, 2005). Da

in meinen Untersuchungen jedoch nicht die verschiedenen Nuclei der Amygdala untersucht wurden, sondern nur die Amygdala als Ganzes, kann hier keine Aussage darüber getroffen werden, aus welchem Teil der Amygdala diese CRF-Erhöhung stammt. Somit kann man lediglich darauf schließen, dass in dieser Gruppe der Stresslevel für die männlichen Tiere scheinbar höher war. In Folgeuntersuchungen von Janitzky et al. konnte ein c-Fos-Anstieg in der CeA sowie in einigen Subnuclei der MeA gezeigt werden (Janitzky *et al.*, 2015). Ob diese C-Fos-Erhöhlungen ebenfalls mit einer CRF-Erhöhung in diesen Nuclei korrelieren, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Jedoch gibt es deutliche Überschneidungen mit den Ergebnissen der oben genannten Untersucher, sodass angenommen werden kann, dass die erhöhte Aktivität in diesen Nuclei mit einer erhöhten CRF-Expression einhergeht.

Ein weiterer Unterschied ließ sich im PVN darstellen. In diesem Fall war die CRF-Expression bei männlichen Tieren höher als bei weiblichen. Dies zeigte sich allerdings nur bei GAPDH als Marker, nicht jedoch bei  $\beta$ -actin. Unter basalen Bedingungen wird im PVN Glutamat ausgeschüttet. Für CRF konnte im PVN ein fördernder Effekt für die glutamaterge Wirkung gezeigt werden und die Antwort der HPAA wurde verstärkt (Dabrowska *et al.*, 2013).

Dass in meinen Untersuchungen CRF bei männlichen WT-Tieren nach TMT-Exposition im PVN erhöht ist, zeigt deutlich, dass bei den männlichen Tieren der Stress größer war als bei den weiblichen. Dies spiegelt sich bei den Kortikosteronwerten nur in Bezug auf die WT-Tiere im Allgemeinen wider. Im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Tieren zeigen männliche Tiere eine geringere Kortikosteronkonzentration im Serum. Das konnten auch andere Gruppen so darstellen (Kitay, 1961; Critchlow *et al.*, 1963; Luine *et al.*, 1996; Weinstock *et al.*, 1998; Luine, 2002; Viau *et al.*, 2005; Aisa *et al.*, 2008; Iwasaki-Sekino *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass dieser höhere basale Kortikosteronwert von der Reife der Ovarien und somit vom Östrogengehalt abhängt. Bei Tieren, denen die Ovarien entnommen wurden und bei präpubertären Tieren konnte kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren dargestellt werden. Wurde allerdings den ovariectomierten Tieren und den männlichen Tieren Östrogen i.v. appliziert, so kam es zu einem Anstieg des basalen Kortikosteronwertes (Cohen and Yehuda, 2011).

Wie oben bereits angeführt ist bei männlichen Tieren die CRF-Konzentration deshalb erhöht, weil die Sensitivität der Neurone gegenüber CRF geringer ist. Da für CRF-Neurone im PVN eine zusätzliche Expression von verschiedenen Neuropeptiden gezeigt werden konnte (Dabrowska *et al.*, 2013) kann dies möglicherweise einen dämpfenden Effekt auf die Aktivierung der HPAA bei männlichen Tieren haben. Ein weiterer Aspekt ist, dass in einigen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Stärke der HPAA von der gonadalen Funktion abhängt (Viau and Meaney, 1991; Handa *et al.*, 1994; Viau *et al.*, 2003). Bei männlichen Ratten konnte gezeigt werden, dass Testosteron die Freisetzung

von ACTH und Glukokorticoiden hemmt. Wurde Testosteron in den PVN und medialen Ncl. preopticus appliziert, so konnte die HPA-Antwort inhibiert werden (Lund *et al.*, 2006; Williamson *et al.*, 2010). Dabei konnte vor allem im BNST eine höhere Dichte an Androgen-Rezeptoren dargestellt werden (Simerly, 1993; Shughrue *et al.*, 1997). Gerade bei männlichen Tieren konnte gezeigt werden, dass der BNST eine größere Anzahl von Zellen aufweist und eine höhere Projektionsdichte hat als bei weiblichen Tieren (de Vries, G. J., 2008). Viau konnte zeigen, dass die Antwort des PVN auf Stress in Abhängigkeit vom Testosteronlevel variiert (Viau *et al.*, 2003). Es scheint auch einen inversen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Androgenrezeptoren im BNST und der Höhe der HPA-Antwort zu geben (Bingham *et al.*, 2011). Die PVN-Neurone unterliegen einer starken GABAergen Regulierung aus dem BNST (Ziegler and Herman, 2002b; Polston *et al.*, 2004). Der BNST seinerseits erhält einen starken inhibitorischen Input von der Amygdala aus GABAergen Neuronen der MeA und CeA (Veinante and Freund-Mercier, 1998; Day *et al.*, 1999; Herman *et al.*, 2004). Ein Verlust dieses GABAergen Tonus führt zu einer verstärkten Reaktion auf akuten Stress (Dent *et al.*, 2007). Diese GABA-Synthese wiederum scheint auffällig sensibel gegenüber der zirkulierenden Testosteronkonzentration (Grattan and Selmanson, 1993). Wenn diese Erkenntnisse auf den Menschen übertragbar sind, kann das möglicherweise erklären warum Frauen anfälliger für psychische Erkrankungen wie PTSD und Depression sind als Männer. Möglicherweise könnte so der Androgenrezeptor im BNST ein therapeutisches Ziel in der Behandlung dieser Krankheiten sein. Interessant wäre die Untersuchung von betroffenen Männern auf den Testosterongehalt und ob dieser möglicherweise geringer ist als bei nicht erkrankten Männern.

Wie bereits in der Diskussion um CRF gezeigt, hat der BNST einen hemmenden Einfluss auf den PVN. CRF verstärkt hier sogar die GABAerge Wirkung. Wir konnten in unseren Untersuchungen zeigen, dass bei TMT-exponierten männlichen Tieren die CRF-Expression im BNST deutlich erhöht ist. Erwartungsgemäß zeigten auch meine Daten, dass bei männlichen Tieren die CRF-Expression im PVN niedriger ist durch die hemmende Wirkung des BNST. Konsekutiv wäre zu erwarten, dass der Kortikosteronwert bei männlichen Tieren niedriger ist als bei weiblichen Tieren, da der PVN weniger CRF ausschüttet und entsprechend weniger ACTH die Ausschüttung von Kortikosteron stimuliert. Genau das konnte in meinen Ergebnissen gezeigt werden.

Dass Kortikosteron eine dosisabhängige Wirkung auf das Lernverhalten zeigt, konnte in Untersuchungen gezeigt werden (Roozendaal, 2003). In verschiedenen Studien wurde demonstriert, dass systemisch applizierte Glukokorticoide, die direkt nach einer Lernaufgabe Mäusen injiziert wurden, zu einer Verbesserung der Lernleistung führte (Flood *et al.*, 1978; Sandi and Rose, 1994; Roozendaal *et al.*, 1999; Roozendaal *et al.*, 2001). So konnte gezeigt werden, dass Glukokorticoide die Gedächtnisbildung stärken können und dabei nicht nur die Konzentration der Glukokorticoide einen

Einfluss auf das Lernverhalten hat, sondern auch in welcher Lernphase diese appliziert wurden. Wurden den Mäusen unmittelbar nach der Aufgabe die Glukokorticoide verabreicht, so zeigte sich ein positiver Effekt auf die Konsolidierung. Wurden die Glukokorticoide jedoch erst einige Zeit später appliziert, so konnte kein Effekt mehr nachgewiesen werden (Roosendaal *et al.*, 2001). Wichmann konnte zudem darstellen, dass Glukokorticoide nur auf solche Gedächtnisinhalte positiv verstärkend wirken, die eine emotionale Komponente beinhalten. Es wird angenommen, dass die Aktivierung des Glukokorticoide-Rezeptors mit dem Arousal-System im Ncl. accumbens interagiert und so die Konsolidierung von emotional bewegenden Erfahrungen verstärkt (Wichmann *et al.*, 2012).

In meinen Ergebnissen zeigen sich zwei Unterschiede besonders eindrücklich, nämlich der signifikant verringerte Gehalt an Kortikosteron bei GAD67 sowie bei männlichen Tieren. Einen Einfluss auf das Lernverhalten scheint dies jedoch zumindest im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Tieren nicht zu haben, da hier kein Unterschied in den WME gezeigt werden konnte. Nur im Vergleich zwischen den Genotypen war ein Unterschied in den WME feststellbar. Die GAD67-Tiere machten deutlich mehr Fehler, jedoch auch unter Exposition mit der Kontrollsubstanz. Interessanterweise haben aber gerade die GAD67-Tiere unter TMT-Exposition den niedrigsten Kortikosteronlevel.

In meinen Versuchen wurden die Proben zur Kortikosteronbestimmung im Schnitt 70min nach TMT-Exposition gleichzeitig mit der Dekapitation entnommen. Wie Roseboom *et al.* (2007) zeigen konnten, gibt es einen Kortikosteronpeak 15-30 min nach dem stressauslösenden Ereignis, nach 60 min sind die Werte immer noch erhöht, jedoch nicht mehr signifikant im Vergleich zum Ausgangswert. Nach 120 min war der Ausgangswert wieder erreicht (Roseboom *et al.*, 2007). Möglicherweise liegen die von uns ermittelten Werte somit im absteigenden Teil der Kurve. In weiterführenden Untersuchungen sollte dies durch eine Verkürzung der Zeit zwischen TMT-Exposition und Blutentnahme geklärt werden. In meinem Versuchsablauf war eine frühere Blutentnahme nicht möglich.

Im ventralen Bulbus olfactorius (vBO) zeigen sich sowohl für die c-Fos- als auch für die CRF-Expression signifikante Unterschiede. In der c-Fos-Expression zeigt sich bei männlichen Tieren ein Unterschied zwischen transgenen und WT-Tieren nach DEP-Exposition als auch bei den GAD67 Tieren ein Unterschied zwischen DEP- und TMT-Exposition. Diese Unterschiede lassen sich bei CRF zumindest als Tendenzen darstellen. Ein signifikanter Unterschied in der CRF-Expression im vBO zeigt sich jedoch in Bezug auf den Genotyp bei DEP-exponierten weiblichen Tieren. Ein weiterer Unterschied zeigt sich im Geschlecht bei DEP-exponierten WT-Tieren als auch bei den TMT-exponierten. Das olfaktorische System bei Nagetieren besteht aus dem olfaktorischen Hauptsystem (OHS), aus dem akzessorischen olfaktorischen System (AOS), dem septalen Organ von Masera, dem Grueneberg Ganglion sowie dem trigeminalen System (Takahashi, 2014). Das OHS vermittelt

Geruchsinformationen über den Ort von Futter oder die Richtung aus der ein möglicher Feind kommt. Das AOS vermittelt angeborene Antworten auf chemische Duftstoffe oder Pheromone (Meredith, 1991; Breer *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass TMT zu einer starken Aktivierung der c-Fos-Expression im OHS führt (Illig and Haberly, 2003; Day, H. E. W. *et al.*, 2004b; Staples *et al.*, 2008). Zudem führte in Untersuchungen eine Ablation oder Blockierung des OHS mittels Zinksulfat zu einer deutlichen Reduktion des freezing-Verhaltens gegenüber TMT (Galliot *et al.*, 2012; Ayers *et al.*, 2013). Daraus kann man schließen, dass das OHS notwendig ist für die Verarbeitung und Induktion der Reaktion auf TMT. Bei der Maus im Speziellen konnte gezeigt werden, dass besonders das Gruneberg-Ganglion an der Nasenspitze für die Detektion von TMT sowie von arteigenen Pheromonen verantwortlich ist. Diese Pheromone werden ausgesendet, wenn ein Tier getötet, verletzt oder bedroht wird (Brechtbühl *et al.*, 2008; Brechtbühl *et al.*, 2013). Das Gruneberg-Ganglion hat Projektionen zum OHS und löst auf diese Weise die Kaskade aus.

Möglicherweise wurde allein durch den Reiz der Box bei den Tieren schon eine Alarmsituation erzeugt, was sie zum Ausschütten solcher Pheromone veranlasste. Die Aktivierung aus Pheromonen könnte die bereits erhöhte Expression bei DEP-exponierten Tieren erklären und so eine Erklärung dafür liefern, dass nur wenige Unterschiede zwischen den Tierstämmen und verschiedenen Expositionen gefunden werden konnten.

Insgesamt lässt sich eine Veränderung des räumlichen Lernens unter TMT-Exposition unabhängig vom Genotyp zeigen. Zudem deuten die Ergebnisse auf eine genotyp- und geschlechtsabhängige Freisetzung von CRF in stress-assoziierten Hirnregionen hin und lassen darauf schließen, dass der BNST ein wichtiger Nucleus ist, in dem Veränderungen der GABAergen Transmission das CRF-System modulieren können und so Effekte auf die endokrine und Verhaltensantwort, vor allem bei männlichen GAD67-Tieren haben.

Zusammengenommen konnte gezeigt werden, dass es zu einer starken Aktivierung des BNST bei TMT-Exposition kommt. Die GABAergen Verbindungen zwischen Amygdala, BNST und PVN zusammen mit wichtigen Efferenzen des CRF lässt darauf schließen, dass die deutlich erhöhte CRF-mRNA im BNST bei männlichen GAD67-Tieren einen relevanten Geschlechtsunterschied im BNST darstellt und somit für deren Verhaltensantwort gegenüber Stressoren mitverantwortlich ist. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig, um die komplexen Effekte von Stress bei GAD67-Mäusen im Hinblick auf Geschlechterunterschiede bei GABA- und CRF-regulierten Mechanismen im BNST zu verstehen und so die neuronale Basis von geschlechtsabhängigen Unterschieden in Bezug auf die Empfänglichkeit für stress-assoziierte Angststörungen zu klären.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit ging der Frage nach, ob sich GAD67-GFP-Mäuse und C57BL/6-Mäuse im Lernverhalten unterscheiden und in welcher Art sich die reduzierte GABA-Synthese bei GAD67-Mäusen auf die Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse auswirkt. Dazu wurden die Tiere über fünf Tage im Radial-Arm-Labyrinth trainiert und am anschließenden Versuchstag vor dem Labyrinth entweder DEP als Kontrollsubstanz oder TMT als Stressor ausgesetzt. Anschließend wurden sechs Hirnareale, die mit der Verarbeitung von TMT-induziertem Stress verbunden sind, entnommen und auf Unterschiede in der c-Fos und CRF-mRNA-Expression im Vergleich zu den housekeeper-Genen GAPDH und  $\beta$ -actin untersucht. Weiterhin wurde den Tieren Stammb Blut zur Bestimmung des Serum-Kortikosteronwertes entnommen.

Es wurde gezeigt, dass es im Lernverhalten keine Unterschiede zwischen den GAD67 und WT-Mäusen gibt, allenfalls lassen sich feine Unterschiede am Anfang zeigen. Bezüglich des Kortikosterongehaltes im Serum zeigte sich bei GAD67-Tieren jeweils ein geringerer Wert als bei den WT-Tieren.

Bei der mRNA-Expression von c-Fos und CRF in den Hirnarealen zeigten sich einige Unterschiede im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Tieren.

Die CRF-mRNA-Expression im BNST zeigte sich eine deutliche Steigerung bei männlichen GAD67-Tieren sowohl unter DEP-Exposition im Vergleich zu den weiblichen Tieren als auch zu den männlichen WT-Tieren. Im Hippocampus zeigte sich eine stärkere CRF-Expression bei männlichen TMT-exponierten WT-Tieren im Vergleich zu den weiblichen Tieren.

Eine Steigerung der CRF-Expression zeigte sich zudem im LC und vBO. In beiden Untersuchungen hatten männliche DEP-exponierte WT-Tiere eine höhere CRF-Expression als die dazugehörigen weiblichen Tiere und die weiblichen GAD-67-Tiere hatten unter DEP-Exposition eine höhere CRF-Expression als die dazugehörigen weiblichen WT-Tiere.

Deutliche Unterschiede zeigten sich auch in der Expression von c-Fos im BNST. Die höchste Expression zeigte sich bei männlichen DEP-exponierten WT-Tieren im Vergleich zu den männlichen GAD67-Tieren. Unter TMT-Exposition zeigte sich bei männlichen GAD67-Tieren ebenfalls eine höhere c-Fos-Expression im BNST als bei den DEP-exponierten männlichen Kontrolltieren. Weitere Unterschiede ließen sich im LC und vBO zeigen. In der Amygdala zeigte sich unter TMT-Exposition eine höhere c-Fos-Expression bei weiblichen GAD67-Tieren im Vergleich zu den DEP-exponierten Tieren. Ein weiterer Unterschied zeigte sich hier auch im Vergleich zwischen den weiblichen DEP-exponierten Tieren im Vergleich der Genotypen mit höherer c-Fos-Expression bei den WT-Tieren.

In der Kortikosteronkonzentration im Serum zeigte sich bei GAD67-Tieren im Allgemeinen ein niedrigerer Wert als bei den WT-Tieren. Unter TMT-Exposition zeigte sich eine deutliche niedrigere Konzentration bei den GAD67-Tieren sowohl im Vergleich zu den WT-Tieren als auch im Vergleich zu den GAD67-Tieren nach DEP-Exposition. Im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Tieren zeigte sich bei weiblichen Tieren nach TMT-Exposition eine deutlich höhere Kortikosteronkonzentration als bei den männlichen Tieren.

Insgesamt lässt sich somit zeigen, dass die GAD67-Tiere für Verhaltensversuche geeignet sind, da sie sich diesbezüglich nur gering von den WT-Tieren unterscheiden. Jedoch kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse angenommen werden, dass die geringere GABA-Synthese einen Einfluss auf die Verarbeitung von Stress und auf die HPAA hat. In weiteren Untersuchungen sollte überprüft werden, ob frühere Zeitpunkte für die Bestimmung der CRF- und c-Fos-mRNA-Expression eindeutigere Ergebnisse bringen. Des Weiteren sind noch Erkenntnisse nötig, um das Zusammenspiel von GABA, CRF und der HPAA zu verstehen und auch weitere Zusammenhänge zwischen den geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Anfälligkeit für stressbedingte Angststörungen verstehen und erklären zu können.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adolphs, R. (2013), "The biology of fear", *Current biology CB*, Vol. 23 No. 2, pp. R79-93.
- Aguilar-Valles, A., Sanchez, E., Gortari, P.d., Balderas, I., Ramirez-Amaya, V., Bermudez-Rattoni, F. and Joseph-Bravo, P. (2005), "Analysis of the Stress Response in Rats Trained in the Water-Maze: Differential Expression of Corticotropin-Releasing Hormone, CRH-R1, Glucocorticoid Receptors and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Limbic Regions", *Neuroendocrinology*, Vol. 82 No. 5-6, pp. 306–319.
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J. and Ramírez, M.J. (2008), "Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats", *Neuroscience*, Vol. 154 No. 4, pp. 1218–1226.
- Amaral, D.G. (2002), "The Primate Amygdala and the Neurobiology of Social Behavior: Implications for Understanding Social Anxiety", *Society of Biological Psychiatry*, No. 51, pp. 11–17.
- Ameyar, M., Wisniewska, M. and Weitzman, J.B. (2003), "A role for AP-1 in apoptosis: the case for and against", *Biochimie*, Vol. 85 No. 8, pp. 747–752.
- Amunts, K., Bechmann, I., Nitsch, R., Paulsen, F., Schmitt, O., Wree, A. and Zilles, K. (2010), "Nervensystem und Sinnesorgane", in Zilles, K. and Tillmann, B.N. (Eds.), *Anatomie, Springer-Lehrbuch*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 599–764.
- Angel, P. and Karin, M. (1991), "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, Vol. 1072 No. 2-3, pp. 129–157.
- Angeles-Castellanos, M., Mendoza, J. and Escobar, C. (2007), "Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats", *Neuroscience*, Vol. 144 No. 1, pp. 344–355.
- Apfelbach, R., Blanchard, C.D., Blanchard, R.J., Hayes, R.A. and McGregor, I.S. (2005), "The effects of predator odors in mammalian prey species: a review of field and laboratory studies", *Neuroscience and biobehavioral reviews*, Vol. 29 No. 8, pp. 1123–1144.
- Asok, A., Ayers, L.W., Awoyemi, B., Schulkin, J. and Rosen, J.B. (2013), "Immediate early gene and neuropeptide expression following exposure to the predator odor 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT)", *Behavioural Brain Research*, Vol. 248, pp. 85–93.
- Ayers, L.W., Asok, A., Heyward, F.D. and Rosen, J.B. (2013), "Freezing to the predator odor 2,4,5-dihydro 2,5 trimethylthiazoline (TMT) is disrupted by olfactory bulb removal but not trigeminal deafferentation", *Behavioural Brain Research*, Vol. 253, pp. 54–59.
- Baddeley, A. (2003), "Working memory: looking back and looking forward", *Nature reviews. Neuroscience*, Vol. 4 No. 10, pp. 829–839.
- Bahar, A., Dorfman, N. and Dudai, Y. (2004), "Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation", *European Journal of Neuroscience*, Vol. 19 No. 4, pp. 1115–1118.
- Bale, T.L. (2005), "Sensitivity to stress: dysregulation of CRF pathways and disease development", *Hormones and behavior*, Vol. 48 No. 1, pp. 1–10.
- Bale, T.L., Contarino, A., Smith, G.W., Chan, R., Gold, L.H., Sawchenko, P.E., Koob, G.F., Vale, W.W. and Lee, K.F. (2000), "Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display



- anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress”, *Nature genetics*, Vol. 24 No. 4, pp. 410–414.
- Bale, T.L., Picetti, R., Contarino, A., Koob, G.F., Vale, W.W. and Lee, K.F. (2002), “Mice deficient for both corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior”, *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 22 No. 1, pp. 193–199.
- Bangasser, D.A., Curtis, A., Reyes, B A S, Bethea, T.T., Parastatidis, I., Ischiropoulos, H., Van Bockstaele, E J and Valentino, R.J. (2010), “Sex differences in corticotropin-releasing factor receptor signaling and trafficking: potential role in female vulnerability to stress-related psychopathology”, *Molecular psychiatry*, Vol. 15 No. 9, pp. 877, 896-904.
- Bangasser, D.A. and Valentino, R.J. (2014), “Sex differences in stress-related psychiatric disorders: neurobiological perspectives”, *Frontiers in neuroendocrinology*, Vol. 35 No. 3, pp. 303–319.
- Belzung, C., El Hage, W., Moindrot, N. and Griebel, G. (2001), “Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice”, *Neuropharmacology*, Vol. 41 No. 3, pp. 400–408.
- Bensalem, J., Servant, L., Alfos, S., Gaudout, D., Layé, S., Pallet, V. and Lafenetre, P. (2016), “Dietary Polyphenol Supplementation Prevents Alterations of Spatial Navigation in Middle-Aged Mice”, *Frontiers in behavioral neuroscience*, Vol. 10, p. 9.
- Beylin, A.V. and Shors, T.J. (1998), “Stress enhances excitatory trace eyeblink conditioning and opposes acquisition of inhibitory conditioning”, *Behavioral neuroscience*, Vol. 112 No. 6, pp. 1327–1338.
- Bierbaum, H. (2003), *Die Funktion des Transkriptionsfaktors AP-1 in der Apoptoseregulation*.
- Bingham, B., Myung, C., Innala, L., Gray, M., Anonuevo, A. and Viau, V. (2011), “Androgen receptors in the posterior bed nucleus of the stria terminalis increase neuropeptide expression and the stress-induced activation of the paraventricular nucleus of the hypothalamus”, *Neuropsychopharmacology official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, Vol. 36 No. 7, pp. 1433–1443.
- Blanchard, C.D., Markham, C., Yang, M., Hubbard, D., Madarang, E. and Blanchard, R.J. (2003), “Failure to produce conditioning with low-dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli”, *Behavioral neuroscience*, Vol. 117 No. 2, pp. 360–368.
- Blizard, D.A., Weinheimer, V.K., Klein, L.C., Petrill, S.A., Cohen, R. and McClearn, G.E. (2006), “‘Return to home cage’ as a reward for maze learning in young and old genetically heterogeneous mice”, *Comparative medicine*, Vol. 56 No. 3, pp. 196–201.
- Bohler, H.C., Zoeller, R.T., King, J.C., Rubin, B.S., Weber, R. and Merriam, G.R. (1990), “Corticotropin releasing hormone mRNA is elevated on the afternoon of proestrus in the parvocellular paraventricular nuclei of the female rat”, *Brain research. Molecular brain research*, Vol. 8 No. 3, pp. 259–262.
- Brechbühl, J., Klaey, M. and Broillet, M.C. (2008), “Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice”, *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 321 No. 5892, pp. 1092–1095.
- Brechbühl, J., Moine, F., Klaey, M., Nenniger-Tosato, M., Hurni, N., Sporkert, F., Giroud, C. and Broillet, M.C. (2013), “Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predator scents”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 110 No. 12, pp. 4762–4767.
- Breer, H., Fleischer, J. and Strotmann, J. (2006), “The sense of smell: multiple olfactory subsystems”, *Cellular and molecular life sciences CMLS*, Vol. 63 No. 13, pp. 1465–1475.

- Bressler, A., Blizard, D. and Andrews, A. (2010), "Low-stress route learning using the Lashley III maze in mice", *Journal of visualized experiments JoVE*, No. 39.
- Burgess, L.H. and Handa, R.J. (1992), "Chronic estrogen-induced alterations in adrenocorticotropin and corticosterone secretion, and glucocorticoid receptor-mediated functions in female rats", *Endocrinology*, Vol. 131 No. 3, pp. 1261–1269.
- Buron, G., Hacquemand, R., Pourie, G., Lucarz, A., Jacquot, L. and Brand, G. (2007), "Comparative behavioral effects between synthetic 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) and the odor of natural fox (*Vulpes vulpes*) feces in mice", *Behavioral neuroscience*, Vol. 121 No. 5, pp. 1063–1072.
- Busch-Sørensen, M., Sheikh, S.P., O'Hare, M., Tortora, O., Schwartz, T.W. and Gammeltoft, S. (1989), "Regional distribution of neuropeptide Y and its receptor in the porcine central nervous system", *Journal of neurochemistry*, Vol. 52 No. 5, pp. 1545–1552.
- Castro, F. de (2009), "Wiring Olfaction: The Cellular and Molecular Mechanisms that Guide the Development of Synaptic Connections from the Nose to the Cortex", *Frontiers in neuroscience*, Vol. 3, p. 52.
- Champagne, D., Beaulieu J. and Drolet, G. (1998), "CRFergic Innervation Of the Paraventricular Nucleus of the Rat Hypothalamus: A Tract-Tracing Study", *Journal of Neuroendocrinology*, No. 10, pp. 119–131.
- Chen, Y., Andres, A.L., Frotscher, M. and Baram, T.Z. (2012), "Tuning synaptic transmission in the hippocampus by stress: the CRH system", *Frontiers in cellular neuroscience*, Vol. 6, p. 13.
- Cohen, H. and Yehuda, R. (2011), "Gender differences in animal models of posttraumatic stress disorder", *Disease markers*, Vol. 30 No. 2-3, pp. 141–150.
- Cole, M.R. and Chappell-Stephenson, R. (2003), "Exploring the limits of spatial memory in rats, using very large mazes", *Learning & behavior*, Vol. 31 No. 4, pp. 349–368.
- Critchlow, V., Liebelt, R.A., Bar-Sela, M., Mountcastle, W. and Lipscomb, H.S. (1963), "Sex difference in resting pituitary-adrenal function in the rat", *The American journal of physiology*, Vol. 205 No. 5, pp. 807–815.
- Crusio, W.E. and Schwegler, H. (2005), "Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice", *Behavioral and brain functions BBF*, Vol. 1 No. 1, p. 3.
- Cummings, S., Elde, R., Ells, J. and Lindall, A. (1983), "Corticotropin-releasing factor immunoreactivity is widely distributed within the central nervous system of the rat: an immunohistochemical study", *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 3 No. 7, pp. 1355–1368.
- Dabrowska, J., Hazra, R., Guo, J., Dewitt, S. and Rainnie, D.G. (2013), "Central CRF neurons are not created equal: phenotypic differences in CRF-containing neurons of the rat paraventricular hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis", *Frontiers in neuroscience*, Vol. 7, p. 156.
- Dahm, R., Kiebler, M. and Macchi, P. (2007), "RNA localisation in the nervous system", *Seminars in cell & developmental biology*, Vol. 18 No. 2, pp. 216–223.
- Davis, M., Walker, D.L. and Lee, Y. (1997), "Amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: differential roles in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex", *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, Vol. 352 No. 1362, pp. 1675–1687.
- Day, H.E., Curran, E.J., Watson, S.J. and Akil, H. (1999), "Distinct neurochemical populations in the rat central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis: evidence for their

- selective activation by interleukin-1beta", *The Journal of comparative neurology*, Vol. 413 No. 1, pp. 113–128.
- Day, H. E. W., Masini, C.V. and Campeau, S. (2004a), "The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics", *Brain research*, Vol. 1025 No. 1-2, pp. 139–151.
- Day, H. E. W., Masini, C.V. and Campeau, S. (2004b), "The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics", *Brain research*, Vol. 1025 No. 1-2, pp. 139–151.
- de Kloet, E. R., Oitzl, M.S. and Joëls, M. (1999), "Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys?", *Trends in Neurosciences*, Vol. 22 No. 10, pp. 422–426.
- de Vries, G. J. (2008), "Sex differences in vasopressin and oxytocin innervation of the brain", *Progress in brain research*, Vol. 170, pp. 17–27.
- Dent, G., Choi, D.C., Herman, J.P. and Levine, S. (2007), "GABAergic circuits and the stress hypo-responsive period in the rat: ontogeny of glutamic acid decarboxylase (GAD) 67 mRNA expression in limbic-hypothalamic stress pathways", *Brain research*, Vol. 1138, pp. 1–9.
- Desbonnet, L., Garrett, L., Daly, E., McDermott, K.W. and Dinan, T.G. (2008), "Sexually dimorphic effects of maternal separation stress on corticotrophin-releasing factor and vasopressin systems in the adult rat brain", *International journal of developmental neuroscience the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, Vol. 26 No. 3-4, pp. 259–268.
- Diamond, D.M., Campbell, A.M., Park, C.R., Halonen, J. and Zoladz, P.R. (2007), "The temporal dynamics model of emotional memory processing: a synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia, flashbulb and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson law", *Neural plasticity*, Vol. 2007, p. 60803.
- Dias Soares, D., Fernandez, F., Aguerre, S., Foury, A., Mormède, P. and Chaouloff, F. (2003), "Fox odour affects corticosterone release but not hippocampal serotonin reuptake and open field behaviour in rats", *Brain research*, Vol. 961 No. 1, pp. 166–170.
- Dielenberg, R.A., Hunt, G.E. and McGregor, I.S. (2001), "'When a rat smells a cat': the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor", *Neuroscience*, Vol. 104 No. 4, pp. 1085–1097.
- Duarte-Guterman, P., Yagi, S., Chow, C. and Galea, L. A. M. (2015), "Hippocampal learning, memory, and neurogenesis: Effects of sex and estrogens across the lifespan in adults", *Hormones and behavior*, Vol. 74, pp. 37–52.
- Dubreuil, D., Tixier, C., Dutrieux, G. and Edeline, J. (2003), "Does the radial arm maze necessarily test spatial memory?", *Neurobiology of Learning and Memory*, Vol. 79 No. 1, pp. 109–117.
- Dudai, Y. (2004), "The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram?", *Annual review of psychology*, Vol. 55, pp. 51–86.
- Endres, T., Apfelbach, R. and Fendt, M. (2005), "Behavioral changes induced in rats by exposure to trimethylthiazoline, a component of fox odor", *Behavioral neuroscience*, Vol. 119 No. 4, pp. 1004–1010.
- Endres, T. and Fendt, M. (2007), "Conditioned behavioral responses to a context paired with the predator odor trimethylthiazoline", *Behavioral neuroscience*, Vol. 121 No. 3, pp. 594–601.
- Endres, T. and Fendt, M. (2008), "Inactivation of the lateral septum blocks fox odor-induced fear behavior", *Behaviour*, Vol. 19 No. 6, pp. 667–670.

- Endres, T. and Fendt, M. (2009), "Aversion- vs fear-inducing properties of 2,4,5-trimethyl-3-thiazoline, a component of fox odor, in comparison with those of butyric acid", *The Journal of experimental biology*, Vol. 212 No. Pt 15, pp. 2324–2327.
- Erdö, S.L. and Wolff, J.R. (1990), "gamma-Aminobutyric acid outside the mammalian brain", *Journal of neurochemistry*, Vol. 54 No. 2, pp. 363–372.
- Erlander, M.G., Tillakaratne, N.J., Feldblum, S., Patel, N. and Tobin, A.J. (1991), "Two genes encode distinct glutamate decarboxylases", *Neuron*, Vol. 7 No. 1, pp. 91–100.
- Fanselow, M.S. and Dong, H. (2010), "Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures?", *Neuron*, Vol. 65 No. 1, pp. 7–19.
- Faraji, J., Metz, G.A. and Sutherland, R.J. (2011), "Stress after hippocampal stroke enhances spatial performance in rats", *Physiology & behavior*, Vol. 102 No. 3-4, pp. 389–399.
- Feldhaus, L.M. and Liedtke, A.J. (1998), "mRNA Expression of Glycoytic Enzymes and Glucose Transporter Proteins in Ischemic Myocardium With and Without Reperfusion", *Mol Cell Cardiol*, No. 30, pp. 2475–2485.
- Fendt, M., Endres, T. and Apfelbach, R. (2003), "Temporary Inactivation of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis But Not of the Amygdala Blocks Freezing Induced by Trimethylthiazoline, a Component of Fox Feces", *The Journal of Neuroscience*, Vol. 23 No. 1, pp. 23–28.
- Fendt, M., Endres, T., Lowry, C.A., Apfelbach, R. and McGregor, I.S. (2005), "TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing", *Neuroscience and biobehavioral reviews*, Vol. 29 No. 8, pp. 1145–1156.
- Ferry, B., Roozendaal, B. and McGaugh, J.L. (1999), "Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala", *Biological Psychiatry*, Vol. 46 No. 9, pp. 1140–1152.
- Figueiredo, H.F., Bodie, B.L., Tauchi, M., Dolgas, C.M. and Herman, J.P. (2003), "Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis", *Endocrinology*, Vol. 144 No. 12, pp. 5249–5258.
- Fitzpatrick, C.J., Knox, D. and Liberzon, I. (2011), "Inactivation of the prelimbic cortex enhances freezing induced by trimethylthiazoline, a component of fox feces", *Behavioural Brain Research*, Vol. 221 No. 1, pp. 320–323.
- Flandreau, E.I., Ressler, K.J., Owens, M.J. and Nemeroff, C.B. (2012), "Chronic overexpression of corticotropin-releasing factor from the central amygdala produces HPA axis hyperactivity and behavioral anxiety associated with gene-expression changes in the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus", *Psychoneuroendocrinology*, Vol. 37 No. 1, pp. 27–38.
- Flood, J.F., Vidal, D., Bennett, E.L., Orme, A.E., Vasquez, S. and Jarvik, M.E. (1978), "Memory facilitating and anti-amnesic effects of corticosteroids", *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, Vol. 8 No. 1, pp. 81–87.
- Frederiksen, S.O., Ekman, R., Gottfries, C.G., Widerlöv, E. and Jonsson, S. (1991), "Reduced concentrations of galanin, arginine vasopressin, neuropeptide Y and peptide YY in the temporal cortex but not in the hypothalamus of brains from schizophrenics", *Acta psychiatrica Scandinavica*, Vol. 83 No. 4, pp. 273–277.
- Galliot, E., Laurent, L., Hacquemand, R., Pourié, G. and Millot, J.L. (2012), "Fear-like behavioral responses in mice in different odorant environments: Trigeminal versus olfactory mediation under low doses", *Behavioural processes*, Vol. 90 No. 2, pp. 161–166.

- Gold, P.W. and Chrousos, G.P. (2002), "Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states", *Molecular psychiatry*, No. 7, pp. 254–275.
- Gold, P.W., Wong, M.L., Chrousos, G.P. and Licinio, J. (1996), "Stress system abnormalities in melancholic and atypical depression: molecular, pathophysiological, and therapeutic implications", *Molecular psychiatry*, Vol. 1 No. 4, pp. 257–264.
- Grattan, D.R. and Selmanoff, M. (1993), "Regional variation in gamma-aminobutyric acid turnover: effect of castration on gamma-aminobutyric acid turnover in microdissected brain regions of the male rat", *Journal of neurochemistry*, Vol. 60 No. 6, pp. 2254–2264.
- Graven, K.K., Troxler, R.F., Kornfeld, H., Panchenko, M.V. and Farber, H.W. (1994), "Regulation of Endothelial Cell Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Expression by Hypoxia", *The Journal of Biological Chemistry*, No. 39, pp. 24446–24453.
- Greenberg, M.E. and Ziff, E.B. (1984), "Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the c-fos proto-oncogene", *Nature*, Vol. 311 No. 5985, pp. 433–438.
- Gross, C.T. and Canteras, N.S. (2012), "The many paths to fear", *Nature reviews. Neuroscience*, Vol. 13 No. 9, pp. 651–658.
- Habib, K.E., Weld, K.P., Rice, K.C., Pushkas, J., Champoux, M., Listwak, S., Webster, E.L., Atkinson, A.J., Schulkin, J., Contoreggi, C., Chrousos, G.P., McCann, S.M., Suomi, S.J., Higley, J.D. and Gold, P.W. (2000), "Oral administration of a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 97 No. 11, pp. 6079–6084.
- Hacquemand, R., Jacquot, L. and Brand, G. (2012), "Postnatal exposure to predator odor (TMT) enhances spatial learning in mice adulthood", *Behavioural Brain Research*, Vol. 229 No. 1, pp. 113–117.
- Handa, R.J., Nunley, K.M., Lorens, S.A., Louie, J.P., McGivern, R.F. and Bollnow, M.R. (1994), "Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors", *Physiology & behavior*, Vol. 55 No. 1, pp. 117–124.
- Hebb, A. (2002), "Odor-Induced Variation in Anxiety-Like Behavior in Mice is Associated with Discrete and Differential Effects on Mesocorticolimbic Cholecystokinin mRNA Expression", *Neuropsychopharmacology*, Vol. 27 No. 5, pp. 744–755.
- Hebb, A. L. O., Zacharko, R.M., Gauthier, M. and Drolet, G. (2003), "Exposure of mice to a predator odor increases acoustic startle but does not disrupt the rewarding properties of VTA intracranial self-stimulation", *Brain research*, Vol. 982 No. 2, pp. 195–210.
- Hebb, A. L. O., Zacharko, R.M., Gauthier, M., Trudel, F., Laforest, S. and Drolet, G. (2004), "Brief exposure to predator odor and resultant anxiety enhances mesocorticolimbic activity and enkephalin expression in CD-1 mice", *The European journal of neuroscience*, Vol. 20 No. 9, pp. 2415–2429.
- Heinrichs, S.C., Pich, E.M., Miczek, K.A., Britton, K.T. and Koob, G.F. (1992), "Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action", *Brain research*, Vol. 581 No. 2, pp. 190–197.
- Herman, J.P. and Cullinan, W.E. (1997), "Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis", *Trends in Neurosciences*, Vol. 20 No. 2, pp. 78–84.

- Herman, J.P., Mueller, N.K. and Figueiredo, H.F. (2004), "Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration", *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1018, pp. 35–45.
- Herrera, D., Robertson, H. and Harold, A. (1996), "Activation of c-fos in the brain", *Progress in Neurobiology*, Vol. 50 No. 2-3, pp. 83–107.
- Horii, Y., Nikaido, Y., Nagai, K. and Nakashima, T. (2010), "Exposure to TMT odor affects adrenal sympathetic nerve activity and behavioral consequences in rats", *Behavioural Brain Research*, Vol. 214 No. 2, pp. 317–322.
- Hsu, D.T., Chen, F., Takahashi, L.K. and Kalin, N.H. (1998), "Rapid stress-induced elevations in corticotropin-releasing hormone mRNA in rat central amygdala nucleus and hypothalamic paraventricular nucleus: An in situ hybridization analysis", *Brain research*, Vol. 788 No. 1-2, pp. 305–310.
- Illig, K.R. and Haberly, L.B. (2003), "Odor-evoked activity is spatially distributed in piriform cortex", *The Journal of comparative neurology*, Vol. 457 No. 4, pp. 361–373.
- Ito, Y., Pagano, P.J., Tornheim, K., Brecher, P. and Cohen, R.A. (1996), "Oxidative stress increases glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels in isolated rabbit aorta", *The American journal of physiology*, Vol. 270 No. 1 Pt 2, pp. H81-7.
- Iwasaki-Sekino, A., Mano-Otagiri, A., Ohata, H., Yamauchi, N. and Shibasaki, T. (2009), "Gender differences in corticotropin and corticosterone secretion and corticotropin-releasing factor mRNA expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and the central nucleus of the amygdala in response to footshock stress or psychological stress in rats", *Psychoneuroendocrinology*, Vol. 34 No. 2, pp. 226–237.
- Janitzky, K., Peine, A., Kröber, A., Yanagawa, Y., Schwegler, H. and Roskoden, T. (2014), "Increased CRF mRNA expression in the sexually dimorphic BNST of male but not female GAD67 mice and TMT predator odor stress effects upon spatial memory retrieval", *Behavioural Brain Research*, Vol. 272, pp. 141–149.
- Janitzky, K., Prellwitz, O., Schwegler, H., Yanagawa, Y. and Roskoden, T. (2015), "2,5-Dihydro-2,4,5-Trimethylthiazoline (TMT)-Induced Neuronal Activation Pattern and Behavioral Fear Response in GAD67 Mice", *Journal of Behavioral and Brain Science*, Vol. 05 No. 07, pp. 318–331.
- Janitzky, K., Schwegler, H., Kröber, A., Roskoden, T., Yanagawa, Y. and Linke, R. (2011), "Species-relevant inescapable stress differently influences memory consolidation and retrieval of mice in a spatial radial arm maze", *Behavioural Brain Research*, Vol. 219 No. 1, pp. 142–148.
- Janitzky, K., Stork, O., Lux, A., Yanagawa, Y., Schwegler, H. and Linke, R. (2009), "Behavioral effects and pattern of brain c-fos mRNA induced by 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a component of fox feces odor in GAD67-GFP knock-in C57BL/6 mice", *Behavioural Brain Research*, Vol. 202 No. 2, pp. 218–224.
- Jarrard, L.E. (1978), "Selective hippocampal lesions: differential effects on performance by rats of a spatial task with preoperative versus postoperative training", *Journal of comparative and physiological psychology*, Vol. 92 No. 6, pp. 1119–1127.
- Jarrard, L.E. (1993), "On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat", *Behavioral and neural biology*, Vol. 60 No. 1, pp. 9–26.
- Kash, T.L. and Winder, D.G. (2006), "Neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor bi-directionally modulate inhibitory synaptic transmission in the bed nucleus of the stria terminalis", *Neuropharmacology*, Vol. 51 No. 5, pp. 1013–1022.

- Kass, I., Hoke, D.E., Costa, M. G. S., Reboul, C.F., Porebski, B.T., Cowieson, N.P., Leh, H., Pennacchietti, E., McCoey, J., Kleifeld, O., Borri Voltattorni, C., Langley, D., Roome, B., Mackay, I.R., Christ, D., Perahia, D., Buckle, M., Paiardini, A., Biase, D.d. and Buckle, A.M. (2014), "Cofactor-dependent conformational heterogeneity of GAD65 and its role in autoimmunity and neurotransmitter homeostasis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 111 No. 25, pp. E2524-9.
- Kaufman, D.L., Houser, C.R. and Tobin, A.J. (1991), "Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions", *Journal of neurochemistry*, Vol. 56 No. 2, pp. 720–723.
- Kawamoto, R.M. and Caswell, A.H. (1986), "Autophosphorylation of glyceraldehydephosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes", *Biochemistry*, Vol. 25 No. 3, pp. 657–661.
- Kelly, K., Cochran, B.H., Stiles, C.D. and Leder, P. (1983), "Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor", *Cell*, Vol. 35 No. 3 Pt 2, pp. 603–610.
- Kessler, M.S., Debilly, S., Schöppenthau, S., Bielser, T., Bruns, A., Künnecke, B., Kienlin, M.v., Wettstein, J.G., Moreau, J. and Risterucci, C. (2012), "fMRI fingerprint of unconditioned fear-like behavior in rats exposed to trimethylthiazoline", *European neuropsychopharmacology the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, Vol. 22 No. 3, pp. 222–230.
- Kessler, R.C., McGonagle, K.A., Swartz, M., Blazer, D.G. and Nelson, C.B. (1993), "Sex and depression in the National Comorbidity Survey I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence", *Journal of affective disorders*, No. 29, pp. 85–96.
- Kharman-Biz, A., Gao, H., Ghiasvand, R., Zhao, C. and Zendejdel, K. (2013), "Expression of activator protein-1 (AP-1) family members in breast cancer", *BMC Cancer*, Vol. 13 No. 441, pp. 1–10.
- Kirmse, K., Kummer, M., Kovalchuk, Y., Witte, O.W., Garaschuk, O. and Holthoff, K. (2015), "GABA depolarizes immature neurons and inhibits network activity in the neonatal neocortex in vivo", *Nature communications*, Vol. 6, p. 7750.
- Kitay, J.I. (1961), "Sex differences in adrenal cortical secretion in the rat", *Endocrinology*, Vol. 68, pp. 818–824.
- Klinke, R., Bauer, C. and Silbernagl, S. (2005), *Physiologie: Zahlreiche Tabellen*, 5., komplett überarb. Aufl, Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Krettek, J.E. and Price, J.L. (1978), "Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat", *The Journal of comparative neurology*, Vol. 178 No. 2, pp. 225–254.
- Kudo, T., Uchigashima, M., Miyazaki, T., Konno, K., Yamasaki, M., Yanagawa, Y., Minami, M. and Watanabe, M. (2012), "Three types of neurochemical projection from the bed nucleus of the stria terminalis to the ventral tegmental area in adult mice", *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 32 No. 50, pp. 18035–18046.
- Laschet, J.J., Minier, F., Kurcewicz, I., Bureau, M.H., Trottier, S., Jeanneteau, F., Griffon, N., Samyn, B., van Beeumen, J., Louvel, J., Sokoloff, P. and Pumain, R. (2004), "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABAA receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition", *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 24 No. 35, pp. 7614–7622.
- Laska, M., Fendt, M., Wieser, A., Endres, T., Hernandez S., Laura T. and Apfelbach, R. (2005), "Detecting danger--or just another odorant? Olfactory sensitivity for the fox odor component 2,4,5-trimethylthiazoline in four species of mammals", *Physiology & behavior*, Vol. 84 No. 2, pp. 211–215.

- LeDoux, J. (2003), "The emotional brain, fear, and the amygdala", *Cellular and molecular neurobiology*, Vol. 23 No. 4-5, pp. 727–738.
- LeDoux, J.E. (1992), "Brain mechanisms of emotion and emotional learning", *Current Opinion in Neurobiology*, Vol. 2 No. 2, pp. 191–197.
- LeDoux, J.E. (2000), "Emotion Circuits in the Brain", *Neuroscience*, Vol. 23, pp. 155–184.
- LeDoux, J.E. (2012), "Evolution of human emotion: a view through fear", *Progress in brain research*, Vol. 195, pp. 431–442.
- LeDoux, J.E. (2013), "The slippery slope of fear", *Trends in Cognitive Sciences*, Vol. 17 No. 4, pp. 155–156.
- Li, C., Maglinao, T.L. and Takahashi, L.K. (2004), "Medial amygdala modulation of predator odor-induced unconditioned fear in the rat", *Behavioral neuroscience*, Vol. 118 No. 2, pp. 324–332.
- Lozano, Y.R., Serafín, N., Prado-Alcalá, R.A., Roozendaal, B. and Quirarte, G.L. (2013), "Glucocorticoids in the dorsomedial striatum modulate the consolidation of spatial but not procedural memory", *Neurobiology of Learning and Memory*, Vol. 101, pp. 55–64.
- Lucas, M., Chen, A. and Richter-Levin, G. (2013), "Hypothalamic corticotropin-releasing factor is centrally involved in learning under moderate stress", *Neuropsychopharmacology official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, Vol. 38 No. 9, pp. 1825–1832.
- Luine, V. (2002), "Sex differences in chronic stress effects on memory in rats", *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, Vol. 5 No. 3, pp. 205–216.
- Luine, V., Martinez, C., Villegas, M., María Magariños, A. and McEwen, B.S. (1996), "Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance", *Physiology & behavior*, Vol. 59 No. 1, pp. 27–32.
- Lund, T.D., Hinds, L.R. and Handa, R.J. (2006), "The androgen 5alpha-dihydrotestosterone and its metabolite 5alpha-androstan-3beta, 17beta-diol inhibit the hypothalamo-pituitary-adrenal response to stress by acting through estrogen receptor beta-expressing neurons in the hypothalamus", *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 26 No. 5, pp. 1448–1456.
- Mackenzie, L., Nalivaiko, E., Beig, M.I., Day, T.A. and Walker, F.R. (2010), "Ability of predator odour exposure to elicit conditioned versus sensitised post traumatic stress disorder-like behaviours, and forebrain deltaFosB expression, in rats", *Neuroscience*, Vol. 169 No. 2, pp. 733–742.
- Mandolesi, L., Addona, F., Foti, F., Menghini, D., Petrosini, L. and Vicari, S. (2009), "Spatial competences in Williams syndrome: a radial arm maze study", *International journal of developmental neuroscience the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, Vol. 27 No. 3, pp. 205–213.
- Marcus, S.M., Young, E.A., Kerber, K.B., Kornstein, S., Farabaugh, A.H., Mitchell, J., Wisniewski, S.R., Balasubramani, G.K., Trivedi, M.H. and Rush, A.J. (2005), "Gender differences in depression: findings from the STAR\*D study", *Journal of affective disorders*, Vol. 87 No. 2-3, pp. 141–150.
- Marek, R., Strobel, C., Bredy, T.W. and Sah, P. (2013), "The amygdala and medial prefrontal cortex: partners in the fear circuit", *The Journal of physiology*, Vol. 591 No. 10, pp. 2381–2391.
- Matsukawa, M., Imada, M., Murakami, T., Aizawa, S. and Sato, T. (2011), "Rose odor can innately counteract predator odor", *Brain research*, Vol. 1381, pp. 117–123.
- Matzel, L.D., Han, Y.R., Grossmann, H., Karnik, M.S., Patel, D., Scott, N., Specht, S.M. and Gandhi, C.C. (2003), "Individual Differences in the Expression of a "General" Learning Ability in Mice", *The Journal of Neuroscience*, Vol. 23 No. 16, pp. 6423–6433.



- Meredith, M. (1991), "Sensory processing in the main and accessory olfactory systems: comparisons and contrasts", *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, Vol. 39 No. 4B, pp. 601–614.
- Milde-Langosch, K. (2005), "The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis", *European journal of cancer (Oxford, England 1990)*, Vol. 41 No. 16, pp. 2449–2461.
- Miller, L.P. and Walters, J.R. (1979), "Effects of depolarization on cofactor regulation of glutamic acid decarboxylase in substantia nigra synaptosomes", *Journal of neurochemistry*, Vol. 33 No. 2, pp. 533–539.
- Modi, J.P., Prentice, H. and Wu, J. (2015), "Regulation of GABA Neurotransmission by Glutamic Acid Decarboxylase (GAD)", *Current pharmaceutical design*, Vol. 21 No. 34, pp. 4939–4942.
- Moldow, R.L., Kastin, A.J., Graf, M. and Fischman, A.J. (1987), "Stress mediated changes in hypothalamic corticotropin releasing factor-like immunoreactivity", *Life sciences*, Vol. 40 No. 4, pp. 413–418.
- Moncho-Bogani, J., Martinez-Garcia, F., Novejarque, A. and Lanuza, E. (2005), "Attraction to sexual pheromones and associated odorants in female mice involves activation of the reward system and basolateral amygdala", *The European journal of neuroscience*, Vol. 21 No. 8, pp. 2186–2198.
- Morrow, B.A., Redmond, A.J., Roth, R.H. and Elsworth, J.D. (2000), "The predator odor, TMT, displays a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat", *Brain research*, Vol. 864 No. 1, pp. 146–151.
- Müller, I., Çalışkan, G. and Stork, O. (2015), "The GAD65 knock out mouse - a model for GABAergic processes in fear- and stress-induced psychopathology", *Genes, brain, and behavior*, Vol. 14 No. 1, pp. 37–45.
- Müller, M., Faber-Zuschratter, H., Yanagawa, Y., Stork, O., Schwegler, H. and Linke, R. (2012), "Synaptology of ventral CA1 and subiculum projections to the basomedial nucleus of the amygdala in the mouse: relation to GABAergic interneurons", *Brain structure & function*, Vol. 217 No. 1, pp. 5–17.
- Müller, M. and Fendt, M. (2006), "Temporary inactivation of the medial and basolateral amygdala differentially affects TMT-induced fear behavior in rats", *Behavioural Brain Research*, Vol. 167 No. 1, pp. 57–62.
- Myers, E.A. and Rinaman, L. (2005), "Trimethylthiazoline supports conditioned flavor avoidance and activates viscerosensory, hypothalamic, and limbic circuits in rats", *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, Vol. 288 No. 6, pp. R1716-26.
- Nategh, M., Nikseresht, S., Khodagholi, F. and Motamedi, F. (2016), "Inactivation of nucleus incertus impairs passive avoidance learning and long term potentiation of the population spike in the perforant path-dentate gyrus evoked field potentials in rats", *Neurobiology of Learning and Memory*.
- Nikaido, Y. and Nakashima, T. (2009), "Effects of environmental novelty on fear-related behavior and stress responses of rats to emotionally relevant odors", *Behavioural Brain Research*, Vol. 199 No. 2, pp. 241–246.
- O'Donnell, T., Hegadoren, K.M. and Coupland, N.C. (2004), "Noradrenergic mechanisms in the pathophysiology of post-traumatic stress disorder", *Neuropsychobiology*, Vol. 50 No. 4, pp. 273–283.
- Olton, D.S. and Samuelson, R.J. (1976), "Remembrance of Places Passed: Spatial Memory in Rats", *Journal of experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, Vol. 2 No. 2, pp. 97–116.

- Packard, M.G., Hirsh, R. and White, N.M. (1989), "Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems", *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 9 No. 5, pp. 1465–1472.
- Palanza, P., Gioiosa, L. and Parmigiani, S. (2001), "Social stress in mice: gender differences and effects of estrous cycle and social dominance", *Physiology & behavior*, Vol. 73 No. 3, pp. 411–420.
- Park, C.R., Zoladz, P.R., Conrad, C.D., Fleshner, M. and Diamond, D.M. (2008), "Acute predator stress impairs the consolidation and retrieval of hippocampus-dependent memory in male and female rats", *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, Vol. 15 No. 4, pp. 271–280.
- Pavlova, I.V. and Rysakova, M.P. (2015), "[The Manifestation of the Anxiety during Fear Conditioning in Wistar Rats]", *Zhurnal vyssheĭ nervnoĭ deiatelnosti imeni I P Pavlova*, Vol. 65 No. 6, pp. 720–734.
- Pick, C.G. and Yanai, J. (1983), "Eight arm maze for mice", *The International journal of neuroscience*, Vol. 21 No. 1-2, pp. 63–66.
- Polston, E.K., Gu, G. and Simerly, R.B. (2004), "Neurons in the principal nucleus of the bed nuclei of the stria terminalis provide a sexually dimorphic GABAergic input to the anteroventral periventricular nucleus of the hypothalamus", *Neuroscience*, Vol. 123 No. 3, pp. 793–803.
- Pschyrembel, W. (2007), *Pschyrembel® Klinisches Wörterbuch*, 261., neu bearb. und erw. Aufl, W. de Gruyter, Berlin.
- Robbins, R.J. and Landon, R.M. (1983), "Somatostatin release from cerebral cortical cells: influence of amino acid neurotransmitters", *Brain research*, Vol. 273 No. 2, pp. 374–378.
- Rodrigues, S.M., LeDoux, J.E. and Sapolsky, R.M. (2009), "The influence of stress hormones on fear circuitry", *Annual review of neuroscience*, Vol. 32, pp. 289–313.
- Rodrigues, S.M., Schafe, G.E. and LeDoux, J.E. (2004), "Molecular mechanisms underlying emotional learning and memory in the lateral amygdala", *Neuron*, Vol. 44 No. 1, pp. 75–91.
- Roosendaal, B. (2003), "Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval", *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, Vol. 27 No. 8, pp. 1213–1223.
- Roosendaal, B., de Quervain, Dominique J-F, Ferry, B., Setlow Barry and McGaugh, J.L. (2001), "Basolateral Amygdala–Nucleus Accumbens Interactions in Mediating Glucocorticoid Enhancement of Memory Consolidation", *Journal of Neuroscience*, Vol. 21 No. 7, pp. 2518–2525.
- Roosendaal, B., Williams, C.L. and McGaugh, J.L. (1999), "Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: involvement of the basolateral amygdala", *The European journal of neuroscience*, Vol. 11 No. 4, pp. 1317–1323.
- Roseboom, P.H., Nanda, S.A., Bakshi, V.P., Trentani, A., Newman, S.M. and Kalin, N.H. (2007), "Predator threat induces behavioral inhibition, pituitary-adrenal activation and changes in amygdala CRF-binding protein gene expression", *Psychoneuroendocrinology*, Vol. 32 No. 1, pp. 44–55.
- Rosen, J.B., Adamec, R.E. and Thompson, B.L. (2005), "Expression of egr-1 (zif268) mRNA in select fear-related brain regions following exposure to a predator", *Behavioural Brain Research*, Vol. 162 No. 2, pp. 279–288.
- Rouvette, T., Klemann, K., Gaszner, B., Scheffer, G.J., Roubos, E.W., Scheenen, W J J M, Vissers, K. and Kozicz, T. (2011), "Differential responses of corticotropin-releasing factor and urocortin 1 to acute pain stress in the rat brain", *Neuroscience*, Vol. 183, pp. 15–24.

- Royer, S., Martina, M. and Paré, D. (1999), "An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala", *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 19 No. 23, pp. 10575–10583.
- Sah, P., Faber, E S L, Lopez De Armentia, M and Power, J. (2003), "The amygdaloid complex: anatomy and physiology", *Physiological reviews*, Vol. 83 No. 3, pp. 803–834.
- Sajdyk, T., Johnson, P., Fitz, S. and Shekhar, A. (2008), "Chronic inhibition of GABA synthesis in the bed nucleus of the stria terminalis elicits anxiety-like behavior", *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, Vol. 22 No. 6, pp. 633–641.
- Sandi, C. and Rose, S.P. (1994), "Corticosterone enhances long-term retention in one-day-old chicks trained in a weak passive avoidance learning paradigm", *Brain research*, Vol. 647 No. 1, pp. 106–112.
- Sheng, M. and Greenberg, M.E. (1990), "The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system", *Neuron*, Vol. 4 No. 4, pp. 477–485.
- Shiga, T., Nakamura, T.J., Komine, C., Goto, Y., Mizoguchi, Y., Yoshida, M., Kondo, Y. and Kawaguchi, M. (2016), "A Single Neonatal Injection of Ethinyl Estradiol Impairs Passive Avoidance Learning and Reduces Expression of Estrogen Receptor  $\alpha$  in the Hippocampus and Cortex of Adult Female Rats", *PLoS one*, Vol. 11 No. 1, pp. e0146136.
- Shughrue, P.J., Lane, M.V. and Merchenthaler, I. (1997), "Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system", *The Journal of comparative neurology*, Vol. 388 No. 4, pp. 507–525.
- Simerly, R.B. (1993), "Distribution and regulation of steroid hormone receptor gene expression in the central nervous system", *Advances in neurology*, Vol. 59, pp. 207–226.
- Sink, K.S., Walker, D.L., Freeman, S.M., Flandreau, E.I., Ressler, K.J. and Davis, M. (2013), "Effects of continuously enhanced corticotropin releasing factor expression within the bed nucleus of the stria terminalis on conditioned and unconditioned anxiety", *Molecular psychiatry*, Vol. 18 No. 3, pp. 308–319.
- Smith, L.M., Wise, S.C., Hendricks, D.T., Sabichi, A.L., Bos, T., Reddy, P., Brown, P.H. and Birrer, M.J. (1999), "cJun overexpression in MCF-7 breast cancer cells produces a tumorigenic, invasive and hormone resistant phenotype", *Oncogene*, No. 18, pp. 6063–6070.
- Snyder, K., Wang, W., Han, R., McFadden, K. and Valentino, R.J. (2012), "Corticotropin-releasing factor in the norepinephrine nucleus, locus coeruleus, facilitates behavioral flexibility", *Neuropsychopharmacology official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, Vol. 37 No. 2, pp. 520–530.
- Sorenson, R.L., Garry, D.G. and Brelje, T.C. (1991), "Structural and functional considerations of GABA in islets of Langerhans. Beta-cells and nerves", *Diabetes*, Vol. 40 No. 11, pp. 1365–1374.
- Southwick, S.M., Bremner, J.D., Rasmusson, A., Morgan, C.A., Arnsten, A. and Charney, D.S. (1999), "Role of norepinephrine in the pathophysiology and treatment of posttraumatic stress disorder", *Biological Psychiatry*, Vol. 46 No. 9, pp. 1192–1204.
- Speert, D.B., McClennen, S.J. and Seasholtz, A.F. (2002), "Sexually dimorphic expression of corticotropin-releasing hormone-binding protein in the mouse pituitary", *Endocrinology*, Vol. 143 No. 12, pp. 4730–4741.
- Staples, L.G. (2010), "Predator odor avoidance as a rodent model of anxiety: learning-mediated consequences beyond the initial exposure", *Neurobiology of Learning and Memory*, Vol. 94 No. 4, pp. 435–445.

- Staples, L.G., McGregor, I.S., Apfelbach, R. and Hunt, G.E. (2008), "Cat odor, but not trimethylthiazoline (fox odor), activates accessory olfactory and defense-related brain regions in rats", *Neuroscience*, Vol. 151 No. 4, pp. 937–947.
- Staples, L.G., McGregor, I.S. and Hunt, G.E. (2009), "Long-lasting FosB/DeltaFosB immunoreactivity in the rat brain after repeated cat odor exposure", *Neuroscience letters*, Vol. 462 No. 2, pp. 157–161.
- Stupien, G., Florian, C. and Rouillet, P. (2003), "Involvement of the hippocampal CA3-region in acquisition and in memory consolidation of spatial but not in object information in mice", *Neurobiology of Learning and Memory*, Vol. 80 No. 1, pp. 32–41.
- Swanson, L.W. and Petrovich, G.D. (1998), "What is the amygdala?", *Trends in Neurosciences*, Vol. 21 No. 8, pp. 323–331.
- Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Rivier, J. and Vale, W.W. (1983), "Organization of Ovine Corticotropin-Releasing Factor Immunoreactive Cells and Fibers in the Rat Brain: An Immunohistochemical Study", *Neuroendocrinology*, Vol. 36 No. 3, pp. 165–186.
- Szabo, A., Perou, C.M., Karaca, M., Perreard, L., Quackenbush, J.F. and Bernard, P.S. (2004), "Statistical modeling for selecting housekeeper genes", *Genome Biology*, Vol. 5 No. 8, pp. R59.
- Szabo, S., Tache, Y. and Somogyi, A. (2012), "The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief "letter" to the editor# of nature", *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, Vol. 15 No. 5, pp. 472–478.
- Takahashi, L.K. (2014), "Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear", *Frontiers in behavioral neuroscience*, Vol. 8, p. 72.
- Takahashi, L.K., Nakashima, B.R., Hong, H. and Watanabe, K. (2005), "The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear", *Neuroscience and biobehavioral reviews*, Vol. 29 No. 8, pp. 1157–1167.
- Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Tomioka, R., Miyazaki, J.-I., Obata, K. and Kaneko, T. (2003), "Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse", *The Journal of comparative neurology*, Vol. 467 No. 1, pp. 60–79.
- Tarragon, E., Lopez, L., Ros-Bernal, F., Yuste, J.E., Ortiz-Cullera, V., Martin, E., Schenker, E., Aujard, F., Bordet, R., Richardson, J.C. and Herrero, M.T. (2012), "The Radial Arm Maze (RAM) for the Evaluation of Working and Reference Memory Deficits in the Diurnal Rodent *Octodon degus*", *Proceedings of Measuring Behaviour*, Vol. 31 No. August 28, pp. 98–100.
- Tong, L.M., Yoon, S.Y., Andrews-Zwilling, Y., Yang, A., Lin, V., Lei, H. and Huang, Y. (2016), "Enhancing GABA Signaling during Middle Adulthood Prevents Age-Dependent GABAergic Interneuron Decline and Learning and Memory Deficits in ApoE4 Mice", *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 36 No. 7, pp. 2316–2322.
- Vaiva, G., Boss, V., Ducrocq, F., Fontaine, M., Devos, P., Brunet, A., Laffargue, P., Goudemand, M. and Thomas, P. (2006), "Relationship between posttrauma GABA Plasma Levels and PTSD at 1-Year Follow-Up", *Psychiatry*, No. 163, pp. 1446–1448.
- Vaiva, G., Thomas, P., Ducrocq, F., Fontaine, M., Boss, V., Devos, P., Rasclé, C., Cottencin, O., Brunet, A., Laffargue, P. and Goudemand, M. (2004), "Low posttrauma GABA plasma levels as a predictive factor in the development of acute posttraumatic stress disorder", *Biological Psychiatry*, Vol. 55 No. 3, pp. 250–254.

- Valdés, J.L., Maldonado, P., Recabarren, M., Fuentes, R. and Torrealba, F. (2006), "The infralimbic cortical area commands the behavioral and vegetative arousal during appetitive behavior in the rat", *The European journal of neuroscience*, Vol. 23 No. 5, pp. 1352–1364.
- Vamvakopoulos, N.C. and Chrousos, G.P. (1993), "Evidence of Direct Estrogenic Regulation of Human Corticotropin-releasing Hormone Gene Expression", *The Journal of Clinical Investigation*, No. 92, pp. 1896–1902.
- Vamvakopoulos, N.V. (1995), "Sexual dimorphism of stress response and immune/ inflammatory reaction" the corticotropin releasing hormone perspective", *Mediators of Inflammation*, No. 4, pp. 163–174.
- van de Stolpe, A., Slycke, A.J., Reinders, M.O., Zomer, A. W. M., Goodenough, S., Behl, C., Seasholtz, A.F. and van der Saag, P. T. (2004), "Estrogen receptor (ER)-mediated transcriptional regulation of the human corticotropin-releasing hormone-binding protein promoter: differential effects of ERalpha and ERbeta", *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, Vol. 18 No. 12, pp. 2908–2923.
- Veinante, P. and Freund-Mercier, M.J. (1998), "Intrinsic and extrinsic connections of the rat central extended amygdala: an in vivo electrophysiological study of the central amygdaloid nucleus", *Brain research*, Vol. 794 No. 2, pp. 188–198.
- Viau, V., Bingham, B., Davis, J., Lee, P. and Wong, M. (2005), "Gender and puberty interact on the stress-induced activation of parvocellular neurosecretory neurons and corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid expression in the rat", *Endocrinology*, Vol. 146 No. 1, pp. 137–146.
- Viau, V., Lee, P., Sampson, J. and Wu, J. (2003), "A testicular influence on restraint-induced activation of medial parvocellular neurons in the paraventricular nucleus in the male rat", *Endocrinology*, Vol. 144 No. 7, pp. 3067–3075.
- Viau, V. and Meaney, M.J. (1991), "Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat", *Endocrinology*, Vol. 129 No. 5, pp. 2503–2511.
- Wallace, K.J. and Rosen, J.B. (2000), "Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: Elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces", *Behavioral neuroscience*, Vol. 114 No. 5, pp. 912–922.
- Wang, X., Chen, Y., Wolf, M., Wagner, K.V., Liebl, C., Scharf, S.H., Harbich, D., Mayer, B., Wurst, W., Holsboer, F., Deussing, J.M., Baram, T.Z., Müller, M.B. and Schmidt, M.V. (2011), "Forebrain CRHR1 deficiency attenuates chronic stress-induced cognitive deficits and dendritic remodeling", *Neurobiology of disease*, Vol. 42 No. 3, pp. 300–310.
- Weinstock, M., Razin, M., Schorer-Apelbaum, D., Men, D. and McCarty, R. (1998), "Gender differences in sympathoadrenal activity in rats at rest and in response to footshock stress", *International journal of developmental neuroscience the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, Vol. 16 No. 3-4, pp. 289–295.
- Weiser, M.J. and Handa, R.J. (2009), "Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus", *Neuroscience*, Vol. 159 No. 2, pp. 883–895.
- Wichmann, R., Fornari, R.V. and Roozendaal, B. (2012), "Glucocorticoids interact with the noradrenergic arousal system in the nucleus accumbens shell to enhance memory consolidation of both appetitive and aversive taste learning", *Neurobiology of Learning and Memory*, Vol. 98 No. 2, pp. 197–205.
- Williamson, M., Bingham, B., Gray, M., Innala, L. and Viau, V. (2010), "The medial preoptic nucleus integrates the central influences of testosterone on the paraventricular nucleus of the

- hypothalamus and its extended circuitries", *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience*, Vol. 30 No. 35, pp. 11762–11770.
- Winocur, G., Wojtowicz, J.M., Sekeres, M., Snyder, J.S. and Wang, S. (2006), "Inhibition of neurogenesis interferes with hippocampus-dependent memory function", *Hippocampus*, Vol. 16 No. 3, pp. 296–304.
- Wong, M.L., Kling, M.A., Munson, P.J., Listwak, S., Licinio, J., Prolo, P., Karp, B., McCutcheon, I.E., Geraciotti, T.D., DeBellis, M.D., Rice, K.C., Goldstein, D.S., Veldhuis, J.D., Chrousos, G.P., Oldfield, E.H., McCann, S.M. and Gold, P.W. (2000), "Pronounced and sustained central hypernoradrenergic function in major depression with melancholic features: Relation to hypercortisolism and corticotropin-releasing hormone", *PNAS*, Vol. 97 No. 1, pp. 325–330.
- Zhong, H. and Simons, J.W. (1999), "Direct Comparison of GAPDH, -Actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as Internal Standards for Quantifying RNA Levels under Hypoxia", *Biochemical and Biophysical Research Communication*, No. 3, pp. 523–526.
- Ziegler, D.R. and Herman, J.P. (2002a), "Neurocircuitry of Stress Integration: Anatomical Pathways Regulating the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis of the Rat", No. 42, pp. 541–551.
- Ziegler, D.R. and Herman, J.P. (2002b), "Neurocircuitry of Stress Intergration: Anatomical Pathways Regulating the Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Axis of the Rat", *Integrative and Comparative Biology*, No. 42, pp. 541–551.

## 7. Anhang

### 7.1. Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem lieben Mann Markus danken, der mich immer unterstützt hat und mir immer liebevoll zur Seite gestanden hat. Er hat mich durch seine zuweilen sehr kritische Art immer produktiv und positiv im Leben voran gebracht.

Direkt dahinter, aber nur ganz knapp, möchte ich meinem lieben Papi danken, der mich das ganze Studium durch kompromisslos moralisch und finanziell unterstützt hat. Ohne Dich wäre es mir nicht möglich gewesen, meinen immer-währenden Wunsch, Ärztin zu werden, zu realisieren. Du hast für jedes Hoch und jedes Tief immer ein offenes, interessiertes Ohr und stehst mir immer mit Rat zur Seite. Ich hab Dich sehr doll lieb!

Auf keinen Fall möchte ich meine Labormädels missen: Andrea, Sandra, Anke, Stephanie, Anne und Consti. Mit euch war es immer lustig und man ist immer gern ins Labor gekommen, weil es mit euch immer wie eine Familie und nach Hause kommen war. Arbeit war es für mich selten. Ich vermisse die Zeit mit euch, es war unheimlich schön. Insbesondere Andrea war nie meine Laborchefin sondern meine Freundin, die immer an mich geglaubt und mich mit allen Kräften gefördert und unterstützt hat, immer ein offenes Ohr und einen guten Rat hatte.

Besonderer Dank gilt auch meinem Doktorvater PD Dr. Roskoden. Einen besseren Doktorvater kann man sich nicht wünschen! Er war jederzeit ansprechbar und hat mir immer das Gefühl gegeben, dass ich das schaffen werde, wenn ich auch selbst oft genug daran gezweifelt habe.

Und auch Prof. Dr. Herbert Schwegler, der mir vieles ermöglichte, immer für einen Plausch zu haben war und einen immer mit seinen sehr eigenen Scherzen und Wortspielen erheitern konnte, möchte ich an dieser Stelle dankend erwähnen.

Prof. Linke möchte ich dafür danken, dass er die Versuchstiere für mich getötet hat, weil ich das niemals übers Herz gebracht hätte.

Und Frau Dr. Kathrin Janitzky möchte ich für die geduldige Anleitung zu Beginn der Versuche danken.

Auch bei allen anderen Familienmitgliedern möchte ich mich bedanken. Ihr habt mich alle fortwährend in meinem Weg bekräftigt und bestätigt.

## 7.2. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die in der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

**„Auswirkungen des Duftstoffes 2,5-dihydro-2,4,5-Trimethylthiazolin auf das räumliche Lernverhalten und die mRNA Expression von c-Fos und dem Corticotropin Releasing Factor in einem Glutamat-Decarboxylase67-Mausmodell“**

Im Institut für Anatomie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg unter Betreuung von Herrn PD OA Dr. med. Thomas Roskoden und Frau Dr. med. Kathrin Janitzky (Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Magdeburg) ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Anja Stefanie Peine

Zirndorf, den 11.05.2016



### 7.3. Persönliche Daten

Name: Anja Stefanie Peine, geb. Kintzel  
Geburtsdatum: 27.06.1982  
Geburtsort: Berlin – Buch  
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

#### Darstellung des Bildungsweges:

Juni 2002 Abitur

2003 – 2005 Ausbildung zur Staatlich-geprüften BTA am Carl-Severing-Berufskolleg, Bielefeld (heute Maria-Stemme-Berufskolleg)

März 2005  
sowie April 2007 Ehrenamtliche Tätigkeit im Labor des Modern German Hospital in Sana`a, Jemen

Okt. 2007 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Sep. 2009 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung erfolgreich bestanden

Okt. 2009 – Mai 2014 Klinisches Studium an der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg  
Famulaturen auf den Gebieten: Frauenheilkunde, Psychiatrie, Radiologie

Okt. 2012 – Mai 2014 Praktisches Jahr

1. Terial: Chirurgie: Helios St. Marienberg, Helmstedt
2. Terial: Gynäkologie: Helios St. Marienberg, Helmstedt
3. Terial: Innere Medizin: Helios St. Marienberg, Helmstedt
4. Terial: Innere Medizin: Uniklinik Magdeburg, Nephrologie
5. Terial: Chirurgie: Uniklinik Magdeburg, Herz-Thorax-Chirurgie

Mai 2014 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung erfolgreich bestanden, Approbation als Ärztin

#### Studienbegleitende Tätigkeiten:

Beschäftigung als BTA im Max-Planck-Institut Magdeburg in der Fachgruppe Bioprozesstechnik, Downstream Processing

Beschäftigung als BTA im Labor des Instituts für Anatomie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Beschäftigung als OP-Assistenz in der Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie im Helios-Klinikum St. Marienberg Helmstedt

Beschäftigung als Assistentin zum Befunden von radiologischen Untersuchungen sowie Durchführung von Untersuchungen unter Anleitung

**Beschäftigungsverhältnisse:**

2005 – 2007	<b>Bavarian Nordic Berlin,</b> Als BTA in allen Bereichen der Impfstoffherstellung (Upstream und Downstream)
2008	<b>Max-Planck-Institut Magdeburg,</b> Als BTA in der Fachgruppe Bioprozesstechnik, Downstream Processing
2008 – 2011	<b>Institut für Anatomie der Universität Magdeburg</b>
2012	<b>Radiologische Praxis Dr. Keller, Helmstedt</b> Als Assistentin zum Anfertigen von radiologischen Befunden, Ausführung von radiologischen Untersuchungen unter Anleitung
2012 – 2013	<b>Helios St. Marienberg, Helmstedt</b> Als OP-Assistenz in der orthopädischen und unfallchirurgischen Abteilung
2014 – 2015	<b>Helios St. Marienberg, Helmstedt</b> Assistenzärztin in Weiterbildung Gynäkologie / Geburtshilfe
2015 – aktuell	<b>Frauenklinik Nathanstift, Klinikum Fürth</b> Assistenzärztin in Weiterbildung Gynäkologie / Geburtshilfe

**Wissenschaftliche Vorleistungen:**

Publikation: „Increased CRF mRNA expression in the sexually dimorphic BNST of male but not female GAD67 mice and TMT predator odor stress effects upon spatial memory retrieval”  
K. Janitzky, A. Peine, A. Kröber, Y. Yanagawa, H. Schwegler, T. Roskoden,  
Behavioural Brain Research, Vol. 272, pp 141-149, 2014

Anja Stefanie Peine  
Fürth, 11.05.2016

## 8. Anlagen

### 8.1. Protokolle

#### ***Corticosteron-Assay ImmChem Double Antibody <sup>125</sup>I RIA Kit For Rats and Mice***

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen

Mäuseserum im Verhältnis 1:200 mit STEROID DILUENT mischen, dazu 10µl Serum zu 2ml DILUENT geben

0,3ml STEROID DILUENT zu den Röhren 1 und 2 geben

0,1ml STEROID DILUENT zu den Röhren 3 und 4 geben

0,1ml CORTICOSTERONE CALIBRATORS (Konzentrationen von 25ng/ml – 1000 ng/ml) zu den Röhren 5 bis 16 geben

0,1 ml RECONSTITUTED CONTROLS und die gelösten Mausproben in die Röhren 17 bis zum Ende des Assay geben

0,2 ml CORTICOSTERONE 125I (blaues Reagenz) in alle Röhren geben

0,2 ml ANTI-CORTICOSTERONE (gelbes Reagenz) in die Röhren 3 bis zum Ende des Assays geben → Auf keinen Fall in Röhren 1 und 2 pipettieren

Alle Röhren vortexen und 2h bei Raumtemperatur inkubieren

Nach Inkubation 0,5ml PRECIPITANT SOLUTION (rotes Reagenz) in alle Röhren geben

Gründlich vortexen

Alle Röhren bei 2300-2500 rpm für 15 Minuten zentrifugieren. Überstand abpipettieren oder dekantieren

Precipitat im Gammazähler messen

#### **Genotypisierung aus den Mausschwänzen**

Abtrennen von ca. 0,5cm Mausschwanz mit einer scharfen Schere, das Schwanzende wird in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß verwahrt

Jeweils 500µl Lysispuffer zugeben

10µl Proteinase K (10mg/ml) zugeben

Über Nacht bei 55°C auf dem Rollschüttler

Bei 13000rpm für 5 min zentrifugieren

## Anlagen

---

350µl Isopropanol in vorbereitete Anzahl von Eppendorfreaktionsgefäße vorlegen, den Überstand je in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführen

Die so entstandenen Mischungen 10x invertieren

15min bei 10000rpm zentrifugieren

Überstand entfernen, Pellets in 70% Ethanol waschen bei Raumtemperatur

5min bei 10000rpm zentrifugieren

Überstand entfernen, Pellets trocknen lassen

Pellets in 30µl 10mM TE-Puffer lösen

Proben können bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden

### PCR zur Genotypisierung

Proben auf Eis auftauen

Während die Proben auftauen wird ein 1%-iges Elektrophoresegel mit Ethidiumbromid vorbereitet

Mastermix für die Proben ansetzen:

Komponente	Menge je Probe in µl
H <sub>2</sub> O	9,2
10x PCR-Puffer	2,5
dNTP-Mix (2,5 mM)	1,0
Primer 1 TR 1-B (10 pM)	1,5
Primer 2 TR -3 (10 pM)	1,5
Primer 3 TR - GFP8 (10pM)	1,5
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,6
Q-Solution	5
Taq-Polymerase	0,2

In der Anzahl der Proben (inkl. Negativkontrolle) jeweils 24µl Mastermix vorlegen

Jeweils 1µl jeder Probe in den angesetzten Mastermix geben

## Anlagen

---

Vorsichtig vortexen

Proben in den Mastercycler stellen

Programm starten

### Zyklusprofil Mastercycler:

Vordenaturierung	5 min	95°C
Denaturierung	15 sec	94°C
Annealing	30 sec	62°C
Elongation	3 min	72°C
End-Longation	7 min	72°C

### 40 Zyklen

Proben nach Abschluss der PCR abkühlen lassen

Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer auffüllen

Gel in die Elektrophoresekammer geben, evtl. Luftblasen in den Probenvertiefungen entfernen

Kammer nochmals soweit mit TAE-Puffer auffüllen, dass das gesamte Gel mit Puffer bedeckt ist

Jeweils 10µl jeder Probe mit 3µl Ladepuffer mischen und in einer der Taschen des vorbereiteten Gels geben

Spannung anlegen (100V)

Proben in Beobachtung des Verhaltens des Kontrollletermixes im Gel laufen lassen (1-1,5h)

Spannung abstellen, Gel vorsichtig aus der Kammer entnehmen

Auswertung des Gels mittels UV-Licht und Fotografie in der UV-Kammer, Fotodokumentation

## Entnahme der Hirnareale

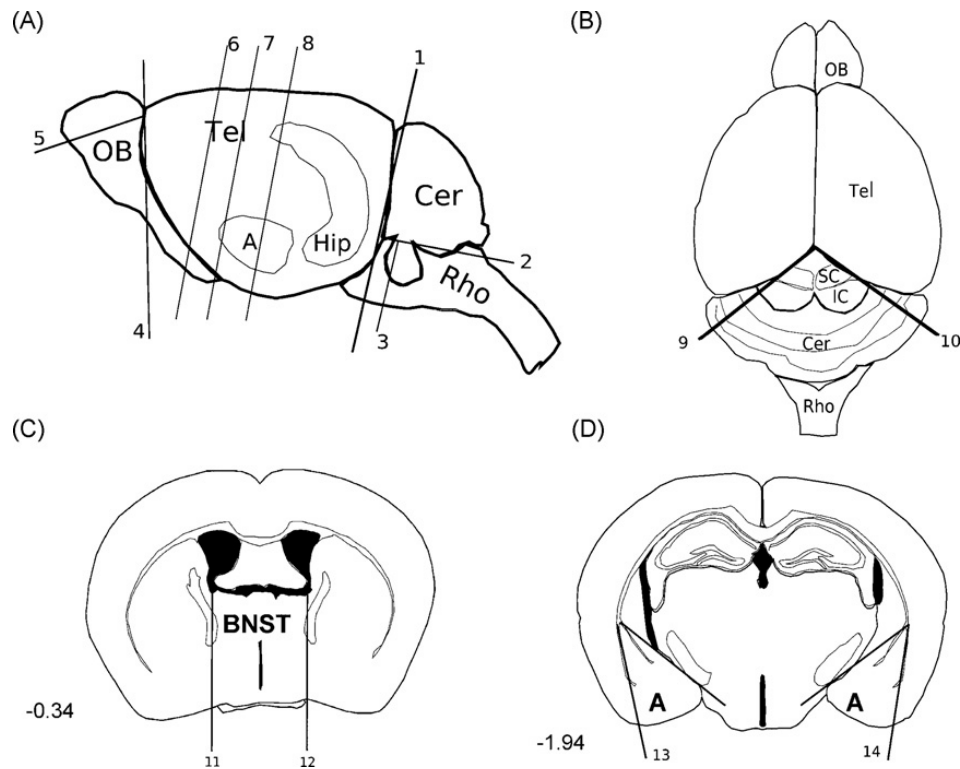


Abb. 26

Aus Janitzky et al. 2009, dargestellt sind die Schnittebenen zur Entnahme der Hirnareale.

Vorgehen: Nach der Dekapitation wurden die Gehirne vorsichtig aus dem Schädel entnommen und in einer sterilen Petrischale präpariert. Die notwendigen Schnittebenen sind in Abb. 26 dargestellt. Das Kleinhirn wurde vom Mittelhirndach abpräpariert. Dazu wurde das Mittelhirn leicht nach rostral gedrückt, sodass ein frontaler Schnitt hinter den Colliculi inferiores den Hirnstamm und das Kleinhirn vom restlichen Hirn trennte. Anschließend wurde das Kleinhirn an den Kleinhirnstielen abgesetzt. Vom verbliebenen Hirnstamm wurde eine ca. 1mm dicke frontal geschnittene Scheibe entnommen, die den Locus coeruleus beinhaltete. Die occipitalen Pole der Großhirnhemisphären wurden stumpf zur Seite gedrängt, um das Mittelhirn darzustellen. Das Mittelhirn wurde mit zwei schrägen Schnitten isoliert, die sich in Höhe der Hirnanhangsdrüse kreuzen. Danach erfolgte die Entfernung der olfaktorischen Bulbi. Die Bulbi wurden beide auf die mediale Seite gelegt und anschließend in einen ventralen und einen dorsalen Anteil geteilt. Es folgte ein frontaler Schnitt durch das basale Vorderhirn etwas rostral vom Chiasma opticum gelegen, um die vordere Kommissur freizulegen. Der rostrale Pol wurde verworfen, vom kaudalen Pol wurde ein ca. 1mm dickes Stück abgetrennt, das

den BNST beinhaltete. Vom Boden der Ventrikel wurden zwei basale Schnitte zum basalen Ende des Hirns gemacht, die den BNST vom restlichen Hirngewebe trennten. Anschließend wurde ein zweiter ca. 1,5mm dicker Schnitt gemacht, der den Großteil der Amygdala enthielt. Die Amygdala konnte ziemlich leicht im frontalen Anteil identifiziert werden und wurde vom Temporallappen durch einen Schnitt entlang der Capsula externa und einem weiteren entlang des Tractus opticus isoliert. Um den Hippocampus zu isolieren wurde der verbliebene Hirnblock sagittal in der Mitte in zwei Teile, links und rechts, getrennt. Von beiden Teilen wurde das Zwischenhirn entfernt und der Hippocampus von den darüber liegenden Cortices befreit. Die sechs entnommenen Hirnareale (ventraler Bulbus olfactorius (vBO), Bed Nucleus of the Stria terminalis (BNST), Amygdala (Amyg), paraventriculärer Nucleus des Hypothalamus (PVN), Locus coeruleus (LC), Hippocampus (Hipp)) wurden sofort in RNAlater-Lösung eingelegt und zunächst über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Proben in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C eingefroren bis zur weiteren Verarbeitung

### **RNA-Isolierung mittels Trizol-Protokoll (TRIZOL® LS Reagent, Ambion Life-Tech)**

Zur Behandlung der Proben ausschließlich RNase-freie Arbeitsmittel verwenden

Proben unter den Abzug stellen

500µl Trizol auf die Proben geben

Probe mittels Mörser homogenisieren und auf Eis stellen

5min inkubieren

60µl Chloroform zu jeder Probe geben und kräftig schütteln

Kurz inkubieren

15min bei 12400rpm bei 4°C zentrifugieren

Wässrige Phase vorsichtig abpipettieren und in RNasefrei Tubes überführen

150µl Isopropanol zugeben, ordentlich schütteln

10min inkubieren

10min bei 4°C und 12400rpm zentrifugieren

Überstand verwerfen

Zum Pellet 300µl 75% Ethanol geben

Vorsichtig vortexen

## Anlagen

---

5min bei 4°C und 9800rpm zentrifugieren

Überstand verwerfen, Pellets trocknen lassen

Pellets in 20µl DEPC-H<sub>2</sub>O lösen (bei kleinen Pellets nur 10µl)

Einfrieren und Lagerung bei -80°C

### **RT-PCR (RT-PCR-Kit, Fermentas)**

Zunächst wird von jeder Probe der RNA-Gehalt gemessen, um von jeder Probe 1,5µg RNA einsetzen zu können

Photometrische Bestimmung des RNA-Gehalts: Verdünnung der Probe im Verhältnis 1:100 mit DEPC-H<sub>2</sub>O, 100µl Gesamtprobe werden photometrisch vermessen (280 und 260nm).

Berechnung des Gesamtgehaltes an RNA jeder Probe

Ansetzen der Verdünnungen, sodass in 10µl Probe ein Gesamtgehalt von 1,5µg RNA vorhanden ist

Jeweils 10µl Total-RNA jeder Probe mit 1µl Oligo-dt-Primer versetzen

Proben in das Inkubationsgerät stellen

5min bei 70°C inkubieren

20min Pause

Proben auf Eis stellen

Zu jeder Probe 7µl Mix 2 geben (siehe unten)

Proben in das Inkubationsgerät stellen

5min bei 37°C

Zu jeder Probe 2µl Mix 3 geben (siehe unten)

60 min bei 42°C inkubieren

10min bei 70°C inkubieren

10min bei 20°C inkubieren

Anschließend auf 4°C abkühlen lassen

Zu jeder Probe 80µl DEPC-H<sub>2</sub>O geben

Lagerung der Proben bei -20°C



**Mix 2 pro Probe:**

4µl 5x Reaktionspuffer

2µl d-NTP-Mix (10mM)

1µl Riboblock Inhibitor 20U/µl

**Mix 3 pro Probe:**

1µl Reaktionspuffer

1µl M-MLV-RT (200U/µl)

**Programm des iCycler (Bio-Rad):**

Denaturierung 5min 95°C

40 Zyklen:

30 s 95°C

60s 60°C

### **Rezepte für Lösungen**

#### **Elektrophoresepuffer 0,3mol/l, 10l**

120g NaOH (300mM/l)

3,5g EDTA (1mM/l) mit Wasser ad 10l

#### **Tris-Stammlösung 0,4mol/l**

48,46g Tris

Mit Wasser ad 1l

#### **HCl-Stammlösung**

16,5ml 37%-ige HCl

Mit Wasser ad 1l

#### **Neutralisationspuffer, pH 7,5**

25ml Tris-Stammlösung

40ml HCl (0,2mol/l)

Mit Wasser ad 100ml

#### **Lysis-Stammlösung**

146,11g NaCl (2,5mol/l)

37,23g EDTA (100mmol/l)

7,90g NaOH

Den pH-Wert mit NaOH auf 10 einstellen

Mit Wasser ad 1l

### **Arbeitslösung Lysis**

1% Triton-X 100 frisch zur Lysis-Stammlösung

### **Ethidiumbromidlösung 0,02%, 50ml**

100µl 1% Ethidiumbromidlösung ad 50µl mit Aqua dest. Auffüllen

### **TAE-Puffer 50x**

Tris Base 242g einwiegen

0,5M EDTA 100ml

Eisessig konz. 57,1ml

Mit Aquqdest. Auf 1l auffüllen

➔ 1:50 verdünnen

### **PCR-Gel für 400ml Gel**

Rahmen für das Gel entsprechend der Anleitung zusammen setzen

4g Agar-Agar einwiegen

Mit TAE-Puffer auf 400ml auffüllen

Lösung aufkochen bis sich Agarose gelöst hat

Langsam abkühlen lassen

Bei 60°C 40µl Ethidiumbromidlösung hinzu pipettieren (10µl pro 100ml Gel)

Ausreichend umrühren

Gel zügig in den Rahmen gießen (evtl. Luftblasen entfernen)

Kämme in den Rahmen einsetzen (Probenvertiefungen)

Abkühlen lassen

