

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

**Plasticity-Related-Gene-1: Unterschiede im Verhalten und  
in der Morphologie der Amygdala im 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 Sandra Petzold  
aus Magdeburg  
Magdeburg, 28. September 2016

# Dokumentationsblatt

## Bibliographische Beschreibung:

Petzold, Sandra:

Plasticity-Related-Gene-1: Unterschiede im Verhalten und in der Morphologie der Amygdala im Mausmodell. - 2016. - 97 Bl. : 15 Abb., 33 Tab., 3 Anl.

## Kurzreferat

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von homo- und heterozygoten PRG1-defizienten Mäusen und deren Wildtypwurfgeschwistern der Einfluss von PRG1 auf emotionales Verhalten sowie dessen morphologisches Korrelat, die Amygdala untersucht. Mittels verschiedener Modelle (Elevated-Plus-Maze, Motility-Box, Test der sozialen Interaktion und Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response-Test) konnte ein signifikant vermindertes Angst- und Sozialverhalten, fehlende Angstkonditionierung sowie Hinweise auf erhöhte lokomotorische Aktivität für die homozygot PRG1-defizienten Tiere nachgewiesen werden. Molekularbiologisch via ELISA und qRT-PCR ergab sich keine Evidenz für eine Interaktion von PRG1 und CRF sowie den Neurotrophenen NGF, BDNF und NT-3 in der Amygdala, da keine signifikanten Unterschiede in Protein- und mRNA-Expression festgestellt wurden. Immunhistochemisch jedoch konnte eine signifikant verringerte Zelldichte Parvalbumin- und NPY-positiver Zellen bei den homozygoten PRG1-defizienten Mäusen dokumentiert werden. Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung von PRG1, da sie Evidenz für schwerwiegende Verhaltensänderungen liefert und demonstriert, dass PRG1 nachhaltig die Amygdala beeinflusst und auf zellulärer Ebene zu Veränderungen führt.

## Schlüsselwörter

Amygdala, PRG1, Angst, Verhalten

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>i</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>iii</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>1 Einführung</b>	<b>1</b>
1.1 Plasticity-Related-Gene-1 . . . . .	1
1.2 Amygdala . . . . .	2
1.3 Verhalten . . . . .	4
1.3.1 Elevated-Plus-Maze . . . . .	5
1.3.2 Motility-Box . . . . .	6
1.3.3 Soziale Interaktion . . . . .	8
1.3.4 Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response . . . . .	8
1.4 Neurotrophine . . . . .	10
1.5 Ziel der Arbeit . . . . .	11
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1 Versuchstiere . . . . .	13
2.2 Verhalten . . . . .	14
2.2.1 Elevated-Plus-Maze . . . . .	14
2.2.2 Motility-Box . . . . .	15
2.2.3 Soziale Interaktion . . . . .	15
2.2.4 Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response . . . . .	15
2.3 Immunhistochemie . . . . .	16
2.4 Quantifizierung . . . . .	17
2.5 Proteine . . . . .	17
2.5.1 Protein-Isolation . . . . .	17

2.5.2	Bradford-Test . . . . .	18
2.5.3	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay . . . . .	18
2.6	RNA . . . . .	20
2.6.1	RNA-Isolation für qRT-PCR . . . . .	20
2.6.2	Quantitative real-time-PCR-Reaktion . . . . .	20
2.7	Statistik . . . . .	21
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1	Verhalten . . . . .	22
3.1.1	Elevated-Plus-Maze . . . . .	22
3.1.2	Motility-Box . . . . .	31
3.1.3	Soziale Interaktion . . . . .	32
3.1.4	Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response . . . . .	34
3.2	Morphologie . . . . .	37
3.2.1	Flächenbestimmung der Kerngebiete der Amygdala . . . . .	37
3.2.2	Die Zelldichte NPY-positiver Neurone in der Amygdala . . . . .	39
3.2.3	Die Zelldichte Parvalbumin-positiver Neurone in der Amygdala . . . . .	42
3.3	Proteine . . . . .	46
3.3.1	Gesamtproteingehalt via Bradford-Test . . . . .	46
3.3.2	Proteingehalt von CRF und Neurotrophinen via ELISA . . . . .	46
3.4	mRNA-Expression von CRF und Neurotrophinen via qRT-PCR . . . . .	48
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>50</b>
4.1	Einleitung der Diskussion . . . . .	50
4.2	Einfluß von PRG1 auf das Verhalten . . . . .	52
4.3	Einfluß von PRG1 auf GABAerge Neurone und Neuropeptide in der Amygdala . . . . .	56
4.4	Einfluss von PRG1 auf Neurotrophine . . . . .	58
4.5	Schlussfolgerung . . . . .	59
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>62</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>76</b>
	<b>Ehrenerklärung</b>	<b>77</b>

<b>Bildungsweg</b>	<b>78</b>
<b>Anlagen</b>	<b>79</b>
A.1 Materialien . . . . .	80
A.2 Protokolle . . . . .	82
A.2.1 Immunhistochemie (Free-Floating-Methode) . . . . .	82
A.2.2 Modifizierte Nissl-Färbung mit Kresylechtviolett . . . . .	82
A.2.3 RNA-Isolation . . . . .	83
A.3 Publikationen . . . . .	84

# Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AMPA	alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ASR	Acoustic-Startle-Response
BDNF	Brain-Derived-Neurotrophic-Factor
BLA	basolateraler Kern der Amygdala
BMA	basomedialer Kern der Amygdala
BSA	bovines Serumalbumin
CCK	Cholezystokinin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA	zentraler Kern der Amygdala
CRF	Corticotropin-Releasing-Factor
DAB	Diaminobenzidin
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
EPM	Elevated-Plus-Maze
FS-ASR	Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HE	heterozygot PRG1-defiziente Maus
HO	homozygot PRG1-defiziente Maus
LPA	Lysophosphatsäure
LPP	Lipid-Phosphat-Phosphatase
LTP	Langzeit-Potenzierung
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NGF	Nervenwachstumsfaktor
NGS	normales Ziegenserum
NHS	normales Pferdeserum

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPY	Neuropeptid-Y
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4/5	Neurotrophin-4/5
PRG1	Plasticity-Related-Gene-1
PV	Parvalbumin
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RQ	Relative-Quantity - relative Menge
SA-HRP	Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Lösung
SEM	Standard-Error-of-the-Mean - Standardfehler
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TMB	Tetramethylbenzidin
TrK	Tyrosinkinase-Rezeptoren
WT	Wildtyp-Maus
ZNS	zentrales Nervensystem

# Tabellenverzeichnis

3.1	Elevated-Plus-Maze-Test 1: Mittelwerte $\pm$ SEM (je Gruppe $n = 10$ ) . . .	26
3.2	Elevated-Plus-Maze-Test 2: Mittelwerte $\pm$ SEM (je Gruppe $n = 10$ ) . . .	26
3.3	Elevated-Plus-Maze-Test 1: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*asymptotisch F-verteilt, Anwendung des Welch-Tests) .	27
3.4	Elevated-Plus-Maze-Test 2: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*asymptotisch F-verteilt, Anwendung des Welch-Tests) .	27
3.5	Elevated-Plus-Maze-Test 1: Post-Hoc-Tests nach Tamhane (wenn asymptotisch F-verteilt) bzw. Bonferroni . . . . .	28
3.6	Elevated-Plus-Maze-Test 2: Post-Hoc-Tests nach Tamhane (wenn asymptotisch F-verteilt) bzw. Bonferroni . . . . .	29
3.7	Elevated-Plus-Maze-Test: Vergleich von Test 1 und 2 innerhalb der Gruppen mittels t-Test für abhängige Stichproben (je Gruppe $n = 10$ ) . . . . .	30
3.8	Motility-Box: Laufwege und Anzahl der Drehungen; Mittelwerte $\pm$ SEM (je Gruppe $n = 10$ ) . . . . .	31
3.9	Motility-Box: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse	31
3.10	Soziale Interaktion: Mittelwerte $\pm$ SEM (WT und HO je $n = 9$ , HE $n = 4$ )	32
3.11	Soziale Interaktion: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*asymptotisch F-verteilt, Anwendung des Welch-Tests) . . . . .	32
3.12	Soziale Interaktion: Post-Hoc-Tests nach Bonferroni . . . . .	34
3.13	Startle-Amplituden [mV] vor und nach dem aversiven Reiz: Mittelwerte $\pm$ SEM (je Gruppe $n = 10$ ) . . . . .	34
3.14	FS-ASR: Vergleich der Startle-Amplituden vor und nach dem Fußschock innerhalb der Gruppen mittels t-Test . . . . .	35
3.15	Gewicht und Alter vor dem Startle-Versuch: Mittelwerte $\pm$ SEM (je Gruppe $n = 10$ ) . . . . .	35
3.16	FS-ASR: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*asymptotisch F-verteilt, Anwendung des Welch-Tests) . . . . .	35

3.17	Mittlere Flächen je Kerngebiet der Amygdala: Mittelwerte $\pm$ SEM (WT $n = 7$ , HE $n = 4$ , HO $n = 8$ ) . . . . .	37
3.18	Mittlere Flächen je Kerngebiet der Amygdala: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*asymptotisch F-verteilt, Anwendung des Welch-Tests) . . . . .	38
3.19	Zellflächendichte NPY-positiver Zellen: Mittelwerte $\pm$ SEM (WT $n = 7$ , HE $n = 4$ , HO $n = 7$ ) . . . . .	39
3.20	Zellflächendichte NPY-positiver Zellen: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*asymptotisch F-verteilt, Anwendung des Welch-Tests) . . . . .	40
3.21	Zellflächendichte NPY-positiver Zellen: Post-Hoc-Tests nach Tamhane (wenn asymptotisch F-verteilt) bzw. Bonferroni . . . . .	41
3.22	Zellflächendichte PV-positiver Zellen: Mittelwerte $\pm$ SEM (WT $n = 7$ , HE $n = 4$ , HO $n = 7$ ) . . . . .	42
3.23	Zellflächendichte PV-positiver Zellen: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse . . . . .	43
3.24	Zellflächendichte PV-positiver Zellen: Post-Hoc-Tests nach Bonferroni . . . . .	43
3.25	Gesamtproteingehalt: Mittelwerte $\pm$ SEM (WT $n = 5$ ; HE $n = 4$ ; HO $n = 5$ ) . . . . .	46
3.26	Gesamtproteingehalt: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse . . . . .	46
3.27	Proteingehalt von CRF und Neurotrophen: Mittelwerte $\pm$ SEM (je Gruppe $n = 6$ ) . . . . .	47
3.28	Proteingehalt: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse . . . . .	47
3.29	mRNA-Expression $\Delta C_T$ -Werte: Mittelwerte $\pm$ SEM (je Gruppe $n = 6$ ) . . . . .	48
3.30	mRNA-Expression $\Delta C_T$ -Werte: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse . . . . .	48
3.31	Relative Menge der mRNA (je Gruppe $n = 6$ ) . . . . .	49
A.1	Sequenzen der verwendeten Primer . . . . .	81
A.2	Temperaturoptimum und Effizienz der verwendeten Primer . . . . .	81

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Skizze des Elevated-Plus-Maze . . . . .	6
1.2	Der akustische Startle-Reflex einer Ratte (Abbildung aus Koch: The Neurobiology of Startle [Koch 1999]). Etwa 30 ms nach Beginn des akustischen Reizes erfolgt die akustische Startle-Reaktion. Die mechanische Reaktion wird umgesetzt in Spannung [mV]. . . . .	9
3.1	Elevated-Plus-Maze-Test:Vergleich der Anzahl des Betretens der offenen, geschlossenen und aller Arme (=Aktivität) über die drei Versuchsgruppen Wildtypen, heterozygote und homozygote Knockout-Mäuse (je Gruppe $n = 10$ ) in Test 1 und 2. Der Versuch zeigt jeweils, dass die HO-Mäuse signifikant häufiger auf allen Armen im EPM sind. Dies ist besonders auf das Betreten der offenen Arme zurückzuführen. D.h. HO-Mäuse haben eine signifikant höhere Aktivität ((a) ANOVA Test 1: # : $p = 0,063$ ; *** : $p < 0,001$ und (b) ANOVA Test 2: ** : $p < 0,01$ ; *** : $p < 0,001$ ). In den Post-Hoc-Tests wird für Test 1 und 2 nachgewiesen, dass sich die Heterozygoten nicht von den Wildtypen unterscheiden ( $p > 0,05$ ), während sich beide Gruppen jeweils signifikant von den Homozygoten unterscheiden ( $p < 0,001$ ). . . . .	24

3.2	Elevated-Plus-Maze-Test 1: Vergleich der Zeit [s] auf den offenen und geschlossenen Armen über die drei Versuchsgruppen Wildtypen, heterozygote und homozygote Knockout-Mäuse (je Gruppe $n = 10$ ) in Test 1 und 2. Der Versuch zeigt jeweils, dass die HO-Mäuse signifikant kürzer auf den geschlossenen Armen ((a) und (b): ANOVA $*** : p < 0,001$ ) und länger auf den offenen Armen ((a) und (b): ANOVA $** : p < 0,01$ ) des EPM sind, d.h. weniger Angst haben. In den Post-Hoc-Tests wird für Test 1 und 2 nachgewiesen, dass sich die Heterozygoten nicht von den Wildtypen unterscheiden ( $p > 0,05$ ), während sich beide Gruppen jeweils signifikant von den Homozygoten unterscheiden ( $p < 0,05$ ). . . . .	25
3.3	Soziale Interaktion. Es zeigten sich die Unterschiede in der Gesamtkontaktzeit ( $\# : p = 0,062$ ) und in der Gesamtanzahl der Kontakte $n$ ( $\# : p = 0,054$ ) als statistischer Trend. Die Anzahl der Kontakte in den Ecken unterschied sich signifikant ( $* : p < 0,05$ ), der Post-Hoc-Test nach Bonferroni ermittelte, dass die Homozygoten signifikant weniger Kontakte in der Ecke hatten als die Wildtypen ( $p < 0,05$ ),. Die Kontakte an der Seite ( $\# : p = 0,152$ ) und in der Mitte ( $\# : p = 0,230$ ) sowie die Zeit je Kontakt ( $\# : p = 0,141$ ) unterschieden sich nicht signifikant (WT und HO je $n = 9$ , HE $n = 4$ ). . . . .	33
3.4	Angstsensibilisierung bei der akustischen Schreckreaktion. Die Basiswerte der Startle-Reaktion unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den drei Versuchsgruppen (ANOVA $p = 0,946$ ). Die homozygot PRG1-defizienten Mäuse zeigen keine Angstsensibilisierung der akustischen Schreckreaktion, da Block 2-4 und Block 5-7 sich nicht signifikant unterschieden (Vergleich Startle-Amplituden von Block 2-4 und Block 5-7 innerhalb der Gruppen mittels t-Test für gepaarte Stichproben; $p = 0,857$ ). Die Wildtypen ( $** : p < 0,01$ ) und die Heterozygoten ( $* : p < 0,05$ ) zeigen einen signifikanten Anstieg der Startle-Amplituden, also eine normale Angstsensibilisierung (je Gruppe $n = 10$ ). . . . .	36

3.5	Repräsentativer Ausschnitt eines Koronar-Schnitts (Bregma -1,58mm nach Paxinos: „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates“), Nissl-Färbung, Wildtypmaus Nr. 3 in 50 facher Vergrößerung. Dargestellt sind die lateralen (LA), basolateralen (BLA), zentralen (CEA), basomedialen (BMA), medialen (MEA) und kortikalen (CA) Kerne der Amygdala, sowie der piriforme Kortex (PIR), die Stria terminalis (ST) und der Tractus opticus (OPT). . . . .	38
3.6	Zellflächendichte NPY-positiver Zellen der drei Versuchsgruppen (WT $n = 7$ , HE $n = 4$ , HO $n = 7$ ) in der Amygdala. Die Gruppen unterscheiden sich signifikant im Gesamtgebiet der Amygdala (***) : $p < 0,001$ ), im basolateralen/lateralen Kerngebiet (***) : $p < 0,001$ ), sowie im basomedialen Kerngebiet (** : $p < 0,01$ ). Dabei tendieren die Homozygoten zu leicht niedrigeren Werten und die Heterozygoten zu deutlich höheren Werten verglichen mit den Wildtypen. Keine Änderungen lagen im zentralen Kerngebiet der Amygdala vor. . . . .	40
3.7	NPY-immunpositives Neuron in der BLA/LA eines heterozygoten PRG1-defizienten Tieres (Nr. 32) in 400 facher Vergrößerung. . . . .	41
3.8	Zellflächendichte PV-positiver Zellen der drei Versuchsgruppen (WT $n = 7$ , HE $n = 4$ , HO $n = 7$ ) in der Amygdala. Es ist in allen Kerngebieten ein leichter Abfall bei den Homozygoten zu beobachten. Im basomedialen Gebiet der Homozygoten ist eine signifikant verringerte Zelldichte PV-positiver Neurone nachweisbar (** : $p < 0,01$ ), dabei unterscheiden sich die Homozygoten sowohl von den Wildtypen als auch den Heterozygoten. Die Heterozygoten verhalten sich wie die Wildtypen. . . . .	43
3.9	PV-immunpositive Neurone in der BLA/LA eines Wildtyptieres (Nr. 6) in 50 facher Vergrößerung. . . . .	44
3.10	PV-immunpositive Neurone in der BLA/LA eines heterozygoten PRG1-defizienten Tieres (Nr. 33) in 400 facher Vergrößerung. . . . .	44
3.11	PV-immunpositive Neurone in der BLA/LA eines heterozygoten PRG1-defizienten Tieres (Nr. 33) in 200 facher Vergrößerung. . . . .	45
3.12	PV-immunpositive Neurone in der BLA/LA eines homozygoten PRG1-defizienten Tieres (Nr. 16) in 200 facher Vergrößerung. . . . .	45

3.13 Relative Menge der mRNA von CRF sowie den Neurotrophenen BDNF und NT-3 in der Amygdala. Die relative Expression wurde bestimmt mittels  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode, wobei die Menge der Ziel-mRNA relativ zur Kontrolle (WT auf 100 % gesetzt) errechnet wird. Die  $\Delta C_T$ -Werte zeigen keine signifikanten Unterschiede (je Gruppe  $n = 6$ ). . . . . 49

# 1 Einführung

## 1.1 Plasticity-Related-Gene-1

Das Plasticity-Related-Gene-1 (PRG1) wurde 2003 entdeckt und als Mitglied der Lipid-Phosphat-Phosphatasen(LPP)-Familie klassifiziert [Bräuer et al. 2003]. Es beeinflusst das Wachstum und die Organisation von Neuronen, beispielsweise das Auswachsen von Neuriten, die Bildung von Filopodien wie auch Spines und das Auswachsen sowie die Konfiguration von Axonen [Trimbuch 2009]. PRG1 wird spezifisch in Neuronen von Vertebraten exprimiert und ist in Phasen der Entwicklung und während Regenerationsprozessen hochreguliert [Bräuer et al. 2003]. Es ist vor allem im Hippokampus und entorhinalem Kortex lokalisiert [Bräuer et al. 2003; Trimbuch 2009], wurde jedoch auch im cerebralen und cerebellaren Kortex, Bulbus olfactorius, Striatum und in der Amygdala nachgewiesen [Tokumitsu et al. 2010]. Das humane PRG1-Protein ist zu 95 % identisch mit dem der Maus und besteht aus 763 Aminosäuren und sechs Transmembrandomänen. Während drei Windungen extrazellulär liegen und mit einer Phosphatase-Funktion ausgestattet sind, gibt es eine große (400 Aminosäuren) hydrophile intrazelluläre Domäne, welche regulatorisch oder signaltransduktorisch fungieren könnte [Bräuer und Nitsch 2008]. Intrazellulär ist PRG1 in der postsynaptischen Dichte an glutamatergen Synapsen lokalisiert. Nicht nachgewiesen wurde es präsynaptisch oder an GABAergen Synapsen [Trimbuch et al. 2009; Tokumitsu et al. 2010]. Dies ermöglicht PRG1 eine Mitbeteiligung an der Kontrolle glutamaterger Transmission. Bräuer et al. postulierten ursprünglich, dass PRG1 den Lysophosphatsäure(LPA)-Signaltransduktionsweg via Enzymaktivität moduliert. Sie wiesen Monoacylglycerol nach, was ein Abbauprodukt von LPA ist. Zudem konnte die Neuritenkontraktion durch LPA eliminiert werden infolge einer Überexpression von PRG1 [Bräuer et al. 2003; Bräuer und Nitsch 2008]. Es wurde jedoch gezeigt, dass PRG1 nicht über das Phosphatase-Motiv verfügt, welches essentiell für die Phosphatase-Aktivität von LPPs ist [Brindley 2004; Zhang et al. 2000]. LPA ist ein einfaches Lipid-

Phosphat, ein natürlicher Bestandteil von Zellmembranen sowie ein wichtiges bioaktives Signalmolekül. LPA kann mittels verschiedener G-Protein-gekoppelter LPA-Rezeptoren unterschiedliche Wirkungen erzeugen (Zellproliferation, Schutz vor Apoptose, Zellmigration, Zytokin- und Chemokinsekretion, Thrombozytenaggregation, Kontraktion und Transformation glatter Muskelzellen, Neuritenretraktion und andere) [Brindley 2004; Aikawa et al. 2015]. Die erhöhte Phosphatase-Aktivität und die Ergebnisse von Bräuer et al. wurden als Ergebnis einer indirekten Stimulation von anderen LPPs durch PRG1 diskutiert [Brindley 2004]. Auch Morris et al. unterstützen diese These und schlagen darüberhinaus eher eine Rezeptor-ähnliche Funktion vor [Sigal et al. 2005; McDermott et al. 2004] in Analogie zu vielen anderen Proteinfamilien, bei denen sich inkompetente Homologe von aktiven Enzymen, sog. „nonenzymes“, entwickelt haben und diese dennoch die Fähigkeit behalten haben, mit ihren Substraten zu interagieren [Nandurkar et al. 2001; Todd et al. 2002]. Trimbuch et al. entwickelten transgene PRG1-Mäuse und wiesen an ihnen zahlreiche Veränderungen nach: Bei den homozygot PRG1-defizienten Tieren (HO) findet sich eine hippokampale Übererregbarkeit der Neurone, die im juvenilen Alter von drei bis vier Wochen bei etwa der Hälfte der Population durch epileptische Anfälle zum Tode führt [Trimbuch 2009]. Die exzitatorische synaptische Transmission steigt signifikant an, jedoch verändert sich nicht der molekulare Aufbau der Synapsen. Weder die Expression der NMDA- und AMPA-Rezeptoren, noch ihr Quotient ist unterschiedlich zwischen den HO- und Wildtyp-Tieren [Trimbuch 2009]. Stattdessen zeigen die Ergebnisse, dass PRG1 die glutamaterge Signaltransduktion und den LPA-Transduktionsweg moduliert, indem es von der postsynaptischen Seite mit den präsynaptischen LPA<sub>2</sub>-Rezeptoren interagiert [Trimbuch 2009]. Im Rahmen der Dissertation von Trimbuch sind zudem auffällige Verhaltensweisen der PRG1-HO, wie vermehrtes Rennen, Springen oder Putzen dokumentiert, sowie mögliche (Verhaltens-)Veränderungen aufgrund epileptischer Anfälle diskutiert worden [Trimbuch et al. 2009].

## 1.2 Amygdala

Die Amygdala (der Mandelkern; Corpus amygdaloideum) ist Teil des limbischen Systems, welches unter anderem emotionales Verhalten und Lernverhalten reguliert. Die Amygdala ist involviert in Gedächtnisleistungen und Emotionen, insbesondere Angst und Furcht [Adolphs et al. 1995; Amunts et al. 2005; Ehrlich et al. 2009; Maren 1999; Phillips und LeDoux 1992]. Gedächtnisleistungen basieren auf dem Aufnehmen, Kodie-

ren und Speichern von Informationen. Ermöglicht wird dies auf zellulärer Ebene durch neue Zell-Zell-Kontakte, der neuronalen Plastizität und Veränderungen an den Synapsen. Gleiches gilt auch für die Überführung kurzfristiger Gedächtnisinhalte in langfristige [Lømo 2003]. Die synaptische Plastizität beruht auf verschiedenen Mechanismen wie präsynaptischer Verstärkung, posttetanischer Potenzierung, synaptischer Depression und Langzeit-Potenzierung (LTP). Die LTP ist einer der Hauptmechanismen um neuronale Synapsen zu modifizieren und Erinnerungen im Gehirn abzuspeichern [Morris 2003; Malenka und Bear 2004]. Dieses Phänomen wird ebenfalls in der Amygdala beschrieben [Cooke und Bliss 2006].

Die Amygdala besteht aus mehreren anatomischen und funktionell abzugrenzenden Kerngebieten (zentrales, basolateral/laterales, mediales, basomediales Kerngebiet) [Krettek und Price 1978a], die ganz unterschiedlich zu ihrer Funktion beitragen [Swanson und Petrovich 1998; Killcross et al. 1997]. Die lateralen Strukturen bestehen hauptsächlich (ca. 80 %) aus glutamatergen Projektionsneuronen, die medialen und zentralen Kerne aus GABAergen Neuronen [Cassell et al. 1986; McDonald 1982]. In einem vereinfachten Modell dient der basolaterale Nukleus als die wichtigste sensorische Schnittstelle, da er die sensorischen Informationen aus Thalamus und Kortex bahnt [McDonald 1998; Turner und Herkenham 1991]. Ausgenommen hiervon ist der Geruchssinn. Die Afferenzen vom Bulbus olfactorius und vom olfaktorischen Kortex erhält vor allem das mediale Kerngebiet [Swanson und Petrovich 1998]. Der zentrale Nukleus fungiert als Ausgabe-stelle und projiziert zu verschiedenen Strukturen im Hirnstamm und Hypothalamus [Krettek und Price 1978b; LeDoux et al. 1988; Petrovich und Swanson 1997]. Weiterhin existieren unidirektionale oder reziproke Verbindungen der Nuclei mit vielen kortikalen und subkortikalen Hirnstrukturen [McDonald 1991, 1998; Pitkänen et al. 2000], sowie viele inter- und intranukleäre Projektionen. Läsionen des Mandelkerns dämpfen die Fähigkeit, Angst zu empfinden und auszudrücken [File et al. 1998; Goldstein et al. 1996; Davis et al. 1993], Gesichter wieder zu erkennen und deren Emotionen zu identifizieren [Adolphs et al. 1999; Broks et al. 1998; Morris et al. 1996]. Dahingegen löst die Stimulation der intakten Amygdala Angst aus [Chapmann et al. 1954; Feindel und Penfield 1954].

Angst und Emotionen werden durch eine Vielzahl von Faktoren moduliert, aber es ist bekannt, dass das Corpus amygdaloideum eine wichtige Rolle dabei spielt [Ehrlich et al. 2009; Truitt et al. 2009; Adolphs et al. 1995; Phillips und LeDoux 1992]. Dabei tragen die einzelnen Kerne unterschiedlich zur Regulation von Emotionen und Verhalten bei

[Killcross et al. 1997]. Weitere, hier nicht untersuchte Regionen, die Angst und Emotionen modulieren sind: der Hippokampus [Lang et al. 2009; Knight et al. 2009; Nees und Pohlack 2014], der präfrontale Kortex [Davidson 2000, 2002], die Inselregion [Phan et al. 2004; Paulus und Stein 2006; Knight et al. 2009; Gasquoine 2014], der Nukleus striae terminalis [Walker et al. 2003; Davis 2006], der Nukleus accumbens [Barrot et al. 2005; Sturm et al. 2003], das periaquäduktale Grau [Jenck et al. 1995; Vianna et al. 2001] und das anteriore Cingulum [Thayer und Lane 2000; Davidson 2002]. Weiterhin wurde gezeigt, dass auch Neuropeptide auf emotionales Verhalten Einfluss nehmen. So vermittelt der zentrale Kern via Corticotropin-Releasing-Factor (CRF) exprimierender Neurone die Furcht-sensibilisierte akustische Schreckreaktion (Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response (FS-ASR)) [Fendt et al. 1997; Davis et al. 1988; Liang et al. 1992b,a], sowie Bewegungs- und Erkundungsverhalten [Lee und Tsai 1989; Liang und Lee 1988]. CRF ist bekannt für seine anxiogenen Effekte [Dunn und Berridge 1990; Stenzel-Poore et al. 1994; Smith et al. 1998]. Demgegenüber vermittelt der basolaterale Kern (BLA) Angst- und Erkundungsverhalten wie es im Open-Field oder im Elevated-Plus-Maze (EPM) gemessen wird [Amaral et al. 1992; Davis 1997; Pitkänen et al. 1997]. Der BLA spielt nicht nur eine wichtige Rolle im Angstverhalten sondern auch im eng damit verbundenen Sozialverhalten [Sajdyk et al. 2004]. Das Sozial- und Angstverhalten kann anhand des sozialen Interaktionstests beobachtet werden. Sowohl der BLA, als auch der zentrale Nukleus enthalten GABAerge Neurone und Interneurone [McDonald 1982], sowie Neuropeptid-Y(NPY)-exprimierende Interneurone [Heilig und Widerlöv 1995; Yilmazer-Hanke et al. 2002]. Mehrere Studien weisen für NPY anxiolytische Effekte nach [Heilig et al. 1994; Thorsell et al. 1998; Sajdyk et al. 2004]. Weitere Neuropeptide, die in Bezug auf Angstverhalten diskutiert werden, sind Oxytocin, Vasopressin, Urocortin, Substanz-P und Galanin [Kormos und Gaszner 2013].

## 1.3 Verhalten

Emotionalität ist die physiologische Verhaltenskomponente von Emotionen, sowie ein Maß der emotionalen Reaktivität auf einen Stimulus [Reber und Reber 2001]. Eine der Grundemotionen ist Angst. Diese ist ein unangenehmer Zustand innerer Unruhe, ein generalisiertes und unfokussiertes Gefühl der Besorgnis vor unbekanntem Geschehnissen [Seligman et al. 2001; Davison 2008; Bouras und Holt 2007]. Davon zu unterscheiden ist die Furcht, die eine Reaktion auf eine reale oder als solche wahrgenommene Gefahr ist

[American Psychiatric Association 2013]. Angst und Furcht lassen sich unterscheiden in der Dauer, im zeitlichen Bezug, in der Spezifität der Bedrohung und Konsequenz. Furcht ist von kurzer Dauer, auf die Gegenwart gerichtet, entsteht auf einen spezifischen Reiz hin und bahnt spezifische Reaktionen. Dahingegen ist Angst länger anhaltend, zukunftsgerichtet, diffus und fördert gesteigerte Vorsicht vor einer eher unspezifischen potenziellen Gefahr [Sylvers et al. 2011]. Angst kann angemessen und evolutionär sinnvoll sein (kann z.B. zu defensivem Verhalten oder Flucht führen), übersteigerte Angst jedoch kann zu einer Reihe von Erkrankungen führen wie beispielsweise der generalisierten Angststörung, Panikstörungen oder phobischen Störungen. Charles Spielberger etablierte die Unterscheidung der Angst als Charaktereigenschaft (trait anxiety) und als situationsbedingte Angst aktueller Zustandsbeschreibung (state anxiety) [Spielberger 1966]. Die Abbildung unterschiedlicher Dimensionen der Emotionalität, Angst und Furcht in den jeweiligen Versuchen macht es nötig, verschiedene Modelle zu verwenden.

### 1.3.1 Elevated-Plus-Maze

Das Elevated-Plus-Maze (EPM) ist ein bekanntes und etabliertes Modell um Angstverhalten zu untersuchen [Belzung und Griebel 2001; File 2001; Hogg 1996; Handley und Mithani 1984; Pellow et al. 1985]. Es beruht auf der Nagetieren angeborenen Vorliebe zu dunklen, geschlossenen Orten (Annäherung) und der unkonditionierten Angst vor Höhen und offenen Plätzen (Vermeidung) [Barnett 1975]. Kurz gefasst wird die Maus auf ein erhöhtes Plus-förmiges Labyrinth gesetzt mit einer Mitte und je zwei offenen und geschlossenen Armen (siehe Abbildung 1.1). Sogleich wird das Betreten der Arme und die darauf verbrachte Zeit dokumentiert. Bereits 1955 beschrieb Montgomery [Montgomery 1955] einen Y-förmigen Apparat mit erhöhten offenen und geschlossenen Bahnen, um den dadurch erzeugten Konflikt zwischen Annäherung und Exploration auf der einen Seite, sowie Vermeidung und Angst auf der anderen Seite zu untersuchen. Dieser wurde 1984 durch Handley und Mithani [Handley und Mithani 1984] zum einem erhöhten plus-förmigen Labyrinth mit zwei geschlossenen und zwei offenen Armen weiterentwickelt. Die Validierung des EPM erfolgte 1985 durch Pellow et al. [Pellow et al. 1985] für Ratten, sowie 1987 durch Lister et al. [Lister 1987] für Mäuse.

Zunächst stand die Möglichkeit der selektiven Untersuchung von anxiolytischen und anxiogenen Effekten von Medikamenten im Mittelpunkt. Durch verschiedene Verhal-

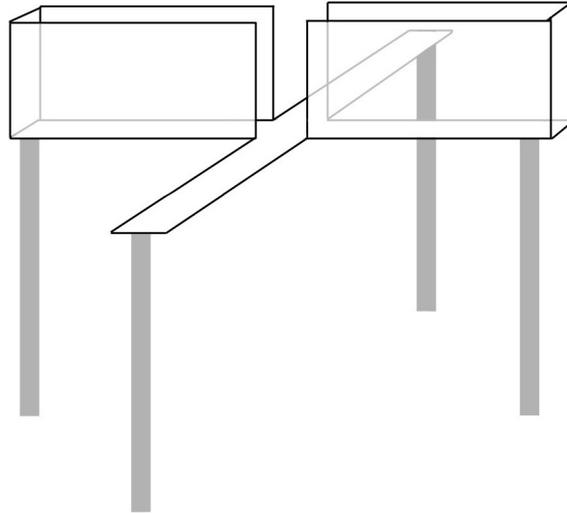


Abbildung 1.1: Skizze des Elevated-Plus-Maze

tenstests, pharmakologische und physiologische Tests, sowie Faktoranalysen wurde festgestellt, dass Angst und Lokomotion valide in unterschiedlichen Parametern des EPM abgebildet sind. Der Anteil [%], der auf den offenen Armen verbrachten Zeit (sowie die Häufigkeit [%] des Betretens der offenen Arme) ist der spezifischste Marker für Angstverhalten [File 2001; Lister 1987; Pellow et al. 1985; Rodgers und Johnson 1995]. Die absolute Anzahl des Betretens der geschlossenen Arme (bzw. etwas weniger spezifisch: aller Arme) ist eine Funktion der Aktivität [File 2001; Lister 1987; Pellow et al. 1985; Rodgers und Johnson 1995]. Die einfache, kosteneffiziente, wenig störanfällige und fehlerarme Durchführung sowie die Möglichkeit, selektiv unconditionierte Angst und lokomotorisches Verhalten untersuchen zu können, führte zur weiten Verbreitung des EPM.

### 1.3.2 Motility-Box

Eine weitere Möglichkeit, Angstverhalten basierend auf dem Explorationsverhalten zu untersuchen, ist die Motility-Box [Yilmazer-Hanke et al. 2002]. Die Motility-Box ist einem Open-Field-Test sehr ähnlich [Yilmazer-Hanke et al. 2002]. Sie erlaubt es, automatisiert angeborene Angst an sich frei bewegenden Tieren in einer unbekanntem Umgebung zu untersuchen [Archer 1973; Rodgers 1997]. Mithilfe der Motility-Box zeichnet man den Weg und die Zeit der lokomotorischen Aktivität auf. Diese Variablen werden primär beeinflusst durch den Konflikt zwischen der angeborenen Neugier und dem Erkundungsdrang der Tiere auf der einen Seite und der Vermeidung von potentiell gefährlichen,

anxiogenen Bereichen (das zentrale Feld) auf der anderen Seite. Weiterhin spielen Faktoren wie Thigmotaxis (das Bestreben, sich an einer Wand aufzuhalten) und lokomotorische Aktivität eine Rolle [Yilmazer-Hanke et al. 2002; Archer 1973; Rodgers 1997; Simon et al. 1994]. Die Messung der lokomotorischen Aktivität in der Motility-Box erfasst folglich Angst geäußert als Niveau explorativer Aktivität [Archer 1973; Rodgers 1997; Crawley und Davis 1982; Crusio et al. 1989]. Ursprünglich wurde der Open-Field-Test 1934 von Calvin Hall konzipiert mit der Defäkation als Maß der Emotionalität [Hall 1934]. Validierungsstudien mit Faktoranalysen belegen, dass die Variablen des Open-Field zwei Dimensionen untersuchen, Aktivität und Emotionalität/Angst [Denenberg 1969]. Aufgrund der einfachen Durchführbarkeit und Verständlichkeit ist der Test heutzutage weit verbreitet.

Trotz oder gerade wegen der weiten Verbreitung des Open-Field-Tests, sollte man die Aussage des Tests kritisch beleuchten [Walsh und Cummins 1976; Stanford 2007]. Ein wichtiger Kritikpunkt ist die große Variabilität hinsichtlich des Aufbaus des Testapparates (Material und Form), der Testzeit, der Umgebung (Störgeräusche, Beleuchtung, Anwesenheit des Untersuchers, etc) und des Handlings der Tiere. Diese führen zu teils widersprüchlichen Ergebnissen unterschiedlicher Arbeitsgruppen. Einerseits soll im Open-Field-Test das Verhalten in einer neuen unbekanntem Umgebung registriert werden. Andererseits wird bemängelt, dass viele Forscher nur einen Verhaltenstest durchführen [Walsh und Cummins 1976; Stanford 2007]. Dabei ist es aber wichtig zu beachten, dass sowohl Änderungen der lokomotorischen Aktivität emotionale Verhaltensparameter beeinflussen können, als auch eine veränderte Emotionalität Messungen lokomotorischer Aktivität verzerren kann [Royce 1977; Rodgers 1997]. Der Open-Field-Test allein kann bei diesen Parametern also nicht zwischen Ursache und Wirkung unterscheiden. Erst verschiedene Tests gemeinsam ermöglichen eine valide Aussage über das Verhalten der Tiere. Die Messung lokomotorischer Aktivität wird in einem kleineren Open-Field (wie es die Motility-Box darstellt) aufgrund der Reduktion beeinflussender emotionaler Faktoren als verlässlicher beschrieben [Goma und Tobeña 1978; Markel et al. 1989]. Allerdings sollte man dies auch bei der Bewertung der emotionalen Variablen, wie die im zentralen Bereich verbrachte Zeit, bedenken. Dennoch kann man generell davon ausgehen, dass Tiere, die sich länger im zentralen Bereich aufhalten, weniger ängstlich sind [Royce 1977; Rodgers 1997].

### 1.3.3 Soziale Interaktion

Der Verhaltenstest der sozialen Interaktion wurde von File und Hyde entwickelt und erstmalig 1978 beschrieben [File und Hyde 1978]. Bis zu dieser Zeit basierten Verhaltenstest zum Angstverhalten auf konditionierter Furcht und Futter- oder Wasserdeprivation oder Elektroschocks. Mit der Entwicklung und der Erforschung von Anxiolytika kam die Notwendigkeit valider und reliabler Verhaltenstests. File und Hyde entwickelten einen Test, bei dem das Sozial- und Explorationsverhalten zweier männlicher Ratten 10 min in einer 65x65 cm großen Box aufgezeichnet wurde [File und Hyde 1978]. Dabei variierten sie die Lichtverhältnisse und die Vertrautheit der Tiere mit der Box. Der Test funktioniert aufgrund der natürlichen Abneigung von Ratten gegenüber hellem Licht und unbekanntem Orten [File 1980] und untersucht das soziale Verhalten und die unkonditionierte Angst. Die wesentliche abhängige Variable hierbei ist die mit sozialer Interaktion verbrachte Zeit, eine natürliche Form des Verhaltens. Die Abnahme der Zeit sozialer Interaktion spricht für anxiogene Effekte, die Zunahme für anxiolytische Effekte. Mithilfe von Verhaltens-, pharmakologischer und physiologischer Tests wurde das Modell validiert [File und Hyde 1978; File 1980; File und Seth 2003]. Die Adaptation des Tests für Mäuse ist nicht trivial, da Mäuse (je nach Stamm) aggressiver als Ratten sind, insbesondere nach sozialer Isolation [Valzelli 1973]. Dennoch wurde die Abnahme sozialer Interaktion in mehreren Mäusestämmen bei Änderung der Lichtstärke ähnlich wie bei Ratten nachgewiesen [Angelis und File 1979; Lister und Hilakivi 1988]. Ausgenommen davon sind pharmakologische Studien, welche divers diskutiert werden [File und Seth 2003]. Weiterhin gibt es altersabhängige geschlechtsspezifische Unterschiede, denn erwachsene Weibchen zeigen weniger soziales Verhalten und reagieren weniger sensitiv auf die (fehlende) Adaptationszeit der Tiere an die Box [Johnston und File 1991].

### 1.3.4 Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response

Der Startle-Reflex ist das schnelle Zusammenzucken von Gesichts- und Körpermuskulatur durch einen plötzlichen, starken taktilen, visuellen oder akustischen Reiz (siehe Abbildung 1.2) [Koch 1999]. Er ist eine Schutzreaktion, die in allen Säugetieren und Menschen vorkommt [Landis et al. 1939]. Die akustische Startle-Reaktion (ASR) ist ein gut untersuchtes und etabliertes Modell um emotionale Antworten und sensomotorische Reaktivität und Plastizität zu untersuchen [Davis et al. 1993; Schwegler et al. 1997;

Shephard 1986; Koch 1999]. Die an der ASR beteiligten Neurone liegen im Hirnstamm, vor allem im kaudalen pontinen retikulären Nukleus. Daneben gibt es jedoch viele weitere modulierende Hirnareale [Yeomans und Frankland 1995; Koch 1999]. Die Stärke des ausgelösten Reflexes kann durch Faktoren beeinflusst werden, wie z.B. die Intensität des Reizes, Licht, Medikamente, genetische Unterschiede [Koch 1999]. Die ASR kann verstärkt werden durch konditionierte Furcht, unkonditionierte Sensibilisierung durch aversive Reize [Davis 1989; Davis et al. 1993] oder aber zahlreiche Pharmazeutika wie CRF [Liang et al. 1992a], Cholezystokinin (CCK) [Fendt et al. 1995] und Substanz P [Krase et al. 1994]. Die ASR kann aber auch abgeschwächt werden zum Beispiel durch Habituation oder Prepulsinhibition [Koch 1999].

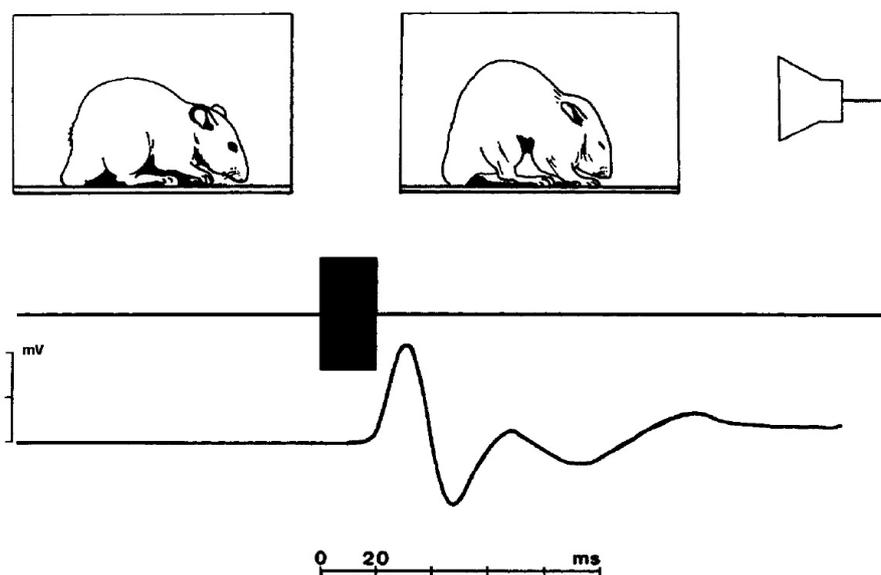


Abbildung 1.2: Der akustische Startle-Reflex einer Ratte (Abbildung aus Koch: The Neurobiology of Startle [Koch 1999]). Etwa 30 ms nach Beginn des akustischen Reizes erfolgt die akustische Startle-Reaktion. Die mechanische Reaktion wird umgesetzt in Spannung [mV].

Für die Furchtkonditionierung des ASR mittels elektrischen Fußschocks, also der FS-ASR-Versuch, spielt die Amygdala eine tragende Rolle [Hitchcock et al. 1989; Fendt et al. 1994; Ebert und Koch 1997]. Bei der FS-ASR führen wiederholt applizierte akustische Stimuli zu einer Habituation und Abnahme der Schreckreaktion. Nachdem negative Stimuli in Form von schwachen elektrischen Fußschocks appliziert werden, führen erneut applizierte akustische Stimuli zu einer verstärkten Schreckreaktion. Diese Erhöhung der Schreckreaktion erfolgt durch die Furchtkonditionierung nach den elektrischen

Fußschocks [Davis 1989]. Die ASR kann somit auch als Index der Reaktivität auf externe Stimuli betrachtet werden [Davis 1984]. Die morphologischen Grundlagen sind bekannt. LeDoux fasst es folgendermaßen zusammen: Der akustische Stimulus wird über das auditorische System an den Thalamus weitergegeben. Von dort erfolgt die extralemniskale Weiterleitung an den auditorischen Kortex, sowie die Weiterleitung über die posterioren Thalamusgebiete zur lateralen Amygdala. Einen weiteren Informationszufluss erhält die Amygdala über die sekundären Areale des auditorischen Kortex. Über die basolateralen (BLA) und basomedialen Kerngebiete (BMA) erfolgt die Weitergabe an den zentralen Kern (CEA) der Amygdala. Von dort werden über den Hypothalamus autonome Reaktionen und über das zentrale Höhlengrau das Verhalten gesteuert [LeDoux 1993].

## 1.4 Neurotrophine

Neben dem PRG1 sind weitere neurogene Plastizitätsfaktoren in der Amygdala die Neurotrophine, die ergänzend in dieser Arbeit untersucht werden. Neurotrophine tragen wesentlich zur neuronalen Differenzierung, zum Überleben, Wachstum und zur Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) bei [Allen und Dawbarn 2006]. Dies wird auch als Neurogenese bezeichnet, deren Bedeutung für das Lernen und das Gedächtnis in den letzten Jahren herausgestellt wurde [Neves et al. 2008; Clarke et al. 2000] und ebenfalls in der Amygdala beschrieben wird [Bernier et al. 2002]. Die Neurotrophinspiegel von NGF, BDNF und NT-3 korrelieren in der Amygdala und im Hippokampus mit Angst- und Furchtverhalten in Mäusen [Yee et al. 2007].

Die Neurotrophine Nerve-Growth-Factor (NGF), Brain-Derived-Neurotrophic-Factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) binden hoch-affine Tyrosinkinase-Rezeptoren (TrkA, TrkB, TrkC) oder den wenig affinen Rezeptor p75. Neben anderen Effekten im peripheren Nervensystem, dient NGF als Überlebensfaktor für cholinerge Neurone [Ebendal 1989]. NGF ist der erste beschriebene Nervenwachstumsfaktor [Levi-Montalcini et al. 1954] und interagiert mit dem TrkA-Rezeptor sowie dem p75-Rezeptor. Die Steuerung der NGF-Signale wird in vielen klinischen Fragestellungen diskutiert, zum Beispiel hinsichtlich des Morbus Alzheimer, Entzündungsschmerzen oder Asthma bronchiale, und ist Gegenstand der ZNS-Forschung [Allen und Dawbarn 2006]. BDNF kommt sowohl im zentralen Nervensystem als auch in anderen Geweben vor. Es aktiviert spezifische Neurone u.a. in der Amygdala, im Hippocampus, Kortex,

Zerebellum und im basalen Vorderhirn [Yamada und Nabeshima 2003]. Es wird als eine sehr wichtige Substanz in der Neurogenese beschrieben, als Vehikel der neuronalen Plastizität. BDNF induziert neuronales Überleben, Wachstum und Differenzierung via TrkB- und p75-Rezeptor [Patapoutian und Reichardt 2001]. Viele Untersuchungen bringen das verringerte oder erhöhte Vorkommen von BDNF mit Krankheiten in Verbindung wie zum Beispiel Schizophrenie [Xiu et al. 2009], Bulimia nervosa [Kaplan et al. 2008], Anorexia nervosa [Mercader et al. 2007], Zwangsstörungen [Maina et al. 2010], Rett-Syndrom [Zeev et al. 2009] und Chorea major [Zajac et al. 2010]. Der dritte untersuchte Wachstumsfaktor ist das Neurotrophin-3. Dieses kann ebenfalls an den wenig affinen Neurotrophinrezeptor p75 binden. Im Gegensatz zu NGF und BDNF interagiert NT-3 vor allem mit TrkC, kann jedoch an alle drei Trk-Rezeptoren, TrkA, B und C binden. NT-3 unterstützt das Wachstum und die Differenzierung bestehender Neurone und fördert die Entwicklung und Differenzierung neu entstehender Neurone im zentralen Nervensystem, vor allem sensorischer Neurone [Tessarollo et al. 1994; Maisonpierre et al. 1990]. Neben NGF, BDNF ist auch NT-3 in der Amygdala [Altar et al. 1993] nachgewiesen.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die physiologische Rolle des PRG1 in der Amygdala zu erforschen. Dazu wurden transgene homo- und heterozygote Mäuse verwendet, bei denen das Gen für PRG1 deaktiviert wurde, sowie deren Wildtypwurfgeschwister. In vorhergehenden Studien wurden Effekte der PRG1-Defizienz auf den Hippokampus gezeigt, es sind jedoch nur wenige Informationen über andere Hirnregionen bekannt. Aufgrund der Beobachtungen [Trimbuch et al. 2009] devianten Verhaltens lag die Frage nahe, wie genau der Einfluss der PRG1-Defizienz auf das Verhalten ist und welche morphologischen Veränderungen damit einhergehen. Eine weitere Dissertation beschäftigt sich mit dem Lernverhalten und dessen morphologisches Korrelat, dem Hippokampus. Die vorliegende Arbeit ist auf das Angstverhalten fokussiert und welche morphologischen Veränderungen sich in der Amygdala ergeben. Hierfür durchliefen die Mäuse eine Serie von Verhaltens-tests. In der Motility-Box wurde die lokomotorische Aktivität, Exploration, Angst und die räumliche Orientierung untersucht. Noch spezifischere Aussagen zur Angst lassen sich anhand des EPM ableiten. Die FS-ASR erlaubt die Untersuchung Furcht-bezogener emotionaler Antworten. Auch der Test der sozialen Interaktion lässt indirekt durch das

Sozialverhalten Rückschlüsse auf das Angstverhalten zu.

Im Anschluss an die Verhaltensversuche wurden die Tiere getötet, die Gehirne entnommen, weiter verarbeitet, analysiert und die Ergebnisse ausgewertet. Sowohl ein anxiolytischer Faktor, das NPY [Sajdyk et al. 2004], als auch ein anxiogener Faktor, das CRF [Dunn und Berridge 1990; Stenzel-Poore et al. 1994; Smith et al. 1998] wurden untersucht. Es wurde die Zelldichte NPY- und Parvalbumin-immunpositiver Neurone, als Subgruppe GABAerger Neurone, quantifiziert. CRF wurde mittels Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) analysiert. Zudem stellte sich die Frage nach der möglichen Interaktion von PRG1 mit anderen neurogenen Plastizitätsfaktoren, den Neurotrophinen NGF, BDNF und NT-3. Dazu wurde sowohl die absolute Menge der Proteine in der Amygdala via ELISA bestimmt, als auch deren Expression untersucht mittels Bestimmung der mRNA via quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR). Die Untersuchungen fanden in allen drei Versuchsgruppen statt (Wildtypen, hetero- und homozygote PRG1-defiziente Tiere).

Zusammenfassend soll diese Dissertation folgende Fragen behandeln:

1. Beeinflusst die PRG1-Defizienz das Verhalten, insbesondere das Angst- und Furchtverhalten?
2. Gibt es Veränderungen im GABAergen System in der Amygdala?
3. Verändert das Fehlen von PRG1 die Bildung von NPY-Neuronen und die CRF-Synthese in der Amygdala?
4. Erfolgt in der Amygdala eine Interaktion mit der Expression der Neurotrophine NGF, BDNF und NT-3?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Es wurden sechsundvierzig weibliche Mäuse über die Charité Universitätsmedizin Berlin (Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin) bezogen. Die Generierung der Stämme der achtzehn Knockout-Mäuse (KO), der achtzehn Wildtypen (WT) und zehn heterozygoten (HE) Mäuse wird an anderer Stelle ausführlich beschrieben [Trimbuch 2009]. Hier in Kürze zusammengefasst: Die konstitutiven Knockout-Mäuse wurden erzeugt, indem die Exons 4 bis 5 des PRG1 mit einer IRES- $\beta$ -Gal-Neo-Cassette ersetzt wurden. Danach züchteten die Kooperationspartner in Berlin die genetisch veränderten Mäuse mit C57Bl/6-Mäusen weiter und führten ebenfalls die Genotypisierung durch.

Die Tiere wurden nach Ankunft einzeln in transparenten Käfigen mit einem 12/12 Stunden hell/dunkel Zyklus sowie Nahrung und Wasser ad libitum gehalten. Die Einzelhaltung war nötig zur Vorbereitung weiterer Verhaltensuntersuchungen (räumliches Lernen mit Radiallabyrinth) und weil die Tiere teilweise aggressives Verhalten in der Box zeigten. Alle Tests fanden während der Lichtphase statt. In einem Alter von 22-29 Wochen fand zuerst der Elevated-Plus-Maze-Test statt. Neun Wochen später folgte die Untersuchung in der Motility-Box und weitere zwei Wochen später der soziale Interaktionstest. Als viertes absolvierten die Tiere den Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response-Test wiederum vier Wochen nach dem dritten Test. Alle Versuche erfolgten in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Bestimmungen (European Comm. Council Direction 86/609/EEC; Tierschutzgesetz; genehmigt durch das Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt, Aktenzeichen: 42502-2-966 UniMD).

## 2.2 Verhalten

Alle Versuche erfolgten randomisiert und verblindet in einem eigens dafür eingerichteten Raum. Nach dem Transport hatten die Tiere mindestens 14 Tage zur Eingewöhnung an die neue Umgebung. Die Tiere wurden vor den Versuchen alle gleich behandelt. In ihren Haltungskäfigen wurden die Mäuse stressarm in den Versuchsraum transportiert mit anschließender Adaptationszeit von mindestens 30 Minuten vor jedem Versuch. Während der Untersuchungen gab es keinerlei Beeinflussung der Tiere, wie zum Beispiel durch Störgeräusche. Bei den Versuchen Motility-Box, Soziale Interaktion und Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response verbarg sich die Untersucherin während der Tests hinter einer Wand, lediglich beim EPM saß sie in ca. 2 m Entfernung an der immer gleichen Position. Alle Tests fanden in der Zeit zwischen 09:00-17:00 Uhr statt.

### 2.2.1 Elevated-Plus-Maze

Das Elevated-Plus-Maze besteht aus zwei offenen (5x30 cm) und zwei geschlossenen Armen mit 40 cm hohen Wänden (5x30 cm), sowie einem Zentrum (5x5 cm). Es wurde aus weiß beschichtetem Holz 75 cm über dem Boden gebaut. Die Beleuchtung über dem Plus-Maze beträgt ca. 60 lx in jedem Arm. Unmittelbar vor der Untersuchung jedes Tieres wurde es gereinigt. Die Mäuse wurden einzeln, mit der immer gleichen Ausrichtung auf einen offenen Arm, in das Zentrum gesetzt und danach nicht weiter beeinflusst. Die Anzahl und Zeit des Betretens der offenen und geschlossenen Arme, sowie die Zeit in dem Zentrum wurden computerunterstützt mit einem selbstgeschriebenen Programm (Dipl.-Ing. C. Kurtz, Institut für Anatomie, Magdeburg, Deutschland) aufgezeichnet. Als Betreten eines Armes wurde gewertet, wenn alle vier Pfoten auf dem Arm waren. Die Anzahl der Besuche auf den offenen und die Anzahl der Besuche auf den geschlossenen Armen werden zur Aktivität addiert. Zudem wird die Zeit in Prozent errechnet, die die Tiere jeweils auf den offenen und geschlossenen Armen verbracht haben. Die Zeit pro Armbesuch für die geschlossenen Arme, offenen Arme und das Zentrum ergibt sich aus der jeweiligen Zeit dividiert durch die Anzahl der Armbesuche. Jeweils zehn Mäuse pro Gruppe (HO, WT und HE) wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen je 10 Minuten getestet (Test 1 und 2).

### **2.2.2 Motility-Box**

Die Apparatur (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) besteht aus einem Würfel (45x45x45 cm) und einer abnehmbaren Abdeckung aus transparentem Plexiglas. In einem Metallträger befinden sich außenliegend 15 Infrarotsensoren in einem Abstand von 2,8 cm. Diese erfassen die Koordinaten und Bewegung der Tiere in x- und y-Richtung. Mithilfe einer Software (Moti-Test-System, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) war daher die exakte Aufzeichnung der Laufstrecke über die Testzeit von 15 Minuten möglich. Zehn Mäuse je Versuchsgruppe wurden einzeln in die Mitte auf den Boden gesetzt, der Deckel geschlossen und die Aufzeichnung gestartet. Danach wurden die Mäuse sofort der Box entnommen und diese gereinigt.

### **2.2.3 Soziale Interaktion**

Dieser Versuch fand in einem Open-Field, einem offenen grauen Kunststoffkasten (85x85 cm) mit 30 cm hohen Wänden statt. Eine indirekte gleichmäßige Beleuchtung liefert ca. 240 lx in der Arena. Nach dem Reinigen wurden zwei Mäuse in gegenüberliegende Ecken gesetzt und deren Verhalten für 10 Minuten mit einer kalibrierten Kamera (Panasonic CCTV Modell WV-BL200/6) aufgezeichnet, mittels eines Panasonic SD 430 Videorekorders gespeichert und mithilfe einer Software (VideoMot2 Vers. 5.4, TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) am PC ausgewertet. Die Aufzeichnung erfasste die Anzahl und Dauer der Kontakte in den unterschiedlichen Bereichen der Arena - Ecken, Seiten und Mitte. Die Auswahl der Testpaare erfolgte nach Gruppen getrennt und randomisiert. Es standen 18 HO und 18 WT Mäuse zur Verfügung (je 9 Paare), sowie 8 Mäuse der Heterozygoten (4 Paare).

### **2.2.4 Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response**

Das System der akustischen Schreckreaktion besteht aus einer schalldichten Kammer (100x80x60 cm). In der spärlich beleuchteten Kammer (Kaltlicht, 5 W) ist ein Drahtkäfig (8x5x5,5 cm) auf einer piezoelektrischen Plattform (Piezo-Amp-System, Universität Tübingen, Deutschland). Dieses Messgerät registriert die Bewegungen der Maus nach Reizapplikation und wandelt sie in Spannungen um, welche dann digitalisiert und wei-

terverarbeitet werden. Auf dem Boden des Käfigs befindet sich ein Edelstahlgitter mit 0,5 cm Abstand zur Applikation elektrischer Fußschocks (1 mA, 500 ms). Akustische Stimuli (10 kHz, 100 dB, 20 ms, 0,4 ms Anstieg/Abfall) wurden von einem digitalen Generator erzeugt und über einen Lautsprecher im Abstand von 49 cm vom Käfig präsentiert. Die Reize wurden überlagert von einem Hintergrundrauschen (2-40 kHz, 55 dB, Dauergeräusch). Es wurden zwei identische Kammern verwendet und die Mäuse verblindet und randomisiert darauf verteilt. Vor jedem Versuch wurde die Apparatur gereinigt, die Maus gewogen und dann in den Käfig gesetzt. Nach einer Adaptionszeit von 5 Minuten wurden 4x10 akustische Stimuli im 30-Sekunden-Takt dargeboten (Block 1-4). Um die Angstsensibilisierung auszulösen, wurde zehn Sekunden nach dem 40. Ton zehn elektrische Fußschocks im Intervall von einer Sekunde appliziert. Weitere zehn Sekunden nach dem letzten Schock erhielten die Tiere erneut 3x10 akustische Stimuli (Block 5-7). Je zehn Mäuse pro Gruppe wurden in diesem Versuch eingesetzt.

## 2.3 Immunhistochemie

Nach den Verhaltenstests wurden je neun Gehirne der Gruppen HO und WT, sowie vier Gehirne der HE-Gruppe für die Immunhistochemie aufbereitet, um die GABAergen (Parvalbumin, PV) und Neuropeptid-Y(NPY)-haltigen Neurone sichtbar zu machen. Dazu wurden die Mäuse mit 0,15 ml 6 % Pentobarbital-Natrium (entspricht 300-350 ng/Kg Körpergewicht) intraperitoneal tief anästhesiert und transkardial mit phosphatgepufferter Natriumchloridlösung (0,1 M, pH 7,4, 0,9 %; 2 Minuten) gefolgt von 4 % Paraformaldehyd mit Pikrinsäure (12 Minuten) perfundiert. Die Gehirne wurden umgehend entfernt, zwei bis vier Stunden nachfixiert, bei -48 °C in Methylbutan weggefroren (Lagerung bei -80 °C) und am Kryostaten in vier Serien à 40 µm frontal geschnitten. Zwei Serien wurden der Immunhistochemie zugeführt. Dafür wurde in einer Serie ein monoklonaler Maus-Anti-PV-Antikörper (SWant; Bellinzona, Switzerland), 1:5000 in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 zum Nachweis GABAerger Neurone verwendet. In einer weiteren Serie kam ein polyklonaler Kaninchen-Anti-NPY-Antikörper (GeneTex; Irvine, USA), 1:16000 in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 für die NPY-haltigen Neurone zum Einsatz. Jeweils ein biotinylierter sekundärer Antikörper (Anti-Maus für den PV-Nachweis, bzw. Anti-Kaninchen für den NPY-Nachweis; Biozol Diagnostika; Eching, Deutschland), sowie ein Avidin-Biotin-Komplex (ABC Elite, Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, USA) mit Diaminobenzidin als Farbstoff wurden eingesetzt. Eine Serie wurde zur Übersicht

und anatomischen Orientierung nach Nissl gefärbt (modifizierte Nissl-Schnellmethode mit Kresylechtviolett [Weilenmann 1989]). Die Messung der Flächen der Kerngebiete wurde ebenfalls an diesen Schnitten vorgenommen (die detaillierten Protokolle sind im Anhang nachzulesen).

## 2.4 Quantifizierung

Die PV- und NPY-immunpositiven Neurone wurden in jedem vierten Schnitt (=eine Serie) in der gesamten linken Amygdala gezählt. Zentrale und basomediale Kerngebiete wurden getrennt ausgewertet, basolaterale und laterale Kerngebiete wurden gemeinsam analysiert. Bei hoher Vergrößerung (400 fach) wurde verblindet an einem Axioplan-Mikroskop (Carl Zeiss; Oberkochen, Deutschland) gezählt, sowie an digitalisierten Abbildungen die Flächen pro Region ermittelt. Die Bilder wurden via Kamera (Spot RT Slider; Diagnostic instruments inc., Sterling Heights, USA) und PC-Programm (Axio-Vision Rel. 4.6; Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Zur Orientierung wurde der Atlas „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates“ von George Paxinos und Keith B. J. Franklin, 2. Auflage, verwendet [Paxinos und Franklin 2001].

## 2.5 Proteine

### 2.5.1 Protein-Isolation

Von jeder Tiergruppe wurden sechs Mäuse im Alter von  $42 \pm 0,8$  (SEM) Wochen dekapiert, deren Gehirn freigelegt und die linke Amygdala zur Proteinbestimmung, die rechte Amygdala für die RNA-Extrahierung präpariert (siehe Kapitel 2.7.1). Die linke Amygdala wurde rasch in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Proteinextrahierung wurde nach Herstellerangaben mittels 10 mM phosphatpufferhaltigem 0,2 % Nonidet-P-40 (NP40) pH 7,2 als Extraktionslösung durchgeführt. Hierzu wurde das Gewebe in Plastiktubes gewogen und in 30 fachem Volumen der Extraktionslösung in einem Eisbad homogenisiert (10.000 rpm/min). Das Homogenisat wurde bei 4 °C zentrifugiert (15.000 rpm/min, 20 min) und der Überstand aufgenommen. Die Proben wurden in Testtubes mit je 50 µl bei -80 °C bis zum Assay tiefgefroren.

## 2.5.2 Bradford-Test

Für die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Amygdala kam der Bradford-Test nach Marion Bradford zum Einsatz [Bradford 1976]. Bei dieser Methode bildet der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 mit Proteinen Komplexe, dabei verschiebt sich das Maximum des Absorptionsspektrums von 470 nm zu 595 nm und wird dann unverzüglich photometrisch gemessen. Der Standard zur Kalibrierung sowie die Proben wurden in doppelter Ausführung aufgetragen. Als Standardprotein kam bovines Serumalbumin (BSA; Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland) und als Farbstoff kam Roti Quant (Coomassie-Brilliant-Blau G-250, Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland) zur Einsatz.

## 2.5.3 Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay

Für die Proteinbestimmung der verschiedenen Neurotrophine wurden die EmaxR-Immuno-Assay-Systeme der Promega Cooperation (Promega Cooperation, Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden 96-well-ELISA-Platten verwendet. Für den CRF-ELISA wurde ein hoch sensitives ELISA-Kit von Cosmobio (Tokio, Japan) genutzt.

CRF-ELISA Zuerst wurde die mit Antikörpern beschichtete ELISA-Platte gewaschen und die Reagenzien, sowie die Proben behutsam auf Zimmertemperatur gebracht. Dann wurden die Pufferlösung, die Standardlösung und die Proben in die Vertiefungen der Platte eingebracht und bei Zimmertemperatur für vier Stunden inkubiert. Nach dem anschließenden Waschen wurde die markierte Antikörperlösung dazu pipettiert und erneut für zwei Stunden inkubiert. Danach wurde wieder gewaschen, Streptavidin-Meerrettichperoxidase(SA-HRP)-Lösung für eine Stunde dazu gegeben und erneut gewaschen. Nun wurde die Tetramethylbenzidin(TMB)-Lösung pipettiert und lichtdicht bei Zimmertemperatur für 30 Minuten belassen. Nach dem Hinzufügen der Stopplösung wurde die optische Absorption mit einem Sunrise-Photometer (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 450 nm gemessen.

BDNF-ELISA Die ELISA-Platte wurde über Nacht bei 4 °C mit einem monoklonalen Anti-BDNF-IgG-Antikörper (1:1000) beschichtet. Es wurde mit TBST-Waschpuffer (20 mM Tris HCl (pH 7,6), 150 mM 0,9 % NaCl, 0,05 % Tween 20) gewaschen und mit

Block-&-Sample-Puffer blockiert und für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschen wurden die Proben verdünnt in dreifacher Ausführung aufgetragen und wieder zwei Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Es folgte das Waschen und das Pipettieren des polyklonalen Anti-BDNF-IgY-Antikörpers (1:500), sowie eine Inkubationszeit desselben von zwei Stunden. Danach wurde gewaschen und das Meerrettichperoxidase-Konjugat (1:200) dazu pipettiert und für eine Stunde belassen. Für die Farbentwicklung wurde TMB Lösung hinzugefügt und die Reaktion nach zehn Minuten mit 1 N Salzsäure gestoppt. Der Farbumschlag erfolgte von blau zu gelb. Die Absorption wurde photometrisch bei 450 nm gemessen (Sunrise Photometer; Tecan, Männedorf, Schweiz). Ebenso wurde eine Standardkurve (0-500 pg/ml) mit im Kit enthaltenem BDNF-Standard nach Protokoll hergestellt.

NT-3-ELISA Die ELISA-Platte wurde über Nacht bei 4 °C mit einem polyklonalen Anti-NT-3-IgY-Antikörper (1:500) beschichtet. Es wurde mit TBST-Waschpuffer (20 mM Tris HCl (pH 7,6), 150 mM 0,9 % NaCl, 0,05 % Tween 20) gewaschen und mit Block-&-Sample-Puffer blockiert und für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschen wurden die Proben verdünnt, in dreifacher Ausführung aufgetragen und anschließend sechs Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Es folgte das Waschen und das Pipettieren des monoklonalen Anti-NT-3-Antikörpers (1:4000), sowie eine Inkubationszeit über Nacht bei 4 °C. Danach wurde gewaschen und das Meerrettichperoxidase-Konjugat (1:100) dazu pipettiert und für 2,5 Stunden belassen. Es folgte erneut das Waschen. Für die Farbentwicklung wurde TMB-Lösung hinzugefügt und die Reaktion nach 15 Minuten mit 1 N Salzsäure gestoppt. Der Farbumschlag erfolgte von blau zu gelb. Die Absorption wurde photometrisch bei 450 nm gemessen (Sunrise Photometer; Tecan, Männedorf, Schweiz). Ebenso wurde eine Standardkurve (0-300 pg/ml) mit im Kit enthaltenen NT-3-Standard nach Protokoll hergestellt.

NGF-ELISA Die ELISA-Platte wurde über Nacht bei 4 °C mit einem polyklonalen Anti-NGF-Antikörper (1:1000) beschichtet. Es wurde mit TBST-Waschpuffer (20 mM Tris HCl (pH 7,6), 150 mM 0,9 % NaCl, 0,05 % Tween 20) gewaschen und mit Block-&-Sample-Puffer blockiert und für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren Waschen wurden die Proben verdünnt, in dreifacher Ausführung aufgetragen und anschließend sechs Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Es folgte das Waschen und das Pipettieren des monoklonalen Anti-NGF-Antikörpers (1:4000), sowie eine Inkubationszeit über Nacht bei 4 °C. Danach wurde gewaschen und das Meerrettichperoxidase-Konjugat (1:100) dazu pipettiert und für 2,5 Stunden belassen. Es folgte erneut das Waschen. Für

die Farbentwicklung wurde TMB-Lösung hinzugefügt und die Reaktion nach zehn Minuten mit 1 N Salzsäure gestoppt. Der Farbumschlag erfolgte von blau zu gelb. Die Absorption wurde photometrisch bei 450 nm gemessen (Sunrise Photometer; Tecan, Männedorf, Schweiz). Ebenso wurde eine Standardkurve (0-250 pg/ml) mit im Kit enthaltenen NGF-Standard nach Protokoll hergestellt.

## 2.6 RNA

### 2.6.1 RNA-Isolation für qRT-PCR

Je Versuchsgruppe wurden sechs Mäuse im Alter von  $42 \pm 0,8$  (SEM) Wochen dekapitiert, die Gehirne frei gelegt und die rechte Amygdala der RNA-Extrahierung zugeführt. Die RNA im Gewebe wurde mittels RNA-later Lösung (250  $\mu$ l, Ambion, Austin, Texas, USA) über Nacht stabilisiert sowie nachfolgend bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Von jeder Probe wurde die Gesamt-RNA isoliert mit der Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extrahierungsmethode nach der Referenzveröffentlichung von Chomczynski und Sacchi (1987; Protokoll siehe Anhang). 1,5  $\mu$ g RNA wurde für die Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) verwendet. Die cDNA wurde via Denaturierung und reverser Transkription mithilfe eines Oligo-dT-Primers und eines kommerziellen Sets (Revert Aid First Strand cDNA synthesis kit; Fermentas, Waltham, USA) nach Herstellerangaben synthetisiert. Die cDNA jeder Probe wurde als Matrize für die folgende PCR und real-time-PCR Analysen verwendet.

### 2.6.2 Quantitative real-time-PCR-Reaktion

Die Vervielfältigung der cDNA via quantitativer PCR erfolgte in einem Bio-Rad iCycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) mit gen-spezifischen Primern und dem Maxima SYBR® Green Mastermix (Fermentas, Waltham, USA). Die BDNF-mRNA-Primer-Sequenzen waren 5' tgt ctg gcg gga cgg tca ca 3' (vorwärts) und 5' gcc cct gca gcc ttc ctt gg 3' (rückwärts). Die NT-3-mRNA-Primer waren 5' atg att gca acg gac aca ga 3' und 5' aaa ggg gtg ctg tca ctc ag 3'. Für CRF wurden folgende Primer verwendet: 5' ggg aga ggc ggt cgg agg ag 3' (vorwärts) und 5' tgc tet gcc cgg gcc att tc 3' (rückwärts).

Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als interne Kontrolle (sog. housekeeper-Gen) verwendet und wurde mit folgenden Primern vervielfältigt: 5' ctt cac cac cat gga gaa ggc 3' und 5' ggc atg gac tgt ggt cat gag 3'. Das Referenzgen wurde zum Normieren des mRNA-Gehalts zwischen den unterschiedlichen Proben verwendet, um einen exakten Vergleich zu ermöglichen. Die Menge an mRNA wurde errechnet durch das Teilen des jeweiligen Probenwertes durch den Wert von GAPDH. Das Volumen des PCR-Ansatzes betrug 25  $\mu$ l: 12,5  $\mu$ l Maxima SYBR® Green Mastermix, 2,5  $\mu$ l vorwärts-Primer (6 pmol/ $\mu$ l für GAPDH, BDNF, NT3) und 2,5  $\mu$ l rückwärts-Primer (3 pmol/ $\mu$ l für GAPDH, 9 pmol/ $\mu$ l für BDNF und NT3), 1  $\mu$ l cDNA Matrize (1:20) und 6,5  $\mu$ l Wasser (Ampuwa® ; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland). Die unterschiedlich eingesetzten Molaritäten der Primer wurden mittels Primermatrix ermittelt. Die Temperaturverläufe der Vervielfältigungszyklen basierten auf einem drei-stufigen Protokoll mit einer Annealing-Temperatur (Primerhybridisierung) von 60 °C. Die Bestimmung des Zyklus-schwellenwertes ( $C_T$ ) erfolgte automatisch durch den Apparat. Der Zyklusschwellenwert ( $C_T$ ) ist dabei am Beginn der logarhythmischen Phase der Amplifikation festgelegt. Die Differenz zwischen den  $C_T$ -Werten von Referenzgen und Probe ergibt die relative Expression der jeweiligen mRNA in der Probe ( $\Delta C_T$ -Werte). Alle Proben und Standards wurden in dreifacher Ausführung bestimmt. Eine Schmelzkurve sicherte die spezifische Vervielfältigung. Die relative Expression wurde mittels  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode errechnet um die relative Menge (relative quantity RQ %) der Ziel-mRNA relativ zur Kontrolle (WT) zu erhalten (auf 100 % gesetzt).

## 2.7 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Computerprogramm SPSS Version 17 genutzt. Mit Unterstützung durch das Institut für Biometrie, OvGU Magdeburg, erfolgte eine Auswertung mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), mit der nach signifikanten Unterschieden zwischen allen drei Gruppen gemeinsam gesucht werden kann sowie anschließenden Post-Hoc-Tests. Die Homogenität der Varianzen wurde geprüft und im Falle der Nichthomogenität schloss sich der Welch-Test an. Bei der Auswertung des Elevated-Plus-Maze wurde zum Vergleich von Test 1 und 2 innerhalb der jeweiligen Gruppe der t-Test für abhängige Stichproben verwendet. Ein p-Wert von  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant definiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Verhalten

#### 3.1.1 Elevated-Plus-Maze

Das Elevated-Plus-Maze erlaubt Aussagen primär über die Angst, aber auch die Aktivität der Tiere. Zusätzlich wurde der Test ein zweites Mal durchgeführt an aufeinanderfolgenden Tagen (Test 1 und Test 2), um die Stabilität des Angstniveaus zu untersuchen. Die Auswertung der Versuche (je Gruppe  $n = 10$ ) mittels einfaktorieller Varianzanalyse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Wildtypen (WT), heterozygoten (HE) und homozygoten (HO) PRG1-defizienten Mäusen. Insgesamt zeigten die homozygot PRG1-defizienten Mäuse wesentlich weniger Angst und eine höhere Aktivität in den Post-Hoc-Tests. Die Heterozygoten verhielten sich ähnlich wie die Wildtypen (siehe Abbildung 3.1a und 3.2a).

Im Test 1 am ersten Tag waren die Tiere der HO-Gruppe häufiger auf den offenen Armen ( $p < 0,001$ ) und auf den geschlossenen Armen ( $p = 0,063$ ). Die Homozygoten waren zudem für eine kürzere Zeit auf den geschlossenen Armen ( $p < 0,001$ ) und länger auf den offenen Armen ( $p < 0,01$ ). Somit liegt ihre Aktivität (n gesamt) deutlich höher als die ihrer Wurfgeschwister ( $p < 0,001$ ). Untersucht man die Prozente der Zeit, die die HO auf den offenen Armen verbrachten in Bezug auf die Gesamtzeit, sieht man, dass die Homozygoten etwa zehnmal länger auf den offenen Armen waren. Dies ist ein spezifischer Marker für reduzierte Angst (siehe Tabelle 3.1 und 3.3). Die Post-Hoc-Tests zeigten, dass die Unterschiede vor allem zwischen den Wildtypen und Homozygoten, sowie zwischen Homozygoten und Heterozygoten liegen. Die Heterozygoten verhalten sich ähnlich wie die Wildtypen (ausgenommen die Zeit im Zentrum; siehe Tabelle 3.5).

Die Ergebnisse im Test 2 am zweiten Tag waren sehr ähnlich (siehe Tabelle 3.2). Lediglich für die Anzahl des Betretens der geschlossenen Arme und für die Zeit je Besuch im Zentrum wurde keine Signifikanz in der ANOVA nachgewiesen (siehe Tabelle 3.4), weil sich Wildtypen und Heterozygoten so ähnlich verhielten. Wie man in den Post-Hoc-Tests erkennen kann (siehe Tabelle 3.6), unterscheiden sich beide Gruppen signifikant von den Homozygoten (hier auch in der Zeit im Zentrum).

Der Vergleich von Test 1 und 2 innerhalb der Gruppen mittels t-Test für abhängige Gruppen ergab, dass die Wildtypen im zweiten Test signifikant weniger Zeit auf den offenen Armen verbracht haben ( $p = 0,055$ ) und kürzer je Besuch auf den offenen Armen waren ( $p = 0,039$ ). Die Heterozygoten verbrachten am zweiten Tag signifikant mehr Zeit auf den geschlossenen Armen ( $p = 0,013$ ), weniger Zeit im Zentrum ( $p = 0,013$ ) und dementsprechend auch weniger Zeit je Besuch im Zentrum ( $p = 0,001$ ). Die Homozygoten zeigten keine signifikanten Veränderungen zwischen Tag 1 und 2 (siehe Tabelle 3.7).

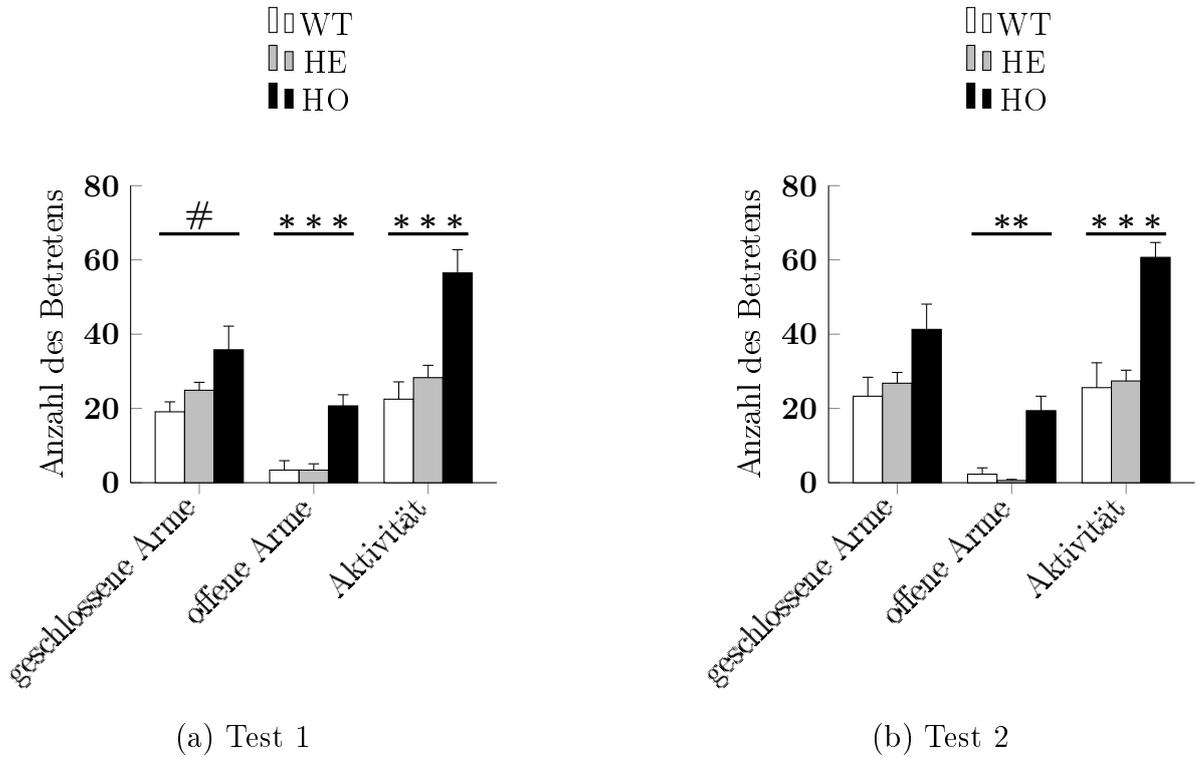


Abbildung 3.1: Elevated-Plus-Maze-Test: Vergleich der Anzahl des Betretens der offenen, geschlossenen und aller Arme (=Aktivität) über die drei Versuchsgruppen Wildtypen, heterozygote und homozygote Knockout-Mäuse (je Gruppe  $n = 10$ ) in Test 1 und 2. Der Versuch zeigt jeweils, dass die HO-Mäuse signifikant häufiger auf allen Armen im EPM sind. Dies ist besonders auf das Betreten der offenen Arme zurückzuführen. D.h. HO-Mäuse haben eine signifikant höhere Aktivität ((a) ANOVA Test 1: # :  $p = 0,063$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$  und (b) ANOVA Test 2: \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ). In den Post-Hoc-Tests wird für Test 1 und 2 nachgewiesen, dass sich die Heterozygoten nicht von den Wildtypen unterscheiden ( $p > 0,05$ ), während sich beide Gruppen jeweils signifikant von den Homozygoten unterscheiden ( $p < 0,001$ ).

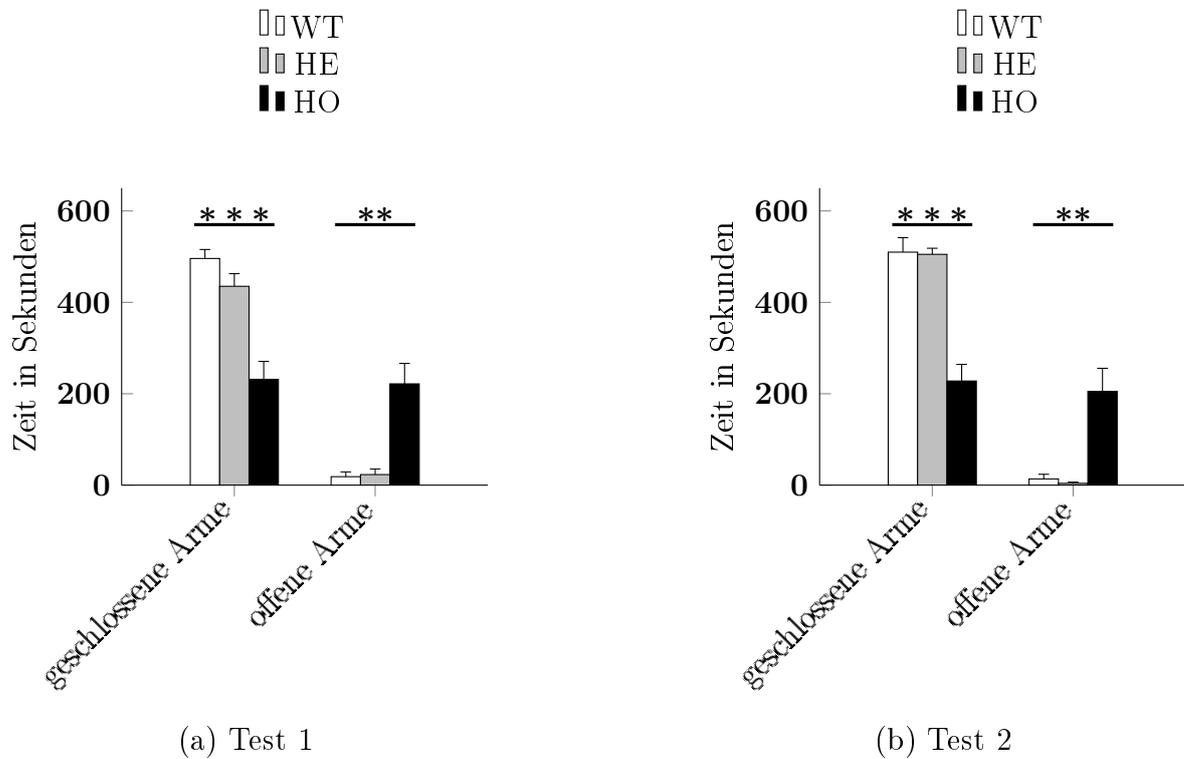


Abbildung 3.2: Elevated-Plus-Maze-Test 1: Vergleich der Zeit [s] auf den offenen und geschlossenen Armen über die drei Versuchsgruppen Wildtypen, heterozygote und homozygote Knockout-Mäuse (je Gruppe  $n = 10$ ) in Test 1 und 2. Der Versuch zeigt jeweils, dass die HO-Mäuse signifikant kürzer auf den geschlossenen Armen ((a) und (b): ANOVA  $*** : p < 0,001$ ) und länger auf den offenen Armen ((a) und (b): ANOVA  $** : p < 0,01$ ) des EPM sind, d.h. weniger Angst haben. In den Post-Hoc-Tests wird für Test 1 und 2 nachgewiesen, dass sich die Heterozygoten nicht von den Wildtypen unterscheiden ( $p > 0,05$ ), während sich beide Gruppen jeweils signifikant von den Homozygoten unterscheiden ( $p < 0,05$ ).

Parameter	WT	HE	HO
<b>Anzahl Besuche</b>			
– geschlossene Arme	19,1 ± 2,7	24,9 ± 2,1	35,8 ± 6,4
– offene Arme	3,4 ± 2,5	3,4 ± 1,7	20,7 ± 3,0
– Aktivität (n gesamt)	22,5 ± 4,7	28,3 ± 3,3	56,5 ± 6,3
<b>Zeit in [s]</b>			
– geschlossene Arme	496,0 ± 19,7	435,2 ± 27,6	231,6 ± 39,2
– offene Arme	18,5 ± 10,5	23,1 ± 12,4	221,7 ± 44,7
– Zentrum	85,5 ± 12,5	141,7 ± 17,9	146,8 ± 16,1
<b>Zeit in [%]</b>			
– geschlossene Arme	82,7 ± 3,3	72,5 ± 4,6	38,6 ± 6,5
– offene Arme	3,1 ± 1,7	3,9 ± 2,1	36,9 ± 7,4
<b>Zeit/Armbesuch [s]</b>			
– geschlossene Arme	32,1 ± 5,3	19,8 ± 3,2	6,7 ± 0,7
– offene Arme	5,0 ± 1,9	3,3 ± 1,1	12,8 ± 4,5
– Zentrum	4,2 ± 0,5	5,2 ± 0,4	3,7 ± 0,7

Tabelle 3.1: Elevated-Plus-Maze-Test 1: Mittelwerte ± SEM (je Gruppe  $n = 10$ )

Parameter	WT	HE	HO
<b>Anzahl Besuche</b>			
– geschlossene Arme	23,3 ± 5,1	26,8 ± 2,9	41,3 ± 6,8
– offene Arme	2,3 ± 1,7	0,6 ± 0,3	19,4 ± 3,9
– Aktivität (n gesamt)	25,6 ± 6,7	27,4 ± 2,9	60,7 ± 4,0
<b>Zeit in [s]</b>			
– geschlossene Arme	509,9 ± 31,7	505,1 ± 13,3	227,9 ± 36,3
– offene Arme	13,6 ± 10,2	4,0 ± 2,6	205,1 ± 50,6
– Zentrum	76,5 ± 21,9	91,0 ± 13,4	167,0 ± 18,7
<b>Zeit in [%]</b>			
– geschlossene Arme	85,0 ± 5,3	84,2 ± 2,2	38,0 ± 6,0
– offene Arme	2,3 ± 1,7	0,7 ± 0,4	34,2 ± 8,4
<b>Zeit/Armbesuch [s]</b>			
– geschlossene Arme	34,7 ± 8,6	21,1 ± 2,6	5,6 ± 0,4
– offene Arme	1,2 ± 0,8	2,3 ± 1,1	9,4 ± 1,1
– Zentrum	3,1 ± 0,4	3,3 ± 0,4	2,8 ± 0,3

Tabelle 3.2: Elevated-Plus-Maze-Test 2: Mittelwerte ± SEM (je Gruppe  $n = 10$ )

Parameter	df	F	p
<b>Anzahl Besuche</b>			
– geschlossene Arme	2	3,294*	<b>0,063</b>
– offene Arme	2	16,456	<b>0,000</b>
– Aktivität (n gesamt)	2	13,811	<b>0,000</b>
<b>Zeit in [s]</b>			
– geschlossene Arme	2	17,498*	<b>0,000</b>
– offene Arme	2	16,183*	<b>0,002</b>
– Zentrum	2	4,694	<b>0,018</b>
<b>Zeit in [%]</b>			
– geschlossene Arme	2	17,497*	<b>0,000</b>
– offene Arme	2	16,183*	<b>0,002</b>
<b>Zeit/Armbesuch [s]</b>			
– geschlossene Arme	2	17,835*	<b>0,000</b>
– offene Arme	2	3,18	<b>0,060</b>
– Zentrum	2	3,47	<b>0,046</b>

Tabelle 3.3: Elevated-Plus-Maze-Test 1: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (\*asymptotisch F-verteilt, Anwendung des Welch-Tests)

Parameter	df	F	p
<b>Anzahl Besuche</b>			
– geschlossene Arme	2	2,305*	0,132
– offene Arme	2	10,979*	<b>0,002</b>
– Aktivität (n gesamt)	2	16,752	<b>0,000</b>
<b>Zeit in [s]</b>			
– geschlossene Arme	2	25,233*	<b>0,000</b>
– offene Arme	2	12,759*	<b>0,006</b>
– Zentrum	2	7,034	<b>0,003</b>
<b>Zeit in [%]</b>			
– geschlossene Arme	2	25,210*	<b>0,000</b>
– offene Arme	2	12,759*	<b>0,006</b>
<b>Zeit/Armbesuch [s]</b>			
– geschlossene Arme	2	22,327*	<b>0,000</b>
– offene Arme	2	19,394	<b>0,000</b>
– Zentrum	2	0,550	0,583

Tabelle 3.4: Elevated-Plus-Maze-Test 2: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (\*asymptotisch F-verteilt, Anwendung des Welch-Tests)

Parameter	Gruppe	Gruppe	p
<b>Anzahl Besuche</b>			
– offene Arme	WT	HO	<b>0,000</b>
– offene Arme	WT	HE	1,000
– offene Arme	HO	HE	<b>0,000</b>
– Aktivität (n gesamt)	WT	HO	<b>0,000</b>
– Aktivität (n gesamt)	WT	HE	1,000
– Aktivität (n gesamt)	HO	HE	<b>0,001</b>
<b>Zeit in [s]</b>			
– geschlossene Arme	WT	HO	<b>0,000</b>
– geschlossene Arme	WT	HE	0,250
– geschlossene Arme	HO	HE	<b>0,002</b>
– offene Arme	WT	HO	<b>0,004</b>
– offene Arme	WT	HE	0,989
– offene Arme	HO	HE	<b>0,004</b>
– Zentrum	WT	HO	<b>0,031</b>
– Zentrum	WT	HE	<b>0,053</b>
– Zentrum	HO	HE	1,000
<b>Zeit in [%]</b>			
– geschlossene Arme	WT	HO	<b>0,000</b>
– geschlossene Arme	WT	HE	0,250
– geschlossene Arme	HO	HE	<b>0,002</b>
– offene Arme	WT	HO	<b>0,004</b>
– offene Arme	WT	HE	0,989
– offene Arme	HO	HE	<b>0,004</b>
<b>Zeit/Armbesuch [s]</b>			
– geschlossene Arme	WT	HO	<b>0,003</b>
– geschlossene Arme	WT	HE	0,185
– geschlossene Arme	HO	HE	<b>0,008</b>
– Zentrum	WT	HO	0,531
– Zentrum	WT	HE	0,671
– Zentrum	HO	HE	<b>0,042</b>

Tabelle 3.5: Elevated-Plus-Maze-Test 1: Post-Hoc-Tests nach Tamhane (wenn asymptotisch F-verteilt) bzw. Bonferroni

Parameter	Gruppe	Gruppe	p
<b>Anzahl Besuche</b>			
– offene Arme	WT	HO	<b>0,006</b>
– offene Arme	WT	HE	0,737
– offene Arme	HO	HE	<b>0,003</b>
– Aktivität (n gesamt)	WT	HO	<b>0,000</b>
– Aktivität (n gesamt)	WT	HE	1,000
– Aktivität (n gesamt)	HO	HE	<b>0,000</b>
<b>Zeit in [s]</b>			
– geschlossene Arme	WT	HO	<b>0,000</b>
– geschlossene Arme	WT	HE	0,999
– geschlossene Arme	HO	HE	<b>0,000</b>
– offene Arme	WT	HO	<b>0,013</b>
– offene Arme	WT	HE	0,764
– offene Arme	HO	HE	<b>0,010</b>
– Zentrum	WT	HO	<b>0,005</b>
– Zentrum	WT	HE	1,000
– Zentrum	HO	HE	<b>0,020</b>
<b>Zeit in [%]</b>			
– geschlossene Arme	WT	HO	<b>0,000</b>
– geschlossene Arme	WT	HE	0,999
– geschlossene Arme	HO	HE	<b>0,000</b>
– offene Arme	WT	HO	<b>0,013</b>
– offene Arme	WT	HE	0,764
– offene Arme	HO	HE	<b>0,010</b>
<b>Zeit/Armbesuch [s]</b>			
– geschlossene Arme	WT	HO	<b>0,024</b>
– geschlossene Arme	WT	HE	0,400
– geschlossene Arme	HO	HE	<b>0,001</b>
– offene Arme	WT	HO	<b>0,000</b>
– offene Arme	WT	HE	1,000
– offene Arme	HO	HE	<b>0,000</b>

Tabelle 3.6: Elevated-Plus-Maze-Test 2: Post-Hoc-Tests nach Tamhane (wenn asymptotisch F-verteilt) bzw. Bonferroni

Parameter	Gruppe	df	T	p
<b>Anzahl Besuche</b>				
– geschlossene Arme	WT	9	-1,388	0,198
– offene Arme	WT	9	1,060	0,317
– Aktivität (n gesamt)	WT	9	-1,162	0,275
<b>Zeit in [s]</b>				
– geschlossene Arme	WT	9	-0,724	0,487
– offene Arme	WT	9	2,204	<b>0,055</b>
– Zentrum	WT	9	0,480	0,643
<b>Zeit in [%]</b>				
– geschlossene Arme	WT	9	-0,724	0,487
– offene Arme	WT	9	2,204	<b>0,055</b>
<b>Zeit/Armbesuch [s]</b>				
– geschlossene Arme	WT	9	-0,384	0,710
– offene Arme	WT	9	2,408	<b>0,039</b>
– Zentrum	WT	9	2,013	0,075
<hr/>				
<b>Anzahl Besuche</b>				
– geschlossene Arme	HE	9	-0,546	0,598
– offene Arme	HE	9	1,761	0,112
– Aktivität (n gesamt)	HE	9	0,265	0,797
<b>Zeit in [s]</b>				
– geschlossene Arme	HE	9	-3,098	<b>0,013</b>
– offene Arme	HE	9	1,546	0,157
– Zentrum	HE	9	3,071	<b>0,013</b>
<b>Zeit in [%]</b>				
– geschlossene Arme	HE	9	-3,098	<b>0,013</b>
– offene Arme	HE	9	1,546	0,157
<b>Zeit/Armbesuch [s]</b>				
– geschlossene Arme	HE	9	-0,357	0,730
– offene Arme	HE	9	0,627	0,546
– Zentrum	HE	9	4,673	<b>0,001</b>
<hr/>				
<b>Anzahl Besuche</b>				
– geschlossene Arme	HO	9	-0,589	0,570
– offene Arme	HO	9	0,248	0,810
– Aktivität (n gesamt)	HO	9	-0,550	0,596
<b>Zeit in [s]</b>				
– geschlossene Arme	HO	9	0,071	0,945
– offene Arme	HO	9	0,279	0,786
– Zentrum	HO	9	-1,493	0,170
<b>Zeit in [%]</b>				
– geschlossene Arme	HO	9	0,071	0,945
– offene Arme	HO	9	0,279	0,786
<b>Zeit/Armbesuch [s]</b>				
– geschlossene Arme	HO	9	1,729	0,118
– offene Arme	HO	9	0,762	0,466
– Zentrum	HO	9	0,436	0,673

Tabelle 3.7: Elevated-Plus-Maze-Test: Vergleich von Test 1 und 2 innerhalb der Gruppen mittels t-Test für abhängige Stichproben (je Gruppe  $n = 10$ )

### 3.1.2 Motility-Box

Der Versuch (je Gruppe  $n = 10$ ) ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Wildtypen, Heterozygote und Homozygote) in allen gemessenen Parametern wie der Gesamtlaufstrecke ( $p = 0,562$ ), der Laufstrecke in der Mitte ( $p = 0,363$ ), am Rand ( $p = 0,753$ ) und in den Ecken ( $p = 0,973$ ), Drehungen im Uhrzeigersinn (IUZ) ( $p = 0,156$ ) und gegen den Uhrzeigersinn (GUZ) ( $p = 0,522$ ) (siehe Tabelle 3.8 und 3.9).

Parameter	WT	HE	HO
Gesamtweg [m]	$61,0 \pm 6,7$	$63,9 \pm 2,5$	$69,0 \pm 5,7$
Weg in der Mitte [m]	$5,8 \pm 1,0$	$7,3 \pm 1,3$	$8,6 \pm 1,7$
Weg am Rand [m]	$55,2 \pm 6,2$	$56,6 \pm 2,3$	$60,4 \pm 5,6$
Weg in den Ecken [m]	$19,1 \pm 2,1$	$18,6 \pm 0,9$	$19,0 \pm 2,1$
Drehungen IUZ	$19,3 \pm 1,8$	$23,6 \pm 1,8$	$22,5 \pm 1,1$
Drehungen GUZ	$26,0 \pm 4,8$	$26,5 \pm 1,9$	$31,9 \pm 4,7$

Tabelle 3.8: Motility-Box: Laufwege und Anzahl der Drehungen; Mittelwerte  $\pm$  SEM (je Gruppe  $n = 10$ )

Parameter	df	F	p
Gesamtweg in m	2	0,588	0,562
Weg in der Mitte in m	2	1,054	0,363
Weg am Rand in m	2	0,287	0,753
Weg in den Ecken in m	2	0,028	0,973
Drehungen IUZ	2	1,995	0,156
Drehungen GUZ	2	0,666	0,522

Tabelle 3.9: Motility-Box: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse

### 3.1.3 Soziale Interaktion

Im Vergleich zu den Wildtypen zeigten die hetero- und homozygot PRG1-defizienten Mäuse ein herabgesetztes Sozialverhalten (siehe Abbildung 3.3). In Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur [File und Seth 2003] erfolgt die Auswertung nicht je Tier, sondern je Paar, da die beiden interagierenden Tiere nicht unabhängig voneinander sind. Es wurden je 9 Wildtyp- und Knockout-Paare getestet, sowie 4 Heterozygoten-Paare. In der einfaktoriellen Varianzanalyse zeigten sich die Unterschiede im Gesamtkontakt in Sekunden ( $p = 0,062$ ) und in der Gesamtanzahl der Kontakte ( $p = 0,054$ ) als statistischer Trend. Die Anzahl der Kontakte in den Ecken der Box unterschied sich signifikant ( $p < 0,05$ ), der Post-Hoc-Test nach Bonferroni ermittelte, dass die Homozygoten signifikant weniger Kontakte in der Ecke hatten als die Wildtypen (siehe Tabelle 3.12). Die Kontakte an der Seite und in der Mitte, sowie die Zeit je Kontakt unterschieden sich nicht signifikant (siehe Tabelle 3.10 und 3.11).

Parameter	WT	HE	HO
Kontakt [s]	87,9 ± 16,5	37,5 ± 6,0	46,1 ± 3,7
Kontakte [n]	80,3 ± 7,2	56,0 ± 3,8	64,8 ± 4,7
Kontakte Ecke [n]	46,0 ± 3,0	38,0 ± 2,8	30,9 ± 4,6
Kontakte Seite [n]	30,6 ± 5,4	16,3 ± 1,4	28,2 ± 2,8
Kontakte Mitte [n]	3,6 ± 1,2	1,8 ± 0,9	6,7 ± 2,3
Zeit/Kontakt [s/n]	1,1 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1

Tabelle 3.10: Soziale Interaktion: Mittelwerte ± SEM (WT und HO je  $n = 9$ , HE  $n = 4$ )

Parameter	df	F	p
Kontakt [s]	2	3,894*	<b>0,062</b>
Kontakte [n]	2	3,411	<b>0,054</b>
Kontakte Ecke [n]	2	4,256	<b>0,030</b>
Kontakte Seite [n]	2	2,081	0,152
Kontakte Mitte [n]	2	1,591	0,230
Zeit/Kontakt [s/n]	2	2,172	0,141

Tabelle 3.11: Soziale Interaktion: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (\*asymptotisch F-verteilt, Anwendung des Welch-Tests)

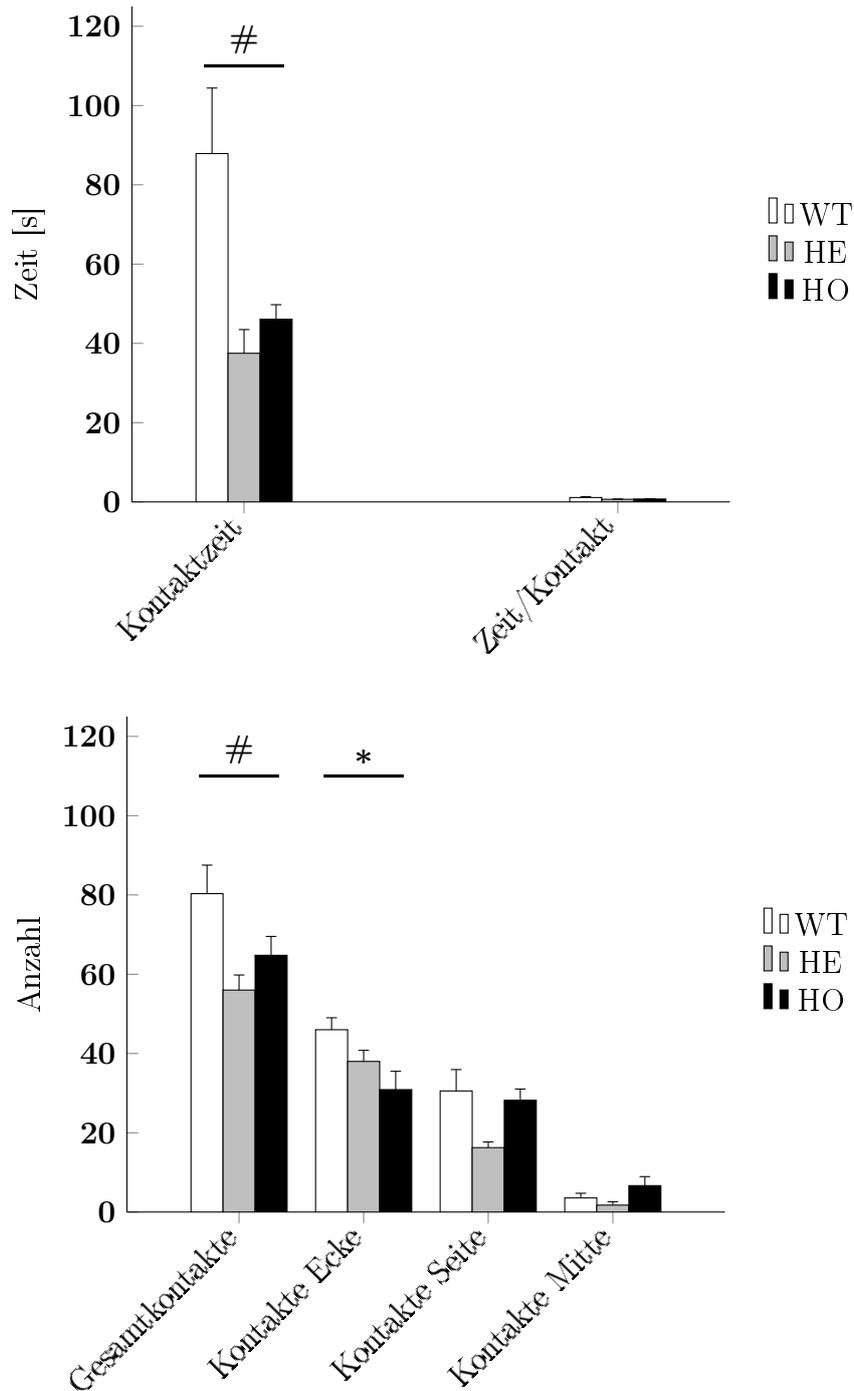


Abbildung 3.3: Soziale Interaktion. Es zeigten sich die Unterschiede in der Gesamtkontaktzeit (# :  $p = 0,062$ ) und in der Gesamtanzahl der Kontakte ( $\#$  :  $p = 0,054$ ) als statistischer Trend. Die Anzahl der Kontakte in den Ecken unterschied sich signifikant (\* :  $p < 0,05$ ), der Post-Hoc-Test nach Bonferroni ermittelte, dass die Homozygoten signifikant weniger Kontakte in der Ecke hatten als die Wildtypen ( $p < 0,05$ ). Die Kontakte an der Seite ( $\#$  :  $p = 0,152$ ) und in der Mitte ( $\#$  :  $p = 0,230$ ) sowie die Zeit je Kontakt ( $\#$  :  $p = 0,141$ ) unterschieden sich nicht signifikant (WT und HO je  $n = 9$ , HE  $n = 4$ ).

Parameter	Gruppe	Gruppe	p
Kontakt Ecke	WT	HO	<b>0,027</b>
Kontakt Ecke	WT	HE	0,722
Kontakt Ecke	HO	HE	0,885

Tabelle 3.12: Soziale Interaktion: Post-Hoc-Tests nach Bonferroni

### 3.1.4 Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response

Der Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response(FS-ASR)-Test gibt Antwort auf zwei wichtige Fragen:

1. Unterscheiden sich die Basiswerte der Startle-Reaktion zwischen den Gruppen?
2. Zeigt sich innerhalb der Gruppen eine Angstsensibilisierung?

Um die erste Frage zu beantworten, vergleicht man die Startle-Amplituden von Block 2-4 zwischen den Gruppen, also die Startle-Reaktion vor den Fußschocks. Hier unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant (siehe Tabelle 3.13,3.16 und Abbildung 3.4). Die zweite Frage lässt sich beantworten, indem die Startle-Amplituden von Block 2-4 und Block 5-7 (nach den elektrischen Fußschocks) innerhalb der Gruppen mittels t-Test für gepaarte Stichproben verglichen werden. Die Wildtypen ( $p < 0,01$ ) und die Heterozygoten ( $p < 0,05$ ) zeigten einen signifikanten Anstieg der Startle-Amplituden, also eine normale Angstsensibilisierung. Dahingegen zeigten die homozygot PRG1-defizienten Mäuse keine Angstsensibilisierung der akustischen Schreckreaktion, da Block 2-4 und Block 5-7 sich nicht signifikant unterschieden ( $p = 0,857$ ) (siehe Abbildung 3.4 und Tabelle 3.14).

Im Rahmen des FS-ASR wurden biometrische Daten der Tiere kontrolliert. Hinsichtlich Gewicht und Alter der Mäuse gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Tabelle 3.15 und 3.16).

Genotyp	Block 2-4	Block 5-7
WT	3759 ± 607	5084 ± 733
HO	4378 ± 1860	4026 ± 763
HE	4114 ± 1154	6838 ± 1722

Tabelle 3.13: Startle-Amplituden [mV] vor und nach dem aversiven Reiz: Mittelwerte ± SEM (je Gruppe  $n = 10$ )

Genotyp	df	T	p
WT	9	-3,518	<b>0,007</b>
HO	9	0,185	0,857
HE	9	-2,636	<b>0,027</b>

Tabelle 3.14: FS-ASR: Vergleich der Startle-Amplituden vor und nach dem Fußschock innerhalb der Gruppen mittels t-Test

Genotyp	Gewicht in Gramm	Alter in Tagen
WT	31,21 ± 1,62	281,50 ± 3,10
HO	28,08 ± 1,48	276,50 ± 7,53
HE	29,52 ± 1,42	284,10 ± 1,05

Tabelle 3.15: Gewicht und Alter vor dem Startle-Versuch: Mittelwerte ± SEM (je Gruppe  $n = 10$ )

Parameter	df	F	p
Block 2-4	2	0,056	0,946
Alter	2	1,526*	0,253
Gewicht	2	1,078	0,355

Tabelle 3.16: FS-ASR: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (\*asymptotisch F-verteilt, Anwendung des Welch-Tests)

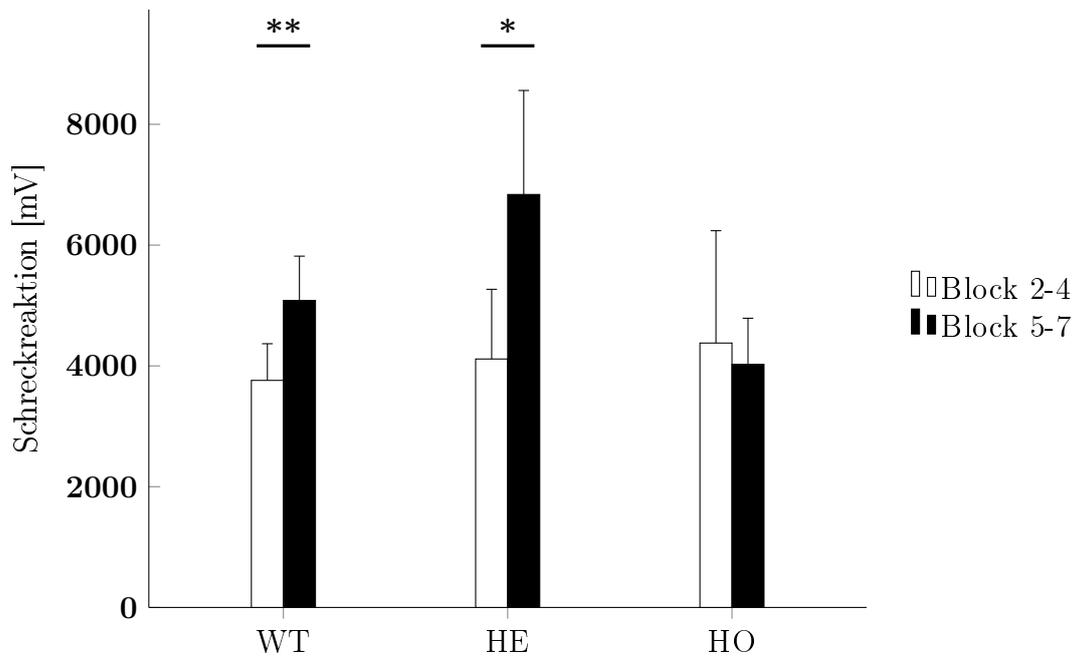


Abbildung 3.4: Angstsensibilisierung bei der akustischen Schreckreaktion. Die Basiswerte der Startle-Reaktion unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den drei Versuchsgruppen (ANOVA  $p = 0,946$ ). Die homozygot PRG1-defizienten Mäuse zeigen keine Angstsensibilisierung der akustischen Schreckreaktion, da Block 2-4 und Block 5-7 sich nicht signifikant unterscheiden (Vergleich Startle-Amplituden von Block 2-4 und Block 5-7 innerhalb der Gruppen mittels t-Test für gepaarte Stichproben;  $p = 0,857$ ). Die Wildtypen (\*\* :  $p < 0,01$ ) und die Heterozygoten (\* :  $p < 0,05$ ) zeigen einen signifikanten Anstieg der Startle-Amplituden, also eine normale Angstsensibilisierung (je Gruppe  $n = 10$ ).

## 3.2 Morphologie

### 3.2.1 Flächenbestimmung der Kerngebiete der Amygdala

Die Flächen von BLA/LA, BMA und CEA wurden an Nissl-Schnitten gemessen, welche ebenfalls der Orientierung dienen (beispielhaft in Abbildung 3.5 dargestellt). Da nicht exakt die gleiche Anzahl von Schnitten je Tier vorhanden war, wurde der Mittelwert je Schnitt errechnet. In der Analyse der mittleren Flächen je Kerngebiet in  $\mu m^2$  wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen gefunden (siehe Tabelle 3.17 und 3.18). BLA/LA ( $p = 0,122$ ), BMA ( $p = 0,195$ ), CEA ( $p = 0,339$ ) und die daraus errechnete Gesamtfläche ( $p = 0,121$ ) sind also über die Gruppen (WT  $n = 7$ , HE  $n = 4$ , HO  $n = 8$ ) hinweg nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Somit konnte eine scheinbare Verringerung der Zellflächendichte NPY- und PV-positiver Neurone aufgrund von Größenunterschieden ausgeschlossen werden.

Kerngebiet	Genotyp	mittlere Fläche $\cdot 10^4$ in $\mu m^2$
Gesamt	WT	95,71 $\pm$ 3,75
	HE	97,99 $\pm$ 5,84
	HO	106,82 $\pm$ 3,43
BLA/LA	WT	46,01 $\pm$ 1,69
	HE	45,78 $\pm$ 3,93
	HO	50,73 $\pm$ 1,04
BMA	WT	19,65 $\pm$ 0,83
	HE	19,89 $\pm$ 1,20
	HO	21,55 $\pm$ 0,62
CEA	WT	30,05 $\pm$ 1,55
	HE	32,32 $\pm$ 1,12
	HO	34,53 $\pm$ 2,65

Tabelle 3.17: Mittlere Flächen je Kerngebiet der Amygdala: Mittelwerte  $\pm$  SEM (WT  $n = 7$ , HE  $n = 4$ , HO  $n = 8$ )

Parameter	df	F	p
Gesamt	2	2,422	0,121
BLA/LA	2	2,944*	0,122
BMA	2	1,812	0,195
CEA	2	1,198*	0,339

Tabelle 3.18: Mittlere Flächen je Kerngebiet der Amygdala: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (\*asymptotisch F-verteilt, Anwendung des Welch-Tests)

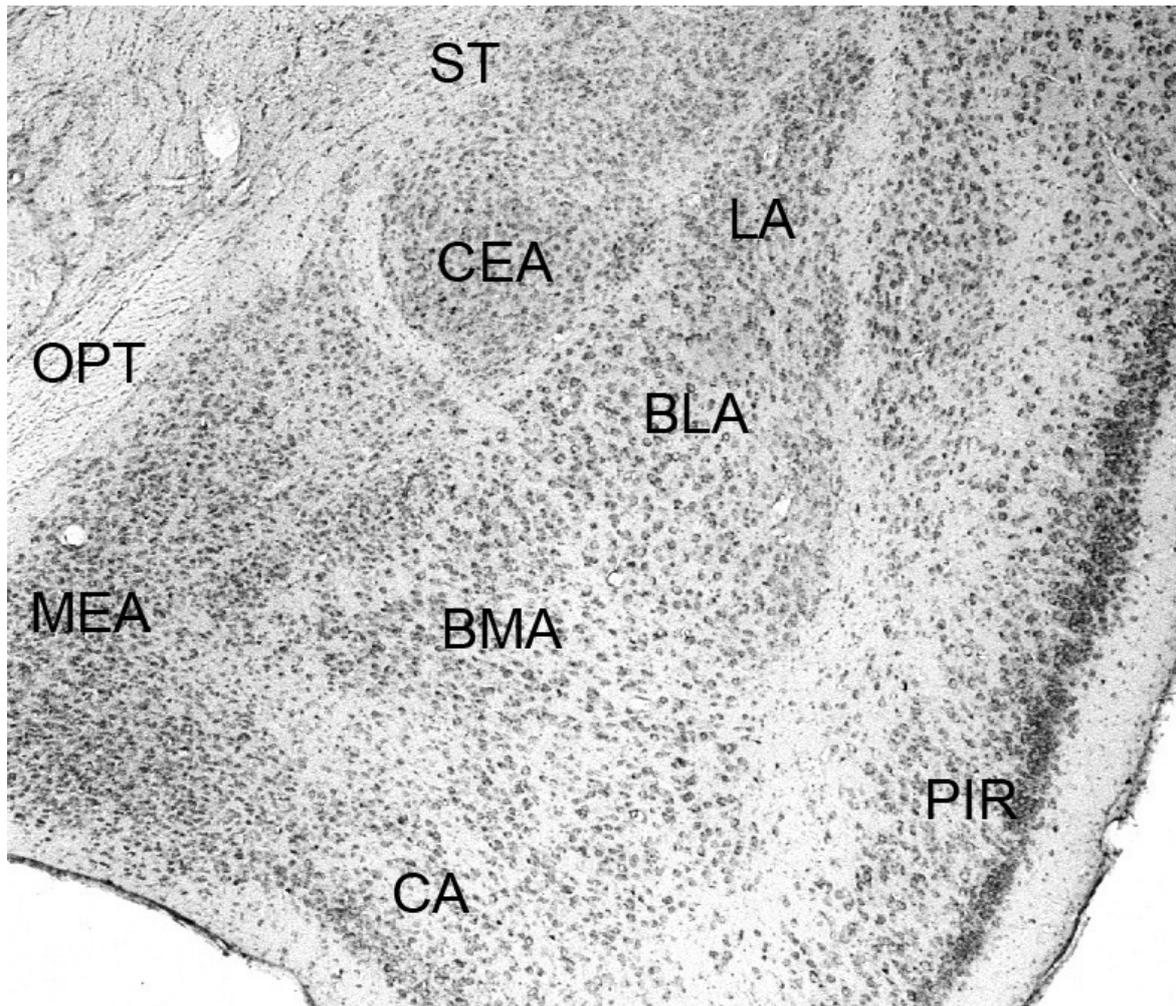


Abbildung 3.5: Repräsentativer Ausschnitt eines Koronar-Schnitts (Bregma -1,58mm nach Paxinos: „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates“), Nissl-Färbung, Wildtypmaus Nr. 3 in 50 facher Vergrößerung. Dargestellt sind die lateralen (LA), basolateralen (BLA), zentralen (CEA), basomedialen (BMA), medialen (MEA) und kortikalen (CA) Kerne der Amygdala, sowie der piriforme Kortex (PIR), die Stria terminalis (ST) und der Tractus opticus (OPT).

### 3.2.2 Die Zelldichte NPY-positiver Neurone in der Amygdala

Die statistische Auswertung der Zelldichte NPY-positiver Neurone ergab signifikante Veränderungen im Gesamtgebiet der Amygdala ( $p < 0,001$ ), im basolateralen/lateralen Kerngebiet ( $p < 0,001$ ), sowie im basomedialen Kerngebiet ( $p < 0,01$ ); dabei tendieren die Homozygoten (HO  $n = 7$ ) zu leicht niedrigeren Werten und die Heterozygoten (HE  $n = 4$ ) zu deutlich höheren Werten verglichen mit den Wildtypen (WT  $n = 7$ ; siehe Tabelle 3.19 und Abbildung 3.6). Keine Änderungen lagen im zentralen Kerngebiet ( $p = 0,158$ ) der Amygdala vor (siehe Tabelle 3.20 und 3.21). Die Zell(flächen)dichte wurde definiert als mittlere Zellzahl je Schnitt dividiert durch die mittlere Fläche je Schnitt. Ein typisches NPY-immunpositives Neuron ist beispielhaft in 400facher Vergrößerung in Abbildung 3.7 dargestellt.

Kerngebiet	Genotyp	Zellflächendichte $\cdot 10^{-6}$ in $1/\mu\text{m}^2$
Gesamt	WT	$4,77 \pm 0,42$
	HE	$7,72 \pm 0,31$
	HO	$3,07 \pm 0,38$
BLA/LA	WT	$3,20 \pm 0,62$
	HE	$6,69 \pm 0,95$
	HO	$1,51 \pm 0,28$
BMA	WT	$4,19 \pm 0,29$
	HE	$10,52 \pm 1,23$
	HO	$2,87 \pm 0,56$
CEA	WT	$7,64 \pm 0,83$
	HE	$7,60 \pm 1,13$
	HO	$5,69 \pm 0,55$

Tabelle 3.19: Zellflächendichte NPY-positiver Zellen: Mittelwerte  $\pm$  SEM (WT  $n = 7$ , HE  $n = 4$ , HO  $n = 7$ )

Parameter	df	F	p
Gesamt	2	28,413	<b>0,000</b>
BLA/LA	2	17,011	<b>0,000</b>
BMA	2	14,422*	<b>0,004</b>
CEA	2	2,089	0,158

Tabelle 3.20: Zellflächendichte NPY-positiver Zellen: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (\*asymptotisch F-verteilt, Anwendung des Welch-Tests)

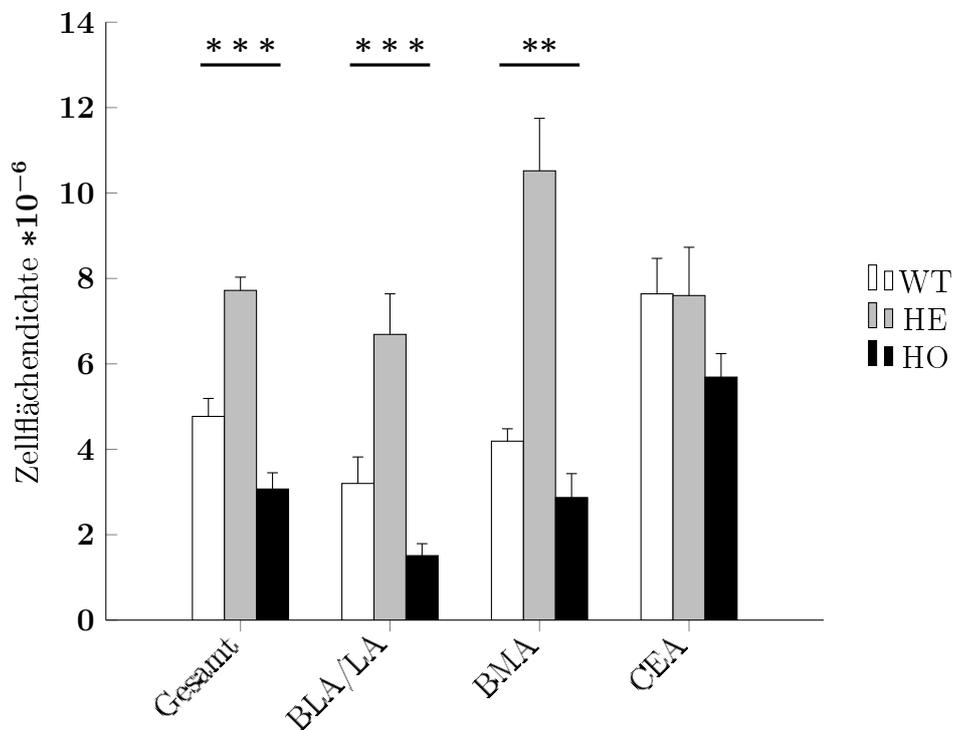


Abbildung 3.6: Zellflächendichte NPY-positiver Zellen der drei Versuchsgruppen (WT  $n = 7$ , HE  $n = 4$ , HO  $n = 7$ ) in der Amygdala. Die Gruppen unterscheiden sich signifikant im Gesamtgebiet der Amygdala (\*\*\*) :  $p < 0,001$ ), im basolateralen/lateralen Kerngebiet (\*\*\*) :  $p < 0,001$ ), sowie im basomedialen Kerngebiet (\*\* :  $p < 0,01$ ). Dabei tendieren die Homozygoten zu leicht niedrigeren Werten und die Heterozygoten zu deutlich höheren Werten verglichen mit den Wildtypen. Keine Änderungen lagen im zentralen Kerngebiet der Amygdala vor.

Parameter	Gruppe	Gruppe	p
Gesamt	WT	HO	<b>0,017</b>
Gesamt	WT	HE	<b>0,001</b>
Gesamt	HO	HE	<b>0,000</b>
BLA/LA	WT	HO	0,124
BLA/LA	WT	HE	<b>0,004</b>
BLA/LA	HO	HE	<b>0,000</b>
BMA	WT	HO	0,183
BMA	WT	HE	<b>0,036</b>
BMA	HO	HE	<b>0,012</b>

Tabelle 3.21: Zellflächendichte NPY-positiver Zellen: Post-Hoc-Tests nach Tamhane (wenn asymptotisch F-verteilt) bzw. Bonferroni



Abbildung 3.7: NPY-immunpositives Neuron in der BLA/LA eines heterozygoten PRG1-defizienten Tieres (Nr. 32) in 400 facher Vergrößerung.

### 3.2.3 Die Zelldichte Parvalbumin-positiver Neurone in der Amygdala

Bei der Auswertung der Zelldichte Parvalbumin(PV)-positiver Neurone (WT  $n = 7$ , HE  $n = 4$ , HO  $n = 7$ ), welche die größte Untergruppe GABAerger Neurone darstellen [Ehrlich et al. 2009], ist in allen Kerngebieten ein leichter Abfall bei den Homozygoten zu beobachten (siehe Tabelle 3.22 und Abbildung 3.8). Allerdings ist nur im basomedialen Gebiet der Homozygoten eine signifikant verringerte Zelldichte PV-positiver Neurone nachweisbar ( $p < 0,01$ ), dabei unterscheiden sich die Homozygoten sowohl von den Wildtypen als auch den Heterozygoten. Die Wildtypen und Heterozygoten unterscheiden sich nicht (siehe Tabelle 3.23 und 3.24). Die Zell(flächen)dichte wurde definiert als mittlere Zellzahl je Schnitt dividiert durch die mittlere Fläche je Schnitt. PV-immunpositive Neurone sind beispielhaft in 50 facher Vergrößerung (siehe Abbildung 3.9; gut zu erkennen dabei ist die Darstellung des lateralen/basolateralen Kerngebiets), 200 facher und 400 facher Vergrößerung (siehe Abbildung 3.11, 3.12 und 3.10) abgebildet.

Kerngebiet	Genotyp	Zellflächendichte $\cdot 10^{-6}$ in $1/\mu\text{m}^2$
Gesamt	WT	$10,40 \pm 0,92$
	HE	$10,47 \pm 1,77$
	HO	$7,74 \pm 0,53$
BLA/LA	WT	$17,37 \pm 1,99$
	HE	$17,16 \pm 2,76$
	HO	$13,29 \pm 1,24$
BMA	WT	$7,15 \pm 0,92$
	HE	$8,83 \pm 0,78$
	HO	$4,31 \pm 0,57$
CEA	WT	$1,96 \pm 0,49$
	HE	$1,93 \pm 0,76$
	HO	$1,68 \pm 0,49$

Tabelle 3.22: Zellflächendichte PV-positiver Zellen: Mittelwerte  $\pm$  SEM (WT  $n = 7$ , HE  $n = 4$ , HO  $n = 7$ )

Parameter	df	F	p
Gesamt	2	2,722	0,098
BLA/LA	2	1,599	0,235
BMA	2	7,779	<b>0,005</b>
CEA	2	0,085	0,919

Tabelle 3.23: Zellflächendichte PV-positiver Zellen: Vergleich der Gruppen mittels ein-faktorieller Varianzanalyse

Parameter	Gruppe	Gruppe	p
BMA	WT	HO	<b>0,045</b>
BMA	WT	HE	0,556
BMA	HO	HE	<b>0,006</b>

Tabelle 3.24: Zellflächendichte PV-positiver Zellen: Post-Hoc-Tests nach Bonferroni

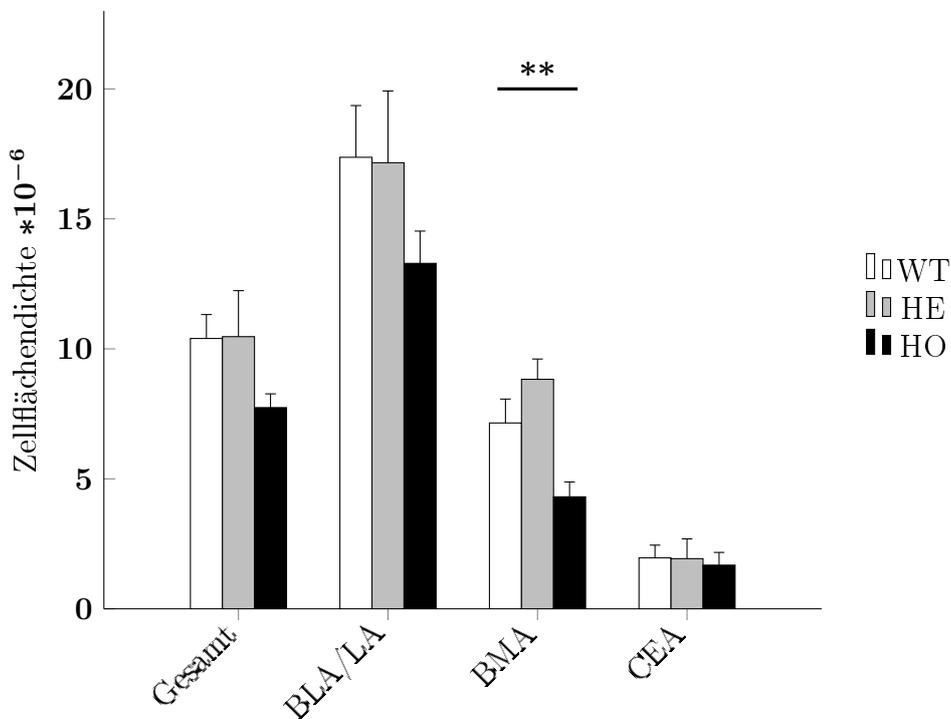


Abbildung 3.8: Zellflächendichte PV-positiver Zellen der drei Versuchsgruppen (WT  $n = 7$ , HE  $n = 4$ , HO  $n = 7$ ) in der Amygdala. Es ist in allen Kerngebieten ein leichter Abfall bei den Homozygoten zu beobachten. Im basomedialen Gebiet der Homozygoten ist eine signifikant verringerte Zelldichte PV-positiver Neurone nachweisbar (\*\* :  $p < 0,01$ ), dabei unterscheiden sich die Homozygoten sowohl von den Wildtypen als auch den Heterozygoten. Die Heterozygoten verhalten sich wie die Wildtypen.

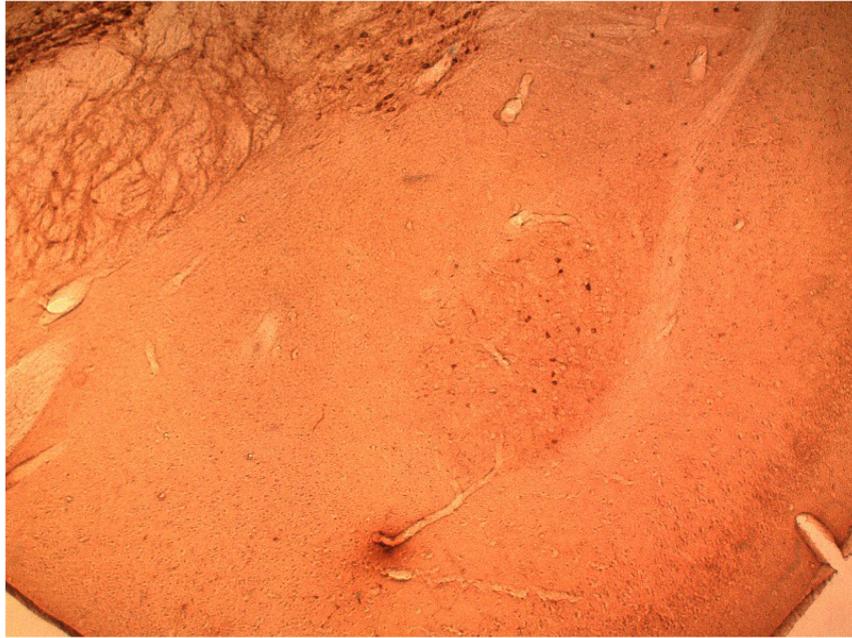


Abbildung 3.9: PV-immunpositive Neurone in der BLA/LA eines Wildtypieres (Nr. 6) in 50 facher Vergrößerung.

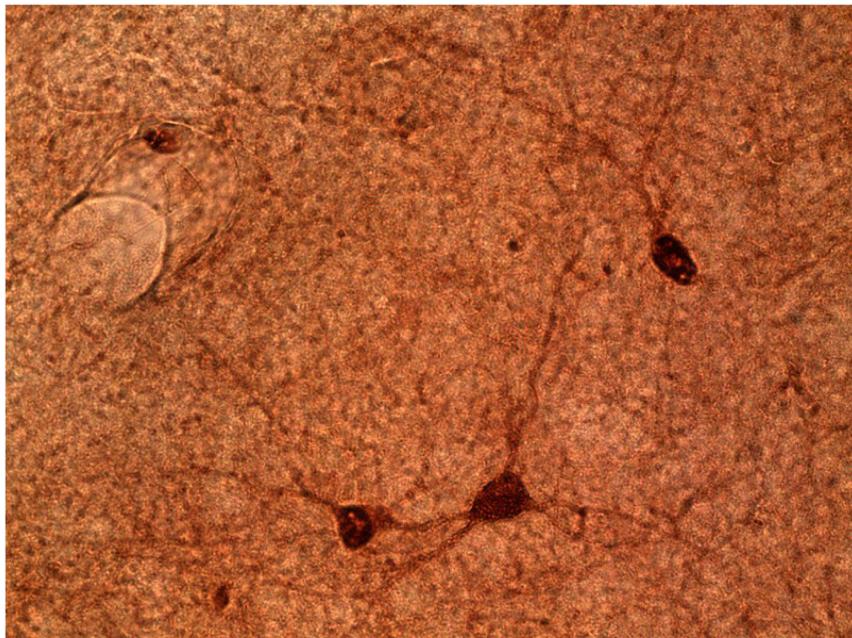


Abbildung 3.10: PV-immunpositive Neurone in der BLA/LA eines heterozygoten PRG1-defizienten Tieres (Nr. 33) in 400 facher Vergrößerung.

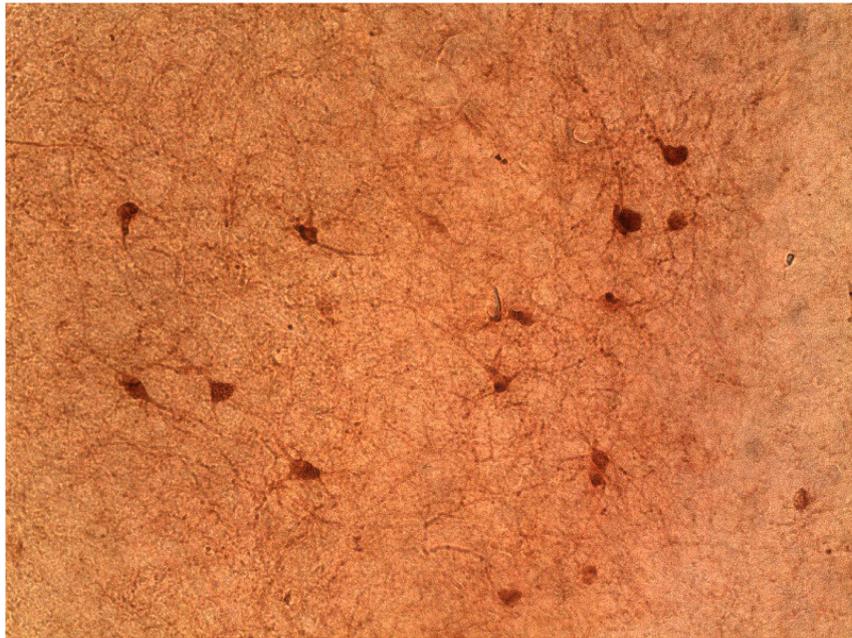


Abbildung 3.11: PV-immunpositive Neurone in der BLA/LA eines heterozygoten PRG1-defizienten Tieres (Nr. 33) in 200 facher Vergrößerung.

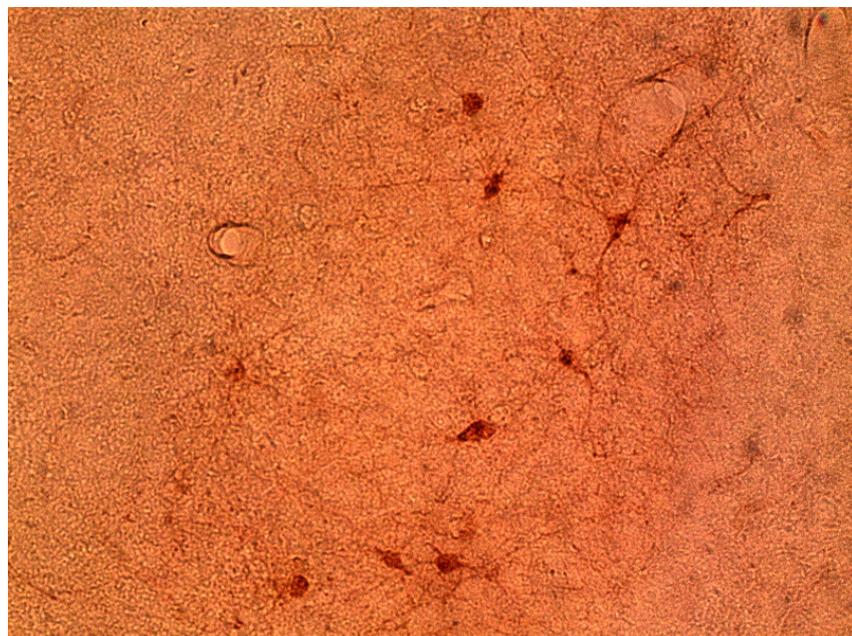


Abbildung 3.12: PV-immunpositive Neurone in der BLA/LA eines homozygoten PRG1-defizienten Tieres (Nr. 16) in 200 facher Vergrößerung.

## 3.3 Proteine

### 3.3.1 Gesamtproteingehalt via Bradford-Test

Der Gesamtproteingehalt der linken Amygdala unterschied sich nicht signifikant ( $p = 0,214$ ) innerhalb der Gruppen (WT  $n = 5$ ; HE  $n = 4$ ; HO  $n = 5$ ; siehe Tabelle 3.25 und 3.26).

Genotyp	Proteingehalt in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
WT	$4,56 \pm 0,30$
HE	$4,38 \pm 0,22$
HO	$3,96 \pm 0,16$

Tabelle 3.25: Gesamtproteingehalt: Mittelwerte  $\pm$  SEM (WT  $n = 5$ ; HE  $n = 4$ ; HO  $n = 5$ )

Parameter	df	F	p
Gesamtprotein	2	1,777	0,214

Tabelle 3.26: Gesamtproteingehalt: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse

### 3.3.2 Proteingehalt von CRF und Neurotrophenen via ELISA

Die Analyse des Proteingehaltes von CRF (je Gruppe  $n = 6$ ) in der Amygdala blieb ohne statistisch signifikante Unterschiede ( $p = 0,139$ ) zwischen den Gruppen (siehe Tabelle 3.27 und 3.28).

Auch bei der Bestimmung des Proteingehaltes von NGF ( $p = 0,526$ ), BDNF ( $p = 0,719$ ) und NT-3 ( $p = 0,457$ ) in der Amygdala traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen auf (je Gruppe  $n = 6$ ; siehe Tabelle 3.27 und 3.28).

Protein	Genotyp	Proteingehalt in pg/ml
CRF	WT	1143,6±63,29
	HE	1247,9±76,96
	HO	1406,9±115,83
NGF	WT	324,8±1,92
	HE	329,0±1,39
	HO	349,0±3,20
BDNF	WT	432,5±110,45
	HE	472,6±114,66
	HO	357,0±108,74
NT-3	WT	287,9±3,60
	HE	286,9±6,46
	HO	250,9±4,11

Tabelle 3.27: Proteingehalt von CRF und Neurotrophinen: Mittelwerte  $\pm$  SEM (je Gruppe  $n = 6$ )

Parameter	df	F	p
Gesamtprotein	2	1,777	0,214
CRF	2	2,258	0,139
NGF	2	0,670	0,526
BDNF	2	0,337	0,719
NT-3	2	0,825	0,457

Tabelle 3.28: Proteingehalt: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse

### 3.4 mRNA-Expression von CRF und Neurotrophinen via qRT-PCR

Die Auswertung der  $\Delta C_T$ -Werte der mRNA-Expression von CRF ( $p = 0,986$ ), BDNF ( $p = 0,812$ ) und NT-3 ( $p = 0,319$ ) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen (HO, HE und WT, je Gruppe  $n = 6$ ) in der Amygdala (siehe Tabelle 3.29 und 3.30).

Bei der relativen Expression mittels  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode, wobei die relative Menge (in %) der Ziel-mRNA relativ zur Kontrolle (WT auf 100 % gesetzt) errechnet wird, ergaben sich die in Tabelle 3.31 und Abbildung 3.13 dargestellten Werte.

mRNA	Genotyp	$\Delta C_T$
CRF	WT	9,13 $\pm$ 0,40
	HE	9,01 $\pm$ 0,62
	HO	9,07 $\pm$ 0,47
BDNF	WT	8,64 $\pm$ 0,31
	HE	8,89 $\pm$ 0,34
	HO	8,84 $\pm$ 0,20
NT-3	WT	9,14 $\pm$ 0,08
	HE	9,41 $\pm$ 0,31
	HO	9,66 $\pm$ 0,25

Tabelle 3.29: mRNA-Expression  $\Delta C_T$ -Werte: Mittelwerte  $\pm$  SEM (je Gruppe  $n = 6$ )

Parameter	df	F	p
CRF	2	0,014	0,986
BDNF	2	0,211	0,812
NT-3	2	1,234	0,319

Tabelle 3.30: mRNA-Expression  $\Delta C_T$ -Werte: Vergleich der Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse

mRNA	Genotyp	Relative Menge in %
CRF	WT	100
	HE	110,84
	HO	106,73
BDNF	WT	100
	HE	86,09
	HO	89,06
NT-3	WT	100
	HE	84,96
	HO	71,76

Tabelle 3.31: Relative Menge der mRNA (je Gruppe  $n = 6$ )

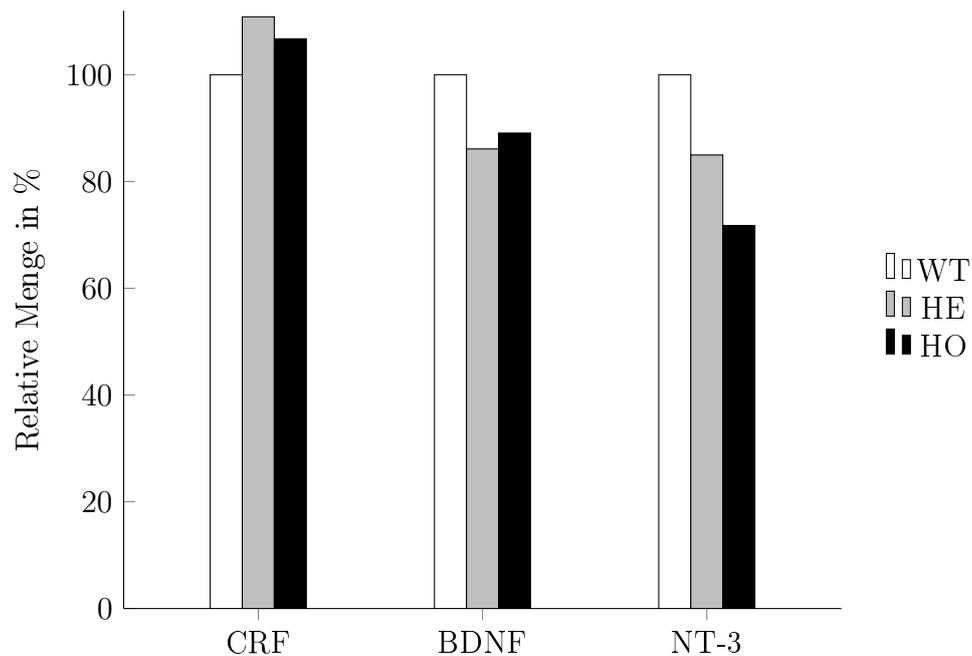


Abbildung 3.13: Relative Menge der mRNA von CRF sowie den Neurotrophen BDNF und NT-3 in der Amygdala. Die relative Expression wurde bestimmt mittels  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode, wobei die Menge der Ziel-mRNA relativ zur Kontrolle (WT auf 100 % gesetzt) errechnet wird. Die  $\Delta C_T$ -Werte zeigen keine signifikanten Unterschiede (je Gruppe  $n = 6$ ).

# 4 Diskussion

## 4.1 Einleitung der Diskussion

Das Transmembranprotein PRG1 wurde 2003 entdeckt und der LPP-Familie zugeordnet. Vorhergehende Studien konzentrierten sich auf erregende glutamaterge Neurone und wiesen eine veränderte synaptische Transmission durch PRG1-Defizienz nach. Diese Erkenntnisse lagen für den Hippokampus vor, es war unklar, ob fehlendes PRG1 auch zu Veränderungen in anderen Hirnregionen führen würde. Zudem wurden erste Hinweise zu abnormalem Verhalten wie vermehrtes Rennen, Springen und Putzen geliefert [Trimbuch et al. 2009]. Um das PRG1 und seine Funktion besser zu verstehen entstanden im Rahmen dieser Arbeit die ersten Untersuchungen zum Verhalten und zur Morphologie der Amygdala transgener homo- und heterozygoter PRG1-defizienter Mäuse sowie deren Wildtypwurfgeschwister. Die drei Versuchsgruppen wurden verschiedenen Verhaltenstests unterzogen. Zum Angstverhalten wurde der Plus-Maze-Test herangezogen. Furchtkonditionierung wurde durch den FS-ASR-Test untersucht. Die Untersuchung in der Motility-Box gibt Auskunft über das Verhalten auf unbekanntem Boden, also auch über Angst und die Aktivität der Tiere. Schließlich wurde das soziale Verhalten im weiter entwickelten Open-Field, der sozialen Interaktion beobachtet. Die Gehirne der Tiere wurden im Anschluss immunhistochemisch und molekularbiologisch aufgearbeitet und analysiert. In der Morphologie wurde nach Gründen für veränderte Verhaltensweisen gesucht. Als Teil des limbischen Systems ist die Amygdala involviert in Gedächtnisleistungen und Emotionen, unter anderem Angst und Furcht [Adolphs et al. 1995; Amunts et al. 2005; Ehrlich et al. 2009; Maren 1999; Phillips und LeDoux 1992]. Deshalb steht die Amygdala im Fokus der vorliegenden Arbeit. Weitere an der Angst- und Furchtverarbeitung beteiligte Regionen sind z.B. der Hippokampus [Lang et al. 2009; Knight et al. 2009; Nees und Pohlack 2014], der präfrontale Kortex [Davidson 2000, 2002], die Inselregion [Phan et al. 2004; Paulus und Stein 2006; Knight et al. 2009; Gasquoine 2014], der

Nukleus striae terminalis [Walker et al. 2003; Davis 2006], der Nukleus accumbens [Barrot et al. 2005; Sturm et al. 2003], das periaquäduktale Grau [Jenck et al. 1995; Vianna et al. 2001] und das anteriore Cingulum [Thayer und Lane 2000; Davidson 2002].

Angst wird durch eine Vielzahl von Faktoren auf unterschiedlichen Ebenen beeinflusst. So wirken beispielsweise erniedrigte Spiegel inhibitorischer GABAerger Neurone anxiogen [Ehrlich et al. 2009]. Um diesen Parameter zu untersuchen wurden Parvalbumin-positive Neurone gewählt, da diese die größte Untergruppe (ca. 50 %) GABAerger Neurone darstellen [Ehrlich et al. 2009]. Aber auch eine Vielzahl an Neuromodulatoren und Neuropeptiden sind an Angstreaktionen beteiligt [Kormos und Gaszner 2013]. Es wurde hier das Neuropeptid-Y gewählt, das wegen seiner anxiolytischen Wirkung bekannt ist [Sajdyk et al. 2004]. Als anxiogen bekannter Faktor wurde CRF untersucht [Dunn und Berridge 1990; Stenzel-Poore et al. 1994; Smith et al. 1998]. Weiterhin spielen auch die Neurotrophine eine wichtige Rolle in der Amygdala [Pandey et al. 2006; Rattiner et al. 2004] und modulieren ebenso wie das PRG1 die Neuroplastizität. Aus diesem Grunde wurde eine mögliche Interaktion zwischen Neurotrophinen und PRG1 untersucht, indem Proteingehalt und -expression von BDNF, NT-3 und NGF in PRG1-defizienten Tieren bestimmt wurden.

### **Methodenkritik**

Zur Minimierung der Varianz bei den Verhaltensexperimenten wurden die Versuchstiere immer gleich behandelt und die Reihenfolge der Tiere per Zufall festgelegt. Sie hatten genügend Zeit zur Adaptation und Habituation in den jeweiligen Testsystemen. Die räumlichen und zeitlichen Bedingungen waren konstant. Die beobachtende Person wurde während der Experimente nicht gewechselt.

Die hier eingesetzte Immunhistochemie ist eine etablierte Methode, auf die aus diesem Grund kurz eingegangen werden soll. Zum Einsatz kamen kommerzielle Antikörper für den Nachweis von Neuropeptid Y und Parvalbumin. Dabei wurden die Angaben der Hersteller bezüglich der Spezifität der Antikörper übernommen und die verwendeten Verdünnungen vorab im Labor ermittelt. Bei jeder immunhistochemischen Färbung besteht das Risiko falsch-positiver oder falsch-negativer Resultate. Um dies zu vermeiden, wurden vor der eigentlichen Quantifizierung positive und negative Kontrollen eingesetzt und bei jeder Charge entsprechende Kontrollen mitgeführt. Analog gilt dies für die hier verwendeten ELISA-Tests zum Nachweis des Proteingehalts von CRF und der Neurotrophine. Eine kurze methodische Anmerkung zur qRT-PCR. Das Ziel der Arbeit war es,

nach Unterschieden in der Expression in der gesamten Amygdala zu suchen. Dies erfolgt mit Hilfe eines sogenannten housekeeper-Gens, welches in diesen Untersuchungen die GAPDH ist. Dieses Enzym des Energiestoffwechsels ist ubiquitär in allen Zellen exprimiert und findet breiten Einsatz als housekeeper-Gen. Die Expression variiert allerdings je nach Zelltyp, eine hohe Expression ist in Fibroblasten und eine geringe Expression in Leukozyten beschrieben [Szabo et al. 2004]. Auch äußere Stimuli, wie oxidativer Stress oder Hypoxie können die Expression von GAPDH beeinflussen [Ito et al. 1996; Graven et al. 1994]. Somit muss man bei der qRT-PCR mit einer gewissen Variation rechnen. Um die Fehlerrate so gering wie möglich zu halten, waren die experimentellen Bedingungen von der Probenentnahme über RNA-Isolierung bis zur Bestimmung der Werte konstant.

## 4.2 Einfluß von PRG1 auf das Verhalten

Angst und emotionales Verhalten werden durch die Amygdala moduliert [Ehrlich et al. 2009; Truitt et al. 2009; Adolphs et al. 1995; Phillips und LeDoux 1992]. Der zentrale Kern vermittelt via CRF-exprimierender Neurone die Furcht-sensibilisierte akustische Schreckreaktion [Fendt et al. 1997; Davis et al. 1988; Liang et al. 1992b,a], sowie Bewegungs- und Erkundungsverhalten [Lee und Tsai 1989; Liang und Lee 1988]. Demgegenüber vermittelt der basolaterale Kern Angst- und Erkundungsverhalten, wie es im Open-Field oder im Elevated-Plus-Maze gemessen wird [Amaral et al. 1992; Davis 1997; Pitkänen et al. 1997].

### **Elevated-Plus-Maze**

Insgesamt ließ sich bei den homozygoten PRG1-Mäusen ein signifikant vermindertes Angstverhalten feststellen. Im Elevated-Plus-Maze waren diese Tiere öfter auf den offenen als auch auf den geschlossenen Armen als die Wildtypen. Dabei waren sie im Vergleich zur Kontrollgruppe auch länger auf den offenen, jedoch kürzer auf den geschlossenen Armen des Plus-Maze. Dies lässt nicht nur auf ein vermindertes Angstverhalten schließen, sondern auch auf eine höhere Aktivität der HO-Tiere. Die Heterozygoten verhielten sich wie die Wildtypen. Folglich senkt das Fehlen von PRG1 im Elevated-Plus-Maze die Angst deutlich ab, wenn beide Allele nicht zur Verfügung stehen. Kommt es zum Verlust von nur einem Allel, führt dies zum Wildtyp-Verhalten.

Viele Reviews beleuchten die Validität und Variabilität des EPM. Aufgrund zum Teil widersprüchlicher Ergebnisse einiger pharmakologischer Studien, weisen verschiedene Autoren [File 2001; Hogg 1996; Walf und Frye 2007] auf zu beachtende Störfaktoren hin, wie das Handling und der Stress der Tiere vor dem Versuch, unterschiedliche Materialien und Beleuchtung des Apparates, Simse an den offenen Armen, die Auswertung des zentralen Feldes, unterschiedliche Basiswerte verschiedener Mäusestämme, die Unterbringung der Tiere vor dem Versuch, der Zeitpunkt des Versuchs, andere vorhergehende Versuche vor dem EPM, die Definition des Betreten eines Arms und schließlich das Geschlecht der Tiere [Johnston und File 1991]. Da bei dieser Arbeit nicht die absoluten Werte im Vordergrund stehen, sondern die Unterschiede zwischen den Gruppen, ist vor allem die Gleichbehandlung aller Tiere der wichtigste Faktor zur Sicherung der Validität des Versuchs. Die Versuchsgruppe bestand ausschließlich aus Weibchen. Alle Tiere wurden so stressfrei wie möglich in ihren Einzelhaltungskäfigen zum Versuchsort gebracht, welcher ein eigens dafür konzipierter, abgeschlossener Raum (mit Vorraum) ohne Störgeräusche war. Die Testung erfolgte nach einer konstanten Adaptationszeit der Tiere bei gleichen Lichtverhältnissen. Nur wenn alle vier Gliedmaßen einen Arm betraten, wurde dies als Betreten eines Armes gewertet. Der Versuch erfolgte am Anfang der Serie von Versuchen nach der Empfehlung von File [File 2001]. Da das Zentrum weder sicher zu den offenen noch zu den geschlossenen Armen gerechnet werden kann, bedarf es einer eigenständigen kritischen Bewertung, die nicht Bestandteil dieser Arbeit sein soll. Eine zweite zusätzliche Testung erfolgte am darauffolgenden Tag, um die Stabilität des Angstniveaus zu überprüfen. Es ist typisch, dass beim wiederholten Testen von Mäusen an zwei aufeinander folgenden Tagen, am zweiten Tag eine reduzierte Aktivität auf den offenen Armen gemessen wird [File 2001; Rodgers und Shepherd 1993; Walf und Frye 2007]. Die Wildtypen zeigten in dieser Arbeit das erwartete Verhalten und verbrachten signifikant weniger Zeit, als auch weniger Zeit je Armbesuch auf den offenen Armen in Test 2. Die Heterozygoten hielten sich am zweiten Tag signifikant länger auf den geschlossenen Armen auf und weniger im Zentrum. Dahingegen gab es bei den Homozygoten keine Unterschiede zwischen Test 1 und 2. Das verringerte Angstverhalten der homozygoten Mäuse ist folglich gleichbleibend stabil.

### **Motility-Box**

In der Motility-Box konnte dahingegen in dieser Untersuchung keine erhöhte Aktivität nachgewiesen werden. In der Gesamtstrecke sowie in den Einzelstrecken der verschiedenen Abschnitte der Box wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ver-

suchsgruppen gefunden. Besonders interessant werden diese konträren Ergebnisse, wenn man die später erfolgten Open-Field-Versuche mit betrachtet (noch nicht veröffentlicht). Diese sind der Motility-Box ähnlich, erfolgen jedoch auf einer größeren Versuchsfläche. Im Open-Field konnte wiederum eine erhöhte Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings konnte bei einer Wiederholung der Untersuchung mit verdoppelter Anzahl der Tiere (jedoch ohne die Gruppe HE) auch in der Motility-Box eine erhöhte Aktivität für die Homozygoten gezeigt werden (noch nicht veröffentlicht). Im Ansatz entspricht dies den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (WT=61,0±6,7m; HO=69,0±5,7m). Die Vermutung liegt nahe, dass die unterschiedliche Aussagekraft zur Aktivität von Plus-Maze und Open-Field auf der einen Seite und Motility-Box auf der anderen Seite auf der unterschiedlich großen Fläche basiert [Walsh und Cummins 1976; Belzung 1999; Lebedev et al. 2012; Shoji 2016]. Es wurde stereotypes Verhalten der Tiere vor allem in kleineren abgeschlossenen Arealen, wie den Haltungskäfigen oder der Motility-Box beobachtet. Die Stereotypen umfassten das wiederholte Hochspringen in einer Ecke oder das Laufen in kleinen Kreisen. Die automatische Detektion der Motility-Box erfasste jedoch aufgrund eines Defekts nicht die dritte Ebene (in die Höhe). Das wiederholte Springen wird bereits in einem weiteren Verhaltenstest näher untersucht (noch unveröffentlicht). Unterschiede in der Messung der lokomotorischen Aktivität zwischen dem Open-Field-Test und der Beobachtung im Haltungskäfig sind in der Literatur auch an anderer Stelle beschrieben [Broadhurst 1958; Henniger et al. 2000]. Trotz Einbußen der Koordinationsfähigkeiten, schnitten die HO-Mäuse sogar besser ab bei Versuchen im Rota-Rod-Test und zeigten gute motorische Fähigkeiten (vor allem im Sinne stereotyper Bewegungen) [Unichenko et al. 2016], was auf eine höhere Erregbarkeit glutamaterger Neurone im motorischen System in Analogie zum Hippokampus [Trimbuch 2009] hindeutet.

### **Soziale Interaktion**

Weiterhin zeigt sich ein Einfluss der PRG1-Defizienz im Sozialverhalten der Tiere. Da in diesem Versuchsaufbau eine niedrige Beleuchtung gewählt wurde, liegt die Betonung der Interpretation auf dem Sozialverhalten und weniger auf dem Angstverhalten. Die Ergebnisse der sozialen Interaktion implizieren ein herabgesetztes soziales Verhalten der homo- und heterozygot PRG1-defizienten Tiere, sie hatten kürzere Kontakte und weniger Kontakte in den Ecken als die Wildtyp-Pärchen. In der einfaktoriellen ANOVA zeigte sich für die Anzahl der Kontakte und die Dauer der Kontakte in Sekunden ein statistischer Trend, da zwar je neun Pärchen bei Wildtypen und HO getestet wurden, aber nur vier Pärchen bei den Heterozygoten zur Verfügung standen. Würde man nur die

Wildtypen und HO-Mäuse mit einem t-Test vergleichen, würde eine statistische Signifikanz erreicht. Dies deckt sich mit späteren Beobachtungen von Vogt et al., die 2015 mit einem anderen Testverfahren ebenfalls ein herabgesetztes Sozialverhalten der Heterozygoten nachgewiesen haben [Vogt et al. 2016]. Der Verlust von sowohl einem als auch beiden Allelen von PRG1 bewirkt also ein defizitäres soziales Verhalten bei Mäusen.

### **Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response**

Die Angstkonditionierung im Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response-Test wurde wegen der beanspruchenden Versuchsparameter zuletzt untersucht. Vor der Sensibilisierung unterschieden sich die Basiswerte der Startle-Reaktion nicht signifikant zwischen den Gruppen. Nach den Fußschocks zeigten die homozygot PRG1-defizienten Tiere keinerlei Angstsensibilisierung, wohingegen die Wildtypen und Heterozygoten eine signifikant erhöhte akustische Startle-Reaktion zeigten. Eine Angstkonditionierung der homozygot PRG1-defizienten Tiere fand also nicht statt. Da der ASR auch als Index der Reaktivität auf externe Stimuli betrachtet werden kann [Davis 1984; Koch 1999], zeigen diese Ergebnisse eine defizitäre sensomotorische Reaktivität. Diese Erkenntnis führte zu einer Reihe von weiteren Untersuchungen, die schließlich auf eine kortikale Netzwerkstörung, vor allem die Sensorik betreffend, hindeuten [Unichenko et al. 2016].

### **Zusammenfassung des Verhaltens**

Insgesamt resultiert die homozygote PRG1-Defizienz in vermindertem Angstverhalten, fehlender Angstkonditionierung, erhöhter lokomotorischer Aktivität und in vermindertem Sozialverhalten. Dies bekräftigt die Relevanz des PRG1 für das Verhalten und die verarbeitenden Hirnareale. Die beteiligten Neurone und Synapsen scheinen auf PRG1 angewiesen zu sein, um einwandfrei funktionieren zu können. Die Heterozygoten verhalten sich im Elevated-Plus-Maze und Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response wie die Wildtypen, scheinen also, was das Angstverhalten und die Aktivität betrifft, ihren partiellen Defekt ausgleichen zu können. Ihr Sozialverhalten ist jedoch deutlich vermindert und damit ähnlich der homozygoten Tiere. Es eröffnet sich ein vielversprechendes Feld für neue Studien. 2016 wurde veröffentlicht, dass die nachfolgende kortikale Verarbeitung des sensorischen Inputs und sensomotorische Fähigkeiten der homozygot PRG1-Defizienten gestört sind [Unichenko et al. 2016]. Dies könnte zum verminderten Angstverhalten beitragen, wenn die Tiere ihre Umwelt zwar wahrnehmen, sich ihrer aber nicht adäquat bewusst werden und deren Gefahrenquellen beurteilen können. Als alleinige Erklärung reicht dies jedoch nicht aus, da die vorliegenden und nachfolgenden Tests zeigen, dass sie - wenn auch vermindert - auf angsteinflößende Situationen und aversive

Reize wie Trimethyl-Thiazolidin (TMT) reagieren (noch unveröffentlicht), ihre Umwelt also durchaus wahrnehmen.

### 4.3 Einfluß von PRG1 auf GABAerge Neurone und Neuropeptide in der Amygdala

Sowohl der zentrale, als auch der basolaterale Zellkern der Amygdala enthalten GABAerg projizierende Neurone und Interneurone [McDonald 1982], sowie zusätzlich NPY-co-exprimierende Interneurone [Heilig und Widerlöv 1995; Yilmazer-Hanke et al. 2002], ein anxiolytisch agierendes Neuropeptid in der Amygdala [Sajdyk et al. 2004]. Ferner treten anxiolytische Effekte bei einem Anstieg der GABAergen Transmission auf, während eine Verminderung derselben zu anxiogenen Effekten führt [Ehrlich et al. 2009]. Ein weiterer anxiogen wirkender Faktor ist das CRF [Dunn und Berridge 1990; Stenzel-Poore et al. 1994; Smith et al. 1998]. Hohe Konzentrationen von CRF können vorzugsweise im zentralen Nukleus der Amygdala nachgewiesen werden [Dunn und Berridge 1990]. In dieser Studie wurden PV-immunpositive Neurone als größte Subpopulation GABAerger Interneurone bestimmt [Ehrlich et al. 2009]. Parallel wurden NPY-immunpositive Neurone gezählt. Die Bestimmung der Expression der mRNA und Proteinmenge von CRF ergänzte die Untersuchungen.

Da ein vermindertes Angstverhalten in homozygot PRG1-defizienten Tieren beobachtet wurde, würde man erhöhte anxiolytische oder verminderte anxiogene Faktoren erwarten. Im Gegensatz dazu zeigten die homozygot PRG1-defizienten Mäuse eine signifikant geringere Dichte NPY-immunpositiver Neurone im Gesamtgebiet der Amygdala, speziell im basolateralen und basomedialen Kerngebiet, jedoch nicht im zentralen Gebiet der Amygdala. Die Heterozygoten wiesen deutlich höhere Werte als die HO und Wildtypen auf. Eine signifikante Verringerung der Dichte PV-immunpositiver Neurone wurde im basomedialen Nukleus für die HO-Tiere nachgewiesen. Die Heterozygoten zeigten hier ähnliche Ergebnisse wie die Wildtypen. Eine scheinbare Verringerung der Dichte, aufgrund der Verteilung der Neurone auf größerer Fläche konnte ausgeschlossen werden: Es gab keine Unterschiede zwischen den Flächen der Amygdala und der einzelnen Kerngebiete zwischen den Genotypen. Für die mRNA-Expression und den Proteingehalt von CRF ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. Obwohl die HO mehr CRF enthielten als die Wildtypen, wurde kein statistisch signifi-

kanter Unterschied gefunden. Dies könnte sowohl an der tierversuchsbedingten, geringen Anzahl ( $n = 6$ ) liegen, als auch an der Streuung der Werte. Zudem wurde hier die gesamte Amygdala analysiert und nicht die einzelnen Kerngebiete voneinander differenziert, wobei CRF insbesondere im zentralen Nukleus vorkommt.

Es gibt Evidenz für eine antiregulatorische Funktion von NPY und CRF, wobei NPY die Effekte von CRF dämpft [Heilig et al. 1994; Sajdyk et al. 2004] und eine NPY-Freisetzung durch CRF-Abgabe getriggert wird [Thorsell et al. 1998]. Während CRF in der Initiierung von Stressantworten involviert ist, kompensiert NPY dies und fördert die Homöostase [Sajdyk et al. 2004]. Dennoch scheint die Expression und Biosynthese von CRF unbeeinflusst durch die PRG1-Defizienz, also nicht die Ursache für das abweichende Verhalten zu sein. Trimbuch erbrachte Evidenz für eine tiefgreifende Störung in der NMDA-bezogenen exzitatorischen Transmission [Trimbuch 2009]. Diese Störung der HO-Tiere könnte die NPY-positiven Neurone beeinflussen, in Analogie zum CRF, welches eng mit Exzitation verknüpft ist [Sajdyk et al. 2004]. Dafür spricht, dass die Heterozygoten mit einer deutlich erhöhten NPY-positiven Zelldichte ein normales - mit den Wildtypen vergleichbares - Angstverhalten zeigen, die HO-Tiere jedoch stark im Verhalten und Morphologie abweichen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Fehlfunktion der exzitatorischen Reizweiterleitung eine erhöhte Effektivität des anxiolytischen NPY und GABAerger Neurone bedingt. Dies ergäbe ein neues Gleichgewicht zwischen anxiogenen und anxiolytischen Faktoren. Ein 'normaler' Spiegel dieser (in PRG1-defizienten Mäusen erniedrigten) Faktoren würde demnach in einer noch schwerwiegenderen Störung des Angstverhaltens resultieren.

Auch Trimbuch et al. beobachteten in adulten Homozygoten im Hippokampus eine Verringerung der Anzahl NPY-positiver Interneurone [Trimbuch et al. 2009]. Im Alter von drei bis vier Wochen verstirbt etwa die Hälfte der jungen HO-Tiere aufgrund von zunächst fokalen, dann generalisierten Anfällen. Die überlebenden Homozygoten zeigten hypersynchrone Aktivitäten und pre-ictale Ereignisse [Trimbuch et al. 2009]. Eine erhöhte Expression von NPY und Verringerung der Anzahl NPY-positiver Interneurone nach epileptischen Anfällen sind in der Literatur beschrieben [Sloviter et al. 2003], auch für die Amygdala [Bellmann et al. 1991]. Es ist durchaus denkbar, dass die glutamaterge Übererregbarkeit oder die PRG1-Defizienz an sich zwar neurotoxisch ist und die NPY-Zelldichte verringert, die verbleibenden NPY-positiven Zellen jedoch mehr NPY exprimieren. Dies wäre ein weiterer Ansatzpunkt für zukünftige Forschung.

Viele andere Neuromodulatoren, Peptide und Subpopulationen von Interneuronen beeinflussen emotionales Verhalten und Angstverhalten, zum Beispiel Serotonin, Somatostatin, Cholecystokinin, Peptid S sowie NK1-positive Interneurone [Truitt et al. 2009]. Andere anxiogene oder anxiolytische Faktoren, die nicht Teil dieser Arbeit waren, könnten betroffen sein. Folglich ist es möglich, dass diese anderen Faktoren die Verringerung der PV- und NPY-immunpositiven Zelldichte beeinflussen oder sogar kompensieren. Eine weitere faszinierende Theorie ist die des selbst normierenden Neuron von Turrigiano aus dem Jahr 2008. Sie stellt die These auf, dass Neurone als Teil ihrer Plastizität ihre eigene Aktivität erkennen können, dadurch ebenso ihr abweichendes Verhalten [Turrigiano 2008]. Daraufhin würden NPY und GABA herunterreguliert, um das abweichende Exzitationsmuster auszugleichen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die reduzierte Dichte parvalbuminhaltiger und NPY-immunpositiver Neurone auf eine erhöhte Erregbarkeit dieser hindeutet und auf eine Verringerung der Anzahl inhibitorischer Neurone in Angst/Furcht-verarbeitenden Arealen.

## 4.4 Einfluss von PRG1 auf Neurotrophine

Im Rahmen dieser Doktorarbeit entstand die erste Studie, die mRNA-Expression und Proteinmenge von Neurotrophinen in homo- und heterozygoten PRG1-defizienten Mäusen und deren Wildtyp-Wurfgeschwistern untersucht. Die mRNA-Expression von BDNF und NT-3 wurde mit qRT-PCR, die Proteinmenge von NGF, BDNF und NT-3 via ELISA in der Amygdala bestimmt. Interessanterweise zeigten sich keine Unterschiede in der Amygdala zwischen den Genotypen hinsichtlich Expression und Menge von diesen Neurotrophinen.

Besonders bemerkenswert ist dies, da PRG1 einerseits die Signaltransduktion in glutamatergen Neuronen beeinflusst [Trimbuch 2009], andererseits gibt es eine gute Datenlage zur Interaktion zwischen glutamatergen Neuronen und den Neurotrophinen [Mattson 2008; Gottmann et al. 2009]. Während Glutamat die Produktion von Neurotrophinen wie BDNF und NT-3 stimuliert, nehmen diese direkt und indirekt Einfluss auf die glutamaterge Erregungsleitung und schützen zudem vor Glutamat-induzierter Neurotoxizität [Cheng und Mattson 1994; Lessmann 1998; Mattson 2008]. Darüber hinaus

fördert NT-3 das Überleben von Neuronen, die von murinen embryonalen Stammzellen abstammen. Wohingegen eine Vorbehandlung mit NT-3 den NMDA-vermittelten Zelltod von kultivierten Neuronen potenziert [Lee et al. 2005]. Neben den Effekten in kultivierten Neuronen zeigen aktuelle Studien eine erhöhte Transmission nach NT-3-Mikroinfusion in adulten Ratten [Ramos-Languren und Escobar 2013]. In der Tat ist das komplexe Zusammenspiel zwischen Glutamat und Neurotrophinen einer der wichtigsten Faktoren neuronaler Plastizität [Lessmann 1998; Mattson 2008]. Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl PRG1 als auch Neurotrophine die synaptische Übertragung beeinflussen. Demnach wäre ein erhöhter Wert an Neurotrophinen als Kompensation für den Verlust des PRG1 denkbar. Im Hippokampus konnte dies im Rahmen weiterer Untersuchungen auch gezeigt werden [Petzold et al. 2016]. Zumal Trimbuch [Trimbuch 2009] eine Übererregbarkeit glutamaterger Neurone mit konsekutivem Tod von ca. 50 Prozent der Tiere durch epileptische Anfälle im Alter von drei bis vier Wochen zeigte. Übererregbarkeit und Zelltod wird als Trigger der Neurotrophine beschrieben [Mattson 2008]. Dennoch scheint PRG1-Defizienz keinen Einfluss auf Neurotrophine in der Amygdala zu haben, obwohl die Neurotrophine einen wichtigen Part in der Entwicklung und Funktion der Amygdala spielen [Pandey et al. 2006; Rattiner et al. 2004], ebenso wie glutamaterge Synapsen auf glutamatergen Neuronen [Cassell et al. 1986; McDonald 1982]. Möglich ist eine Kompensation durch andere Neuromodulatoren, z.B. durch die veränderten NPY-positiven Neurone. Zudem ist es nicht auszuschließen, dass in einzelnen Kerngebieten der Amygdala, die sehr unterschiedliche Funktionen besitzen, Unterschiede in den Neurotrophinleveln sind, diese jedoch durch die gemeinsame Bestimmung aller Kerngebiete nivelliert werden. Eine weitere Theorie ist die Einstellung eines neuen Equilibriums im adulten Zustand der Tiere. Interessante Möglichkeiten zum Ausbau dieser Forschung wäre die Untersuchung der Neurotrophine in Jungtieren und den einzelnen Kerngebieten der Amygdala.

## 4.5 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit unterstreicht die Bedeutung des PRG1, da sie Evidenz für schwerwiegende Verhaltensänderungen liefert. Das homozygote Fehlen von PRG1 führt zu reduzierter Angst und fehlender Angstkonditionierung, die Aktivität der Tiere ist gesteigert bei gleichzeitigem Verlust im sozialen Verhalten. Die Heterozygoten unterscheiden sich von den Wildtypen vor allem in reduziertem Sozialverhalten und einer erhöhten

Dichte NPY-positiver Neurone in der Amygdala. Während es keine Interaktion zwischen PRG1 und den Neurotrophinen in der Amygdala in dieser Studie gibt, gibt es Hinweise auf eine erhöhte Erregbarkeit oder auf eine Verringerung der Anzahl inhibitorischer Neurone in Angst-verarbeitenden Arealen. Es konnte eine signifikant verringerte Dichte GABAerger- und NPY-positiver Neurone in homozygot PRG1-defizienten Tieren nachgewiesen werden. Folglich wurde demonstriert, dass PRG1 nachhaltig die Amygdala beeinflusst und auf zellulärer Ebene zu Veränderungen führt. 2016 wurde ein Einzelnukleotid-Polymorphismus in PRG1 entdeckt, der etwa 5 Millionen Europäer und US-Amerikaner betrifft, und eine Prädisposition für Schizophrenie und stressbedingte Störungen darstellt [Vogt et al. 2016]. Die heterozygote PRG1-defiziente Maus entspricht diesem Genotyp als Tiermodell [Vogt et al. 2016]. Die weitere Forschung um PRG1 zeichnet sich als vielversprechend ab, gerade im Hinblick auf die klinische Relevanz.

## 5 Zusammenfassung

Das 2003 entdeckte Plasticity-Related-Gene-1 (PRG1) ist ein Transmembranprotein und gehört zur Familie der Lipid-Phosphat-Phosphatasen. Es ist an der postsynaptischen Dichte glutamaterger Neurone lokalisiert, moduliert die exzitatorische Transmission via präsynaptischer LPA<sub>2</sub>-Rezeptoren und beeinflusst das Wachstum und die Organisation von Nervenzellen sowie deren Synapsen. Da sich bisherige Studien vor allem auf den Hippokampus konzentrierten, war wenig über den Einfluss von PRG1 auf andere Hirnareale bekannt. Weiterhin fiel bei der Generierung von PRG1-defizienten Mäusen aberrierendes Verhalten auf. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit anhand von homo- und heterozygoten PRG1-defizienten Mäusen und deren Wildtypwurfgeschwistern der Einfluss von PRG1 auf emotionales Verhalten sowie auf ein morphologisches Korrelat, die Amygdala, untersucht. Im Elevated-Plus-Maze zeigten die Homozygoten deutlich reduzierte Angst und eine erhöhte lokomotorische Aktivität gegenüber den Heterozygoten und Wildtypen, sie waren zehnmal länger auf den offenen Armen und etwa doppelt so oft auf den geschlossenen Armen. Im Fear-Sensitized-Acoustic-Startle-Response-Test zeigten die Homozygoten keine Angstsensibilisierung, also eine defizitäre sensomotorische Reaktivität. Nur im Sozialverhalten gleichen sich Hetero- und Homozygote, beide Gruppen zeigten im Test der sozialen Interaktion weniger und kürzere Kontakte. Im Anschluss wurden die Gehirne der Tiere immunhistochemisch und molekularbiologisch aufgearbeitet und ausgewertet. In der Gesamtproteinmenge, den spezifischen Einzelmengen von CRF und den Neurotrophinen NGF, BDNF und NT-3, welche mittels ELISA bestimmt wurden, sowie in der mRNA-Expression von CRF, BDNF, NT-3 (via qRT-PCR) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gefunden. Die Zelldichte parvalbuminhaltiger und NPY-positiver Zellen in der Amygdala ist jedoch signifikant verringert bei den homozygoten Tieren. Dies deutet entweder auf eine Kompensation erhöhter Erregbarkeit hin oder auf eine verringerte Anzahl inhibitorischer Neurone in den Angst-Bahnen. Die erhobenen Daten belegen, dass der Mechanismus um PRG1 tiefgreifend in das Verhalten eingreift und dessen Fehlen zu morphologischen Veränderungen in der Amygdala führt.

# Literaturverzeichnis

- Adolphs, R., Tranel, D., Damasio, H. und Damasio, A. R. [1995]. Fear and the human amygdala, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **15**(9): 5879–5891.
- Adolphs, R., Tranel, D., Hamann, S., Young, A. W., Calder, A. J., Phelps, E. A., Anderson, A., Lee, G. P. und Damasio, A. R. [1999]. Recognition of facial emotion in nine individuals with bilateral amygdala damage, *Neuropsychologia* **37**(10): 1111–1117.
- Aikawa, S., Hashimoto, T., Kano, K. und Aoki, J. [2015]. Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions, *Journal of Biochemistry* **157**(2): 81–89.
- Allen, S. J. und Dawbarn, D. [2006]. Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors, *Clinical science* **110**(2): 175–191.
- Altar, C. A., Criden, M. R., Lindsay, R. M. und DiStefano, P. S. [1993]. Characterization and topography of high-affinity <sup>125</sup>I-neurotrophin-3 binding to mammalian brain, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **13**(2): 733–743.
- Amaral, D. G., Price, J. L., Pitkanen, A. und Carmichael, S. T. [1992]. Anatomical organization of the primate amygdaloid complex, *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction* pp. 1–66.
- American Psychiatric Association [2013]. *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5*, 5th ed edn, American Psychiatric Association, Washington and D.C.
- Amunts, K., Kedo, O., Kindler, M., Pieperhoff, P., Mohlberg, H., Shah, N. J., Habel, U., Schneider, F. und Zilles, K. [2005]. Cytoarchitectonic mapping of the human amygdala, hippocampal region and entorhinal cortex: intersubject variability and probability maps, *Anatomy and Embryology* **210**(5-6): 343–352.
- Angelis, L. und File, S. E. [1979]. Acute and chronic effects of three benzodiazepines in the social interaction anxiety test in mice, *Psychopharmacology* **64**(2): 127–129.
- Archer, J. [1973]. Tests for emotionality in rats and mice: a review, *Animal Behaviour* **21**(2): 205–235.
- Barnett, S. A. [1975]. *The rat: A study in behavior*, rev. ed edn, University of Chicago Press, Chicago.

- Barrot, M., Wallace, D. L., Bolanos, C. A., Graham, D. L., Perrotti, L. I., Neve, R. L., Chambliss, H., Yin, J. C. und Nestler, E. J. [2005]. Regulation of anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(23): 8357–8362.
- Bellmann, R., Widmann, R., Olenik, C., Meyer, D. K., Maas, D., Marksteiner, J. und Sperk, G. [1991]. Enhanced rate of expression and biosynthesis of neuropeptide Y after kainic acid-induced seizures, *Journal of Neurochemistry* **56**(2): 525–530.
- Belzung, C. [1999]. Chapter 4.11 Measuring rodent exploratory behavior, in W. Crusio und R. Gerlai (eds), *Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research*, Vol. 13 of *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences*, Elsevier, pp. 738–749.
- Belzung, C. und Griebel, G. [2001]. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review, *Behavioural Brain Research* **125**(1-2): 141–149.
- Bernier, P. J., Bedard, A., Vinet, J., Levesque, M. und Parent, A. [2002]. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(17): 11464–11469.
- Bouras, N. und Holt, G. [2007]. *Psychiatric and behavioural disorders in intellectual and developmental disabilities*, 2nd ed edn, Cambridge University Press, Cambridge and UK and New York.
- Bradford, M. M. [1976]. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.
- Bräuer, A. U. und Nitsch, R. [2008]. Plasticity-related genes (PRGs/LRPs): a brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins, *Biochimica et Biophysica Acta* **1781**(9): 595–600.
- Bräuer, A. U., Savaskan, N. E., Kühn, H., Prehn, S., Ninnemann, O. und Nitsch, R. [2003]. A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting, *Nature Neuroscience* **6**(6): 572–578.
- Brindley, D. N. [2004]. Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer, *Journal of Cellular Biochemistry* **92**(5): 900–912.
- Broadhurst, P. L. [1958]. Determinants of emotionality in the rat, *British Journal of Psychology* **49**(1): 12–20.
- Broks, P., Young, A. W., Maratos, E. J., Coffey, P. J., Calder, A. J., Isaac, C. L., Mayes, A. R., Hodges, J. R., Montaldi, D., Cezayirli, E., Roberts, N. und Hadley, D. [1998]. Face processing impairments after encephalitis: amygdala damage and recognition of fear, *Neuropsychologia* **36**(1): 59–70.

- Cassell, M. D., Gray, T. S. und Kiss, J. Z. [1986]. Neuronal architecture in the rat central nucleus of the amygdala: a cytological, hodological, and immunocytochemical study, *The Journal of Comparative Neurology* **246**(4): 478–499.
- Chapmann, W. P., Schroeder, H. R., Geyer, G., Brazier, M. A., Fager, C., Poppen, J. L., Solomon, H. C. und Yakovlev, P. I. [1954]. Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulatory function and emotion in man, *Science* **120**(3127): 949–950.
- Cheng, B. und Mattson, M. P. [1994]. NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults, *Brain Research* **640**(1-2): 56–67.
- Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlström, H., Lendahl, U. und Frisén, J. [2000]. Generalized potential of adult neural stem cells, *Science* **288**(5471): 1660–1663.
- Cooke, S. F. und Bliss, T. V. P. [2006]. Plasticity in the human central nervous system, *Brain: A Journal of Neurology* **129**(Pt 7): 1659–1673.
- Crawley, J. N. und Davis, L. G. [1982]. Baseline exploratory activity predicts anxiolytic responsiveness to diazepam in five mouse strains, *Brain Research Bulletin* **8**(6): 609–612.
- Crusio, W. E., Schwegler, H. und van Abeelen, J. H. [1989]. Behavioral responses to novelty and structural variation of the hippocampus in mice. II. multivariate genetic analysis, *Behavioural Brain Research* **32**(1): 81–88.
- Davidson, R. J. [2000]. Affective style, psychopathology, and resilience: brain mechanisms and plasticity, *The American Psychologist* **55**(11): 1196–1214.
- Davidson, R. J. [2002]. Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala, *Biological Psychiatry* **51**(1): 68–80.
- Davis, M. [1984]. The mammalian startle response, in R. C. Eaton (ed.), *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Springer US, Boston and MA, pp. 287–351.
- Davis, M. [1989]. Sensitization of the acoustic startle reflex by footshock, *Behavioral Neuroscience* **103**(3): 495–503.
- Davis, M. [1997]. Neurobiology of fear responses: the role of the amygdala, *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* **9**(3): 382–402.
- Davis, M. [2006]. Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle, *The American Psychologist* **61**(8): 741–756.
- Davis, M., Falls, W. A., Campeau, S. und Kim, M. [1993]. Fear-potentiated startle: a neural and pharmacological analysis, *Behavioural Brain Research* **58**(1-2): 175–198.

- Davis, M., Hitchcock, J. M. und Rosen, J. B. [1988]. Anxiety and the amygdala: Pharmacological and anatomical analysis of the fear-potentiated startle paradigm, in G. H. Bower (ed.), *Psychology of Learning and Motivation*, Vol. 21, Academic Press, pp. 263–305.
- Davison, G. C. [2008]. *Abnormal psychology*, 3rd canadian ed edn, Wiley, Mississauga and Ont.
- Denenberg, V. H. [1969]. Open-field behavior in the rat: What does it mean?, *Annals of the New York Academy of Sciences* **159**(3 Experimental): 852–859.
- Dunn, A. J. und Berridge, C. W. [1990]. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses?, *Brain Research. Brain Research Reviews* **15**(2): 71–100.
- Ebendal, T. [1989]. NGF in CNS: experimental data and clinical implications, *Progress in Growth Factor Research* **1**(3): 143–159.
- Ebert, U. und Koch, M. [1997]. Acoustic startle-evoked potentials in the rat amygdala: effect of kindling, *Physiology & Behavior* **62**(3): 557–562.
- Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciocchi, S., Herry, C. und Lüthi, A. [2009]. Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory, *Neuron* **62**(6): 757–771.
- Feindel, W. und Penfield, W. [1954]. Localization of discharge in temporal lobe automatism, *Archives of Neurology and Psychiatry* **72**(5): 603–630.
- Fendt, M., Koch, M., Kungel, M. und Schnitzler, H. U. [1995]. Cholecystokinin enhances the acoustic startle response in rats, *Neuroreport* **6**(15): 2081–2084.
- Fendt, M., Koch, M. und Schnitzler, H. U. [1994]. Amygdaloid noradrenaline is involved in the sensitization of the acoustic startle response in rats, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **48**(2): 307–314.
- Fendt, M., Koch, M. und Schnitzler, H. U. [1997]. Corticotropin-releasing factor in the caudal pontine reticular nucleus mediates the expression of fear-potentiated startle in the rat, *The European Journal of Neuroscience* **9**(2): 299–305.
- File, S. E. [1980]. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs, *Journal of Neuroscience Methods* **2**(3): 219–238.
- File, S. E. [2001]. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse, *Behavioural Brain Research* **125**(1-2): 151–157.
- File, S. E., Gonzalez, L. E. und Gallant, R. [1998]. Role of the basolateral nucleus of the amygdala in the formation of a phobia, *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **19**(5): 397–405.

- File, S. E. und Hyde, J. R. [1978]. Can social interaction be used to measure anxiety?, *British Journal of Pharmacology* **62**(1): 19–24.
- File, S. E. und Seth, P. [2003]. A review of 25 years of the social interaction test, *European Journal of Pharmacology* **463**(1-3): 35–53.
- Gasquoine, P. G. [2014]. Contributions of the insula to cognition and emotion, *Neuropsychology Review* **24**(2): 77–87.
- Goldstein, L. E., Rasmusson, A. M., Bunney, B. S. und Roth, R. H. [1996]. Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **16**(15): 4787–4798.
- Goma, M. und Tobeña, A. [1978]. Reliability of various measures obtained in open-field test, *Psychological Reports* **43**(3 Pt 2): 1123–1128.
- Gottmann, K., Mittmann, T. und Lessmann, V. [2009]. BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses, *Experimental Brain Research* **199**(3-4): 203–234.
- Graven, K. K., Troxler, R. F., Kornfeld, H., Panchenko, M. V. und Farber, H. W. [1994]. Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia, *The Journal of Biological Chemistry* **269**(39): 24446–24453.
- Hall, C. S. [1934]. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality, *Journal of Comparative Psychology* **18**(3): 385–403.
- Handley, S. L. und Mithani, S. [1984]. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **327**(1): 1–5.
- Heilig, M., Koob, G. F., Ekman, R. und Britton, K. T. [1994]. Corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y: role in emotional integration, *Trends in Neurosciences* **17**(2): 80–85.
- Heilig, M. und Widerlöv, E. [1995]. Neurobiology and clinical aspects of neuropeptide Y, *Critical Reviews in Neurobiology* **9**(2-3): 115–136.
- Henniger, M. S., Ohl, F., Holter, S. M., Weissenbacher, P., Toschi, N., Lorsch, P., Wigger, A., Spanagel, R. und Landgraf, R. [2000]. Unconditioned anxiety and social behaviour in two rat lines selectively bred for high and low anxiety-related behaviour, *Behavioural Brain Research* **111**(1-2): 153–163.
- Hitchcock, J. M., Sananes, C. B. und Davis, M. [1989]. Sensitization of the startle reflex by footshock: blockade by lesions of the central nucleus of the amygdala or its efferent pathway to the brainstem, *Behavioral Neuroscience* **103**(3): 509–518.

- Hogg, S. [1996]. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **54**(1): 21–30.
- Ito, Y., Pagano, P. J., Tornheim, K., Brecher, P. und Cohen, R. A. [1996]. Oxidative stress increases glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels in isolated rabbit aorta, *The American Journal of Physiology* **270**(1 Pt 2): H81–7.
- Jenck, F., Moreau, J. L. und Martin, J. R. [1995]. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity, *Psychiatry Research* **57**(2): 181–191.
- Johnston, A. L. und File, S. E. [1991]. Sex differences in animal tests of anxiety, *Physiology & Behavior* **49**(2): 245–250.
- Kaplan, A. S., Levitan, R. D., Yilmaz, Z., Davis, C., Tharmalingam, S. und Kennedy, J. L. [2008]. A DRD4/BDNF gene-gene interaction associated with maximum BMI in women with bulimia nervosa, *The International Journal of Eating Disorders* **41**(1): 22–28.
- Killcross, S., Robbins, T. W. und Everitt, B. J. [1997]. Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala, *Nature* **388**(6640): 377–380.
- Knight, D. C., Waters, N. S. und Bandettini, P. A. [2009]. Neural substrates of explicit and implicit fear memory, *NeuroImage* **45**(1): 208–214.
- Koch, M. [1999]. The neurobiology of startle, *Progress in Neurobiology* **59**(2): 107–128.
- Kormos, V. und Gaszner, B. [2013]. Role of neuropeptides in anxiety, stress, and depression: from animals to humans, *Neuropeptides* **47**(6): 401–419.
- Krase, W., Koch, M. und Schnitzler, H. U. [1994]. Substance P is involved in the sensitization of the acoustic startle response by footshocks in rats, *Behavioural Brain Research* **63**(1): 81–88.
- Krettek, J. E. und Price, J. L. [1978a]. Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat, *The Journal of Comparative Neurology* **178**(2): 225–254.
- Krettek, J. E. und Price, J. L. [1978b]. A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections, *The Journal of Comparative Neurology* **178**(2): 255–280.
- Landis, C., Hunt, W. A. und Strauss, H. [1939]. *The Startle Pattern*, Farrar & Rinehart.
- Lang, S., Kroll, A., Lipinski, S. J., Wessa, M., Ridder, S., Christmann, C., Schad, L. R. und Flor, H. [2009]. Context conditioning and extinction in humans: differential contribution of the hippocampus, amygdala and prefrontal cortex, *The European Journal of Neuroscience* **29**(4): 823–832.

- Lebedev, I. V., Pleskacheva, M. G. und Anokhin, K. V. [2012]. C57BL/6 mice open field behaviour qualitatively depends on arena size, *Zhurnal Vysshei Nervnoi Deiatelnosti Imeni I P Pavlova* **62**(4): 485–496.
- LeDoux, J. E. [1993]. Emotional memory systems in the brain, *Behavioural Brain Research* **58**(1-2): 69–79.
- LeDoux, J. E., Iwata, J., Cicchetti, P. und Reis, D. J. [1988]. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **8**(7): 2517–2529.
- Lee, C.-S., Tee, L. Y., Dusenbery, S., Takata, T., Golden, J. P., Pierchala, B. A., Gottlieb, D. I., Johnson, E. M., Choi, D. W. und Snider, B. J. [2005]. Neurotrophin and GDNF family ligands promote survival and alter excitotoxic vulnerability of neurons derived from murine embryonic stem cells, *Experimental Neurology* **191**(1): 65–76.
- Lee, E. H. und Tsai, M. J. [1989]. The hippocampus and amygdala mediate the locomotor stimulating effects of corticotropin-releasing factor in mice, *Behavioral and Neural Biology* **51**(3): 412–423.
- Lessmann, V. [1998]. Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS, *General Pharmacology* **31**(5): 667–674.
- Levi-Montalcini, R., Meyer, H. und Hamburger, V. [1954]. In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo, *Cancer Research* **14**(1): 49–57.
- Liang, K. C. und Lee, E. H. [1988]. Intra-amygdala injections of corticotropin releasing factor facilitate inhibitory avoidance learning and reduce exploratory behavior in rats, *Psychopharmacology* **96**(2): 232–236.
- Liang, K. C., Melia, K. R., Campeau, S., Falls, W. A., Miserendino, M. J. und Davis, M. [1992a]. Corticotropin-releasing factor: long-lasting facilitation of the acoustic startle reflex, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **12**(6): 2303–2312.
- Liang, K. C., Melia, K. R., Campeau, S., Falls, W. A., Miserendino, M. J. und Davis, M. [1992b]. Lesions of the central nucleus of the amygdala, but not the paraventricular nucleus of the hypothalamus, block the excitatory effects of corticotropin-releasing factor on the acoustic startle reflex, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **12**(6): 2313–2320.
- Lister, R. G. [1987]. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse, *Psychopharmacology* **92**(2): 180–185.
- Lister, R. G. und Hilakivi, L. A. [1988]. The effects of novelty, isolation, light and ethanol on the social behavior of mice, *Psychopharmacology* **96**(2): 181–187.

- Lømo, T. [2003]. The discovery of long-term potentiation, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **358**(1432): 617–620.
- Maina, G., Rosso, G., Zanardini, R., Bogetto, F., Gennarelli, M. und Bocchio-Chiavetto, L. [2010]. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in drug-naïve obsessive-compulsive patients: a case-control study, *Journal of Affective Disorders* **122**(1-2): 174–178.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N. Y., Furth, M. E., Lindsay, R. M. und Yancopoulos, G. D. [1990]. Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF, *Science* **247**(4949 Pt 1): 1446–1451.
- Malenka, R. C. und Bear, M. F. [2004]. LTP and LTD: an embarrassment of riches, *Neuron* **44**(1): 5–21.
- Maren, S. [1999]. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory, *Trends in Neurosciences* **22**(12): 561–567.
- Markel, A. L., Galaktionov YuK und Efimov, V. M. [1989]. Factor analysis of rat behavior in an open field test, *Neuroscience and Behavioral Physiology* **19**(4): 279–286.
- Mattson, M. P. [2008]. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease, *Annals of the New York Academy of Sciences* **1144**(1): 97–112.
- McDermott, M. I., Sigal, Y. J., Sciorra, V. A. und Morris, A. J. [2004]. Is PRG-1 a new lipid phosphatase?, *Nature Neuroscience* **7**(8): 789; author reply 789–90.
- McDonald, A. J. [1982]. Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat, *The Journal of Comparative Neurology* **208**(4): 401–418.
- McDonald, A. J. [1991]. Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat, *Neuroscience* **44**(1): 1–14.
- McDonald, A. J. [1998]. Cortical pathways to the mammalian amygdala, *Progress in Neurobiology* **55**(3): 257–332.
- Mercader, J. M., Fernández-Aranda, F., Gratacòs, M., Ribasés, M., Badía, A., Villarejo, C., Solano, R., González, J. R., Vallejo, J. und Estivill, X. [2007]. Blood levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with several psychopathological symptoms in anorexia nervosa patients, *Neuropsychobiology* **56**(4): 185–190.
- Montgomery, K. C. [1955]. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior, *Journal of Comparative and Physiological Psychology* **48**(4): 254–260.
- Morris, J. S., Frith, C. D., Perrett, D. I., Rowland, D., Young, A. W., Calder, A. J. und Dolan, R. J. [1996]. A differential neural response in the human amygdala to fearful and happy facial expressions, *Nature* **383**(6603): 812–815.

- Morris, R. G. M. [2003]. Long-term potentiation and memory, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **358**(1432): 643–647.
- Nandurkar, H. H., Caldwell, K. K., Whisstock, J. C., Layton, M. J., Gaudet, E. A., Norris, F. A., Majerus, P. W. und Mitchell, C. A. [2001]. Characterization of an adapter subunit to a phosphatidylinositol (3)P 3-phosphatase: identification of a myotubularin-related protein lacking catalytic activity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(17): 9499–9504.
- Nees, F. und Pohlack, S. T. [2014]. Functional MRI studies of the hippocampus, *Frontiers of Neurology and Neuroscience* **34**: 85–94.
- Neves, G., Cooke, S. F. und Bliss, T. V. P. [2008]. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality, *Nature Reviews. Neuroscience* **9**(1): 65–75.
- Pandey, S. C., Zhang, H., Roy, A. und Misra, K. [2006]. Central and medial amygdaloid brain-derived neurotrophic factor signaling plays a critical role in alcohol-drinking and anxiety-like behaviors, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **26**(32): 8320–8331.
- Patapoutian, A. und Reichardt, L. F. [2001]. Trk receptors: mediators of neurotrophin action, *Current Opinion in Neurobiology* **11**(3): 272–280.
- Paulus, M. P. und Stein, M. B. [2006]. An insular view of anxiety, *Biological Psychiatry* **60**(4): 383–387.
- Paxinos, G. und Franklin, K. B. J. [2001]. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 2nd ed edn, Academic Press, San Diego.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. und Briley, M. [1985]. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *Journal of Neuroscience Methods* **14**(3): 149–167.
- Petrovich, G. D. und Swanson, L. W. [1997]. Projections from the lateral part of the central amygdalar nucleus to the postulated fear conditioning circuit, *Brain Research* **763**(2): 247–254.
- Petzold, S., Sommer, B., Kröber, A., Nitsch, R., Schwegler, H., Vogt, J. und Roskoden, T. [2016]. NT-3 protein levels are enhanced in the hippocampus of PRG1-deficient mice but remain unchanged in PRG1/LPA2 double mutants, *Neuroscience Letters* **612**: 145–148.
- Phan, K. L., Fitzgerald, D. A., Gao, K., Moore, G. J., Tancer, M. E. und Posse, S. [2004]. Real-time fMRI of cortico-limbic brain activity during emotional processing, *Neuroreport* **15**(3): 527–532.

- Phillips, R. G. und LeDoux, J. E. [1992]. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning, *Behavioral Neuroscience* **106**(2): 274–285.
- Pitkänen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N. und Ylinen, A. [2000]. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. a review, *Annals of the New York Academy of Sciences* **911**: 369–391.
- Pitkänen, A., Savander, V. und LeDoux, J. E. [1997]. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala, *Trends in Neurosciences* **20**(11): 517–523.
- Ramos-Languren, L. E. und Escobar, M. L. [2013]. Plasticity and metaplasticity of adult rat hippocampal mossy fibers induced by neurotrophin-3, *The European Journal of Neuroscience* **37**(8): 1248–1259.
- Rattiner, L. M., Davis, M., French, C. T. und Ressler, K. J. [2004]. Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **24**(20): 4796–4806.
- Reber, A. S. und Reber, E. S. [2001]. *The Penguin dictionary of psychology*, 3rd ed edn, Penguin Books, London and New York.
- Rodgers, R. J. [1997]. Animal models of 'anxiety': where next?, *Behavioural Pharmacology* **8**(6-7): 477–96; discussion 497–504.
- Rodgers, R. J. und Johnson, N. J. [1995]. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* **52**(2): 297–303.
- Rodgers, R. J. und Shepherd, J. K. [1993]. Influence of prior maze experience on behaviour and response to diazepam in the elevated plus-maze and light/dark tests of anxiety in mice, *Psychopharmacology* **113**(2): 237–242.
- Royce, J. R. [1977]. On the construct validity of open-field measures, *Psychological Bulletin* **84**(6): 1098–1106.
- Sajdyk, T. J., Shekhar, A. und Gehlert, D. R. [2004]. Interactions between NPY and CRF in the amygdala to regulate emotionality, *Neuropeptides* **38**(4): 225–234.
- Schwegler, H., Pilz, P. K., Koch, M., Fendt, M., Linke, R. und Driscoll, P. [1997]. The acoustic startle response in inbred Roman high- and low-avoidance rats, *Behavior Genetics* **27**(6): 579–582.
- Seligman, M. E. P., Rosenhan, D. L. und Walker, E. F. [2001]. *Abnormal psychology*, 4. ed edn, Norton, New York.

- Shephard, R. A. [1986]. Neurotransmitters, anxiety and benzodiazepines: a behavioral review, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **10**(4): 449–461.
- Shoji, H. [2016]. Scaling law in free walking of mice in circular open fields of various diameters, *Journal of Biological Physics* **42**(2): 259–270.
- Sigal, Y. J., McDermott, M. I. und Morris, A. J. [2005]. Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases: common structure and diverse functions, *The Biochemical Journal* **387**(Pt 2): 281–293.
- Simon, P., Dupuis, R. und Costentin, J. [1994]. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. influence of dopaminergic transmissions, *Behavioural Brain Research* **61**(1): 59–64.
- Sloviter, R. S., Zappone, C. A., Harvey, B. D., Bumanglag, A. V., Bender, R. A. und Frotscher, M. [2003]. "Dormant basket cell" hypothesis revisited: relative vulnerabilities of dentate gyrus mossy cells and inhibitory interneurons after hippocampal status epilepticus in the rat, *The Journal of Comparative Neurology* **459**(1): 44–76.
- Smith, G. W., Aubry, J. M., Dellu, F., Contarino, A., Bilezikjian, L. M., Gold, L. H., Chen, R., Marchuk, Y., Hauser, C., Bentley, C. A., Sawchenko, P. E., Koob, G. F., Vale, W. und Lee, K. F. [1998]. Corticotropin releasing factor receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development, *Neuron* **20**(6): 1093–1102.
- Spielberger, C. D. (ed.) [1966]. *Anxiety and behavior*, Acad. Press, New York.
- Stanford, S. C. [2007]. The open field test: reinventing the wheel, *Journal of Psychopharmacology* **21**(2): 134–135.
- Stenzel-Poore, M. P., Heinrichs, S. C., Rivest, S., Koob, G. F. und Vale, W. W. [1994]. Overproduction of corticotropin-releasing factor in transgenic mice: a genetic model of anxiogenic behavior, *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* **14**(5 Pt 1): 2579–2584.
- Sturm, V., Lenartz, D., Koulousakis, A., Treuer, H., Herholz, K., Klein, J. C. und Klosterkötter, J. [2003]. The nucleus accumbens: a target for deep brain stimulation in obsessive-compulsive- and anxiety-disorders, *Journal of Chemical Neuroanatomy* **26**(4): 293–299.
- Swanson, L. W. und Petrovich, G. D. [1998]. What is the amygdala?, *Trends in Neurosciences* **21**(8): 323–331.
- Sylvers, P., Lilienfeld, S. O. und LaPrairie, J. L. [2011]. Differences between trait fear and trait anxiety: Implications for psychopathology, *Clinical Psychology Review* **31**(1): 122–137.

- Szabo, A., Perou, C. M., Karaca, M., Perreard, L., Palais, R., Quackenbush, J. F. und Bernard, P. S. [2004]. Statistical modeling for selecting housekeeper genes, *Genome Biology* **5**(8): R59.
- Tessarollo, L., Vogel, K. S., Palko, M. E., Reid, S. W. und Parada, L. F. [1994]. Targeted mutation in the neurotrophin-3 gene results in loss of muscle sensory neurons, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(25): 11844–11848.
- Thayer, J. F. und Lane, R. D. [2000]. A model of neurovisceral integration in emotion regulation and dysregulation, *Journal of Affective Disorders* **61**(3): 201–216.
- Thorsell, A., Svensson, P., Wiklund, L., Sommer, W., Ekman, R. und Heilig, M. [1998]. Suppressed neuropeptide Y (NPY) mRNA in rat amygdala following restraint stress, *Regulatory Peptides* **75-76**: 247–254.
- Todd, A. E., Orengo, C. A. und Thornton, J. M. [2002]. Sequence and structural differences between enzyme and nonenzyme homologs, *Structure* **10**(10): 1435–1451.
- Tokumitsu, H., Hatano, N., Tsuchiya, M., Yurimoto, S., Fujimoto, T., Ohara, N., Kobayashi, R. und Sakagami, H. [2010]. Identification and characterization of PRG-1 as a neuronal calmodulin-binding protein, *The Biochemical Journal* **431**(1): 81–91.
- Trimbuch, T. [2009]. *Untersuchung zur physiologischen Rolle von PRG-1 anhand der Generierung und Phänotypisierung von PRG 1 defizienten Mausmodellen*, Freie Universität Berlin, Berlin.
- Trimbuch, T., Beed, P., Vogt, J., Schuchmann, S., Maier, N., Kintscher, M., Breustedt, J., Schuelke, M., Streu, N., Kieselmann, O., Brunk, I., Laube, G., Strauss, U., Battfeld, A., Wende, H., Birchmeier, C., Wiese, S., Sendtner, M., Kawabe, H., Kishimoto-Suga, M., Brose, N., Baumgart, J., Geist, B., Aoki, J., Savaskan, N. E., Bräuer, A. U., Chun, J., Ninnemann, O., Schmitz, D. und Nitsch, R. [2009]. Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling, *Cell* **138**(6): 1222–1235.
- Truitt, W. A., Johnson, P. L., Dietrich, A. D., Fitz, S. D. und Shekhar, A. [2009]. Anxiety-like behavior is modulated by a discrete subpopulation of interneurons in the basolateral amygdala, *Neuroscience* **160**(2): 284–294.
- Turner, B. H. und Herkenham, M. [1991]. Thalamoamygdaloid projections in the rat: a test of the amygdala's role in sensory processing, *The Journal of Comparative Neurology* **313**(2): 295–325.
- Turrigiano, G. G. [2008]. The self-tuning neuron: synaptic scaling of excitatory synapses, *Cell* **135**(3): 422–435.

- Unichenko, P., Kirischuk, S., Yang, J.-W., Baumgart, J., Roskoden, T., Schneider, P., Sommer, A., Horta, G., Radyushkin, K., Nitsch, R., Vogt, J. und Luhmann, H. J. [2016]. Plasticity-related gene 1 affects mouse barrel cortex function via strengthening of glutamatergic thalamocortical transmission, *Cerebral Cortex* **26**(7): 3260–3272.
- Valzelli, L. [1973]. Activity of benzodiazepines on aggressive behavior in rats and mice., *The Benzodiazepines* pp. 405–417.
- Vianna, D. M., Landeira-Fernandez, J. und Brandao, M. L. [2001]. Dorsolateral and ventral regions of the periaqueductal gray matter are involved in distinct types of fear, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **25**(7-8): 711–719.
- Vogt, J., Yang, J.-W., Mobascher, A., Cheng, J., Li, Y., Liu, X., Baumgart, J., Thalman, C., Kirischuk, S., Unichenko, P., Horta, G., Radyushkin, K., Stroh, A., Richers, S., Sahragard, N., Distler, U., Tenzer, S., Qiao, L., Lieb, K., Tuscher, O., Binder, H., Ferreiros, N., Tegeder, I., Morris, A. J., Gropa, S., Nurnberg, P., Toliat, M. R., Winterer, G., Luhmann, H. J., Huai, J. und Nitsch, R. [2016]. Molecular cause and functional impact of altered synaptic lipid signaling due to a PRG-1 gene SNP, *EMBO Molecular Medicine* **8**(1): 25–38.
- Walf, A. A. und Frye, C. A. [2007]. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents, *Nature Protocols* **2**(2): 322–328.
- Walker, D. L., Toufexis, D. J. und Davis, M. [2003]. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety, *European Journal of Pharmacology* **463**(1-3): 199–216.
- Walsh, R. N. und Cummins, R. A. [1976]. The open-field test: a critical review, *Psychological Bulletin* **83**(3): 482–504.
- Weilenmann, R. [1989]. *Histotechnik: Ergänzungsheft zu: Laboratoriumsmedizin, ein Lehrbuch für medizinisch-technische Assistentinnen*, Peter Hagemann [Hrsg.]; 3., völlig neu bearb. Aufl. edn, Hirzel, Stuttgart.
- Xiu, M. H., Hui, L., Dang, Y. F., Hou, T. D., Zhang, C. X., Zheng, Y. L., Chen, D. C., Kosten, T. R. und Zhang, X. Y. [2009]. Decreased serum BDNF levels in chronic institutionalized schizophrenia on long-term treatment with typical and atypical antipsychotics, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* **33**(8): 1508–1512.
- Yamada, K. und Nabeshima, T. [2003]. Brain-derived neurotrophic factor/trkB signaling in memory processes, *Journal of Pharmacological Sciences* **91**(4): 267–270.
- Yee, B. K., Zhu, S.-W., Mohammed, A. H. und Feldon, J. [2007]. Levels of neurotrophic factors in the hippocampus and amygdala correlate with anxiety- and fear-related behaviour in C57BL6 mice, *Journal of Neural Transmission* **114**(4): 431–444.

- Yeomans, J. S. und Frankland, P. W. [1995]. The acoustic startle reflex: neurons and connections, *Brain Research. Brain Research Reviews* **21**(3): 301–314.
- Yilmazer-Hanke, D. M., Faber-Zuschratter, H., Linke, R. und Schwegler, H. [2002]. Contribution of amygdala neurons containing peptides and calcium-binding proteins to fear-potentiated startle and exploration-related anxiety in inbred Roman high- and low-avoidance rats, *The European Journal of Neuroscience* **15**(7): 1206–1218.
- Zajac, M. S., Pang, T Y C, Wong, N., Weinrich, B., Leang, L S K, Craig, J. M., Saffery, R. und Hannan, A. J. [2010]. Wheel running and environmental enrichment differentially modify exon-specific BDNF expression in the hippocampus of wild-type and pre-motor symptomatic male and female huntington’s disease mice, *Hippocampus* **20**(5): 621–636.
- Zeev, B. B., Bebbington, A., Ho, G., Leonard, H., Klerk, N. d., Gak, E., Vecsler, M., Veckler, M. und Christodoulou, J. [2009]. The common BDNF polymorphism may be a modifier of disease severity in Rett syndrome, *Neurology* **72**(14): 1242–1247.
- Zhang, Q. X., Pilquil, C. S., Dewald, J., Berthiaume, L. G. und Brindley, D. N. [2000]. Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1: implications for its sites of action, *The Biochemical Journal* **345 Pt 2**: 181–184.

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

PD OA Dr. med. Thomas Roskoden für das Dissertationsthema und die hervorragende Betreuung, seine Geduld sowie anregende Diskussionen.

Prof. Dr. med. Hermann-Josef Rothkötter für die kompromisslose Unterstützung, den Raum zur Entfaltung und die Möglichkeit einen Wirkungsort zu finden, der mir sehr am Herzen liegt.

Prof. Dr. rer. nat. Herbert Schwegler für sein stets offenes Ohr und seinen Ratschlag.

Frau Andrea Kröber, die mir in allen Lebenslagen zur Seite stand mit technischer Expertise, Feingefühl, aber auch Hartnäckigkeit und stets ein Fels in der Brandung war.

Allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Anatomie Magdeburg für ein sehr gutes Arbeitsklima, produktive Gespräche und viele schöne Momente.

Frau Anke Lux für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und das geduldige Beantworten der auftretenden Fragen.

Des Weiteren danke ich den Mitgliedern der Prüfungskommission für ihr Mitwirken.

Ich möchte mich bedanken bei meinem Ehemann und Kindern, meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großmüttern! Ihr seid ein Schatz, ein Glück, welches mich tagtäglich umgibt, ich aber nie als selbstverständlich auffasse, sondern welches mich mit einer tiefen Dankbarkeit erfüllt.

# Ehrenerklärung

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

**Plasticity-Related-Gene-1: Unterschiede im Verhalten und in der Morphologie der Amygdala im Mausmodell**

im Institut für Anatomie  
mit Unterstützung durch Thomas Roskoden

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation 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.

Magdeburg, den 28. September 2016

Sandra Petzold

## Bildungsweg

Der Bildungsweg ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

# Anlagen

## A.1 Materialien

### Antikörper

monoklonaler Maus-Anti-Parvalbumin (SWant; Bellinzona, Schweiz)  
polyklonaler Kaninchen-Anti-Neuropeptid-Y (GeneTex; Irvine, USA)  
biotinylierter Anti-Maus (Biozol Diagnostika; Eching, Deutschland)  
biotinylierter Anti-Kaninchen (Biozol Diagnostika; Eching, Deutschland)

### Chemikalien

0,1 M Phosphatpuffer pH 7,4 aus  
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)  
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)  
Pentobarbital-Natrium (Merial, Hallbergmoos, Deutschland)  
Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
Methanol (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)  
Wasserstoffperoxid (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)  
BSA (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)  
NGS (Biozol Diagnostika; Eching, Deutschland)  
NHS (Biozol Diagnostika; Eching, Deutschland)  
ABC Elite (Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, USA)  
DAB (Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland)  
Entellan (Merck; Darmstadt, Deutschland)  
Triton (Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland)  
Essigsäure (Baker, Deventer, Holland)  
Natriumacetat (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)  
Kresylechtviolett (Schuchardt, München, Deutschland)  
Ethanol (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)  
Xylol (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)  
Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)  
Roti Quant (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)  
CRF-ELISA-Kit High Sensitivity 450nm (Cosmobio; Tokio, Japan)  
BDNF-Emax-ImmunoAssay-System 450 nm (Promega Corporation; Madison, USA)  
NT3-Emax-ImmunoAssay-System 450 nm (Promega Corporation; Madison, USA)  
NGF-Emax-ImmunoAssay-System 450 nm (Promega Corporation; Madison, USA)  
RNA-later Lösung (Ambion, Austin, Texas, USA)  
Revert-Aid-First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit (Fermentas, Waltham, USA)  
Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA)  
Chloroform (Carl Roth GmbH; Karlsruhe, Deutschland)  
Isopropanol (Zentral Apotheke OvGU, Magdeburg, Deutschland)  
DEPC-Wasser (Roche, Basel, Schweiz)  
Maxima-SYBR-Green-Mastermix (Fermentas, Waltham, USA)  
Ampuwa (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland)

## Primer

Primer	Sequenz
NT-3	
vorwärts	5' atg att gca acg gac aca ga 3'
rückwärts	5' aaa ggg gtg ctg tca ctc ag 3'
CRF	
vorwärts	5' ggg aga ggc ggt cgg agg ag 3'
rückwärts	5' tgc tct gcc cgg gcc att tc 3'
BDNF	
vorwärts	5' tgt ctg gcg gga cgg tca ca 3'
rückwärts	5' gcc cct gca gcc ttc ctt gg 3'
GAPDH	
vorwärts	5' ctt cac cac cat gga gaa ggc 3'
rückwärts	5' ggc atg gac tgt ggt cat gag 3'

Tabelle A.1: Sequenzen der verwendeten Primer

Primer	Temperatur in °C	Effizienz in %
NT-3	60	94,30
CRF	60	99,40
BDNF	60	90,10
GAPDH	60	94,20

Tabelle A.2: Temperaturoptimum und Effizienz der verwendeten Primer

## A.2 Protokolle

### A.2.1 Immunhistochemie (Free-Floating-Methode)

- alle Schritte finden auf dem Horizontalschüttler statt, wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur (RT)
- 40 µm Frontalschnitte, jeder 4. Schnitt (=eine Serie)
- dreimal 10 min Spülen in 0,1 M PB
- 9,5 ml PB mit 500 µl Methanol und 100 µl 30 %-igem Wasserstoffperoxid versetzen (frisch!) und für 10 min zu den Schnitten geben
- dreimal 10 min Spülen in 0,1 M PB
- 30 min Blockierung für polyklonalen NPY-Antikörper (9 ml PB, 1 g BSA, 1 ml NGS)
- primärer Antikörper inkubieren im Kühlschrank 48 h [monoklonaler Maus-Anti-PV-Antikörper (1:5000) oder polyklonaler Kaninchen-Anti-NPY-Antikörper (1:16000) in 0,1 M PB mit 1 % NHS bzw. NGS]
- dreimal 10 min Spülen in 0,1 M PB
- sekundärer Antikörper 1,5 h (NPY: Anti-Kaninchen 1:200; PV: Anti-Maus 1:200)
- dreimal 10 min Spülen in 0,1 M PB
- 1 h ABC-Elite (6ml PB, 52,8 µl A, 52,8 µl B)
- dreimal 10 min Spülen in 0,1 M PB
- DAB homogenisieren im Ultraschallbad, in 0,1 M PB lösen (0,05 %), steril filtrieren und mit Wasserstoffperoxid (0,03 %) versetzen (PV 4 min, NPY 5min)
- dreimal 10 min Spülen in 0,1 M PB
- auf Objektträger aufziehen und mit Entellan eindecken

### A.2.2 Modifizierte Nissl-Färbung mit Kresylechtviolett

- in 100 ml Acetatpuffer (pH 3,8-4,0; aus 1 Teil 2,72 %-iges Natriumacetat und 4 Teilen 1,20 %-ige Essigsäure) 0,5 g Kresylechtviolett lösen
- für 3,5 min in die gepufferte Farblösung stellen und in Acetatpuffer spülen
- zweimal in absolutem Ethanol und zweimal in Xylol entwässern
- mit Entellan eindecken

### A.2.3 RNA-Isolation

- Gewebe in TRIZOL homogenisieren 500 µl, 10 min, -15°C
- Inkubieren (löst Nukleoproteinkomplexe), 5 min, RT
- Chloroform hinzugeben und kräftig schütteln, 100 µl und Inkubieren, 2 min, RT
- Zentrifugieren 12.400 U/min, 15 min, 4°C
- Abnehmen der oberen wässrigen Phase (RNA) in neue RNase-freie Cups
- Isopropanol hinzugeben, 250 µl und Inkubieren, 10 min, RT
- Zentrifugieren 12.400 U/min, 10 min, 4°C
- Überstand verwerfen, Pellet (RNA) + 75 %-Ethanol, 500 µl, RT
- Vorsichtig vortexen, 1-2 min, RT und Zentrifugieren 9.800 U/min, 5 min, 4°C
- Überstand verwerfen, Pellet lufttrocknen, 10 min, 4°C
- Pellet in DEPC-Wasser lösen, 20 µl
- Einfrieren und Lagern bei -80°C

## A.3 Publikationen

Petzold S., Sommer B., Kröber A., Nitsch R., Schwegler H., Vogt J., Roskoden T. [2016]. NT-3 protein levels are enhanced in the hippocampus of PRG1-deficient mice but remain unchanged in PRG1/LPA2 double mutants, *Neuroscience Letters* **612**: 145-148.

Petzold S., Sommer B., Schwegler H., Nitsch R., Vogt J., Roskoden T. [2013]. Deficit in PRG1 gene leads to increased locomotor activity and reduced anxiety related behavior accompanied by morphological changes in mice, *22.-25. März 2013, Magdeburg, Deutschland*.