

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

**„Veränderungen im räumlichen Lernverhalten  
und der Morphologie des Hippocampus bei  
Plasticity Related Gene 1-defizienten Mäusen“**

**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 Babette Sommer  
aus Hohenberg an der Eger  
Magdeburg 2019

## **Bibliographische Beschreibung:**

**Sommer, Babette: Veränderung im räumlichen Lernverhalten und der Morphologie des Hippocampus bei Plasticity Related Gene 1-defizienten Mäusen. - 2019. – 89 Bl., 23 Abb., 1 Tab., 3 Anl.**

## **Kurzreferat**

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von PRG1 auf das räumliche Lernverhalten und die Morphologie des Hippocampus bei Mäusen untersucht. Dabei wurden homozygote, heterozygote PRG1-defiziente Tiere und ihre Wildtypgeschwister verglichen. Es wurde zunächst anhand zweier verschiedener Verhaltensmodelle eine erhöhte Aktivität der homozygot PRG1-defizienten Tiere im Acht-Arm-Radiallabyrinth und eine schlechtere Lernleistung aller PRG1-defizienten Mäuse gezeigt. Zudem konnte die Motility-Box ein motorisch-stereotypisches Verhalten darlegen. Immunhistochemisch konnte eine signifikant erhöhte Konzentration an NPY im Hippocampus der homozygot PRG1-defizienten Tiere gezeigt werden. Die PARV-immunpositiven Neurone im Septum und Hippocampus waren ebenso wie die ChAT-immunpositiven Neurone im Septum nicht signifikant verändert im Vergleich der Geschwister. Die TIMM-Färbung ergab allerdings einen signifikant erhöhten Anteil an Moosfasern im Gyrus dentatus sowie an infra/intrapiramidalen Fasern der homozygot PRG1-defizienten Tiere. Molekularbiologisch zeigten die Wachstumsfaktoren im Hippocampus mittels ELISA einen Trend zur erhöhten BDNF-Konzentration der homozygot PRG1-defizienten Tiere. NT3 war bei beiden Gruppen der PRG1-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern erhöht, wobei die homozygot PRG1-defizienten Tiere absolut die höheren Werte zeigten. NGF erbrachte ebenso wie das Hormon CRF keinen Unterschied innerhalb der drei Gruppen. Die Arbeit bestätigt damit den Einfluss von PRG1 auf das Verhalten der PRG1-defizienten Tiere und liefert wichtige Hinweise für morphologische und molekularbiologische Veränderungen im Hippocampus dieser Tiere.

## **Schlüsselwörter**

PRG1 – Hippocampus – Moosfasern – räumliches Lernen

## Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungsverzeichnis	6
2.	Einführung	8
2.1.	Plasticity Related Genes- PRG	8
2.1.1.	PRG1	9
2.2.	Das glutamaterge System	11
2.3.	Hippocampus	15
2.3.1.	Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau und Schichtengliederung	15
2.3.2.	Faserverbindungen des Hippocampus	16
2.3.3.	Erregungsausbreitung des Hippocampus	17
2.4.	Lernen und Gedächtnis	17
2.4.1.	Die Rolle des Hippocampus beim Lernen als Teil des limbischen Systems und des Papez-Neuronenkreis	19
2.4.2.	Lernen mit Verhaltensmodellen	20
2.5.	Neurotrophine	21
2.5.1.	Nerve growth factor – NGF	21
2.5.2.	Brain derived neurotrophic factor – BDNF	22
2.5.3.	Neurotrophin 3 – NT3	23
2.6.	Ziel der Arbeit	24
3.	Material und Methoden	25
3.1.	Tiere und Behandlung	25
3.2.	Verhalten	25
3.2.1.	Open Field – Motility-Box	25
3.2.2.	Acht-Arm-Radiallabyrinth	26
3.3.	Immunhistochemie	28
3.4.	TIMM- Färbung	29
3.5.	Quantifizierung	30
3.5.1.	Quantifizierung der immunpositiven Neurone (Parvalbumin, NPY, ChAT)	30
3.5.2.	Quantifizierung der Flächen der Moosfasern im Hippocampus	31
3.6.	Quantifizierung der Nervenwachstumsfaktoren	32
3.6.1.	Vorbereitung der Gehirne	32
3.6.2.	Quantifizierung mittels Enzyme linked ImmunoSorbentAssay – ELISA	32
3.7.	Statistische Auswertung	33

4.	Ergebnisse	34
4.1.	Verhalten	34
4.1.1.	Motility-Box	34
4.1.2.	Acht-Arm-Radiallabyrinth	37
4.2.	Morphologie	43
4.2.1.	Immunhistochemische Färbungen	43
4.2.1.1.	PARV-immunpositive GABAerge Neurone	43
4.2.1.1.1.	Hippocampus	43
4.2.1.1.2.	Mediales Septum und Diagonales Band von Broca	44
4.2.1.2.	ChAT-immunpositive Neurone im MS/DB	45
4.2.1.3.	NPY-immunpositive Neurone im Hippocampus	46
4.2.2.	Darstellung glutamaterger Moosfasern im Hippocampus (TIMM-Färbung)	47
4.3.	Proteinbestimmung der Nervenwachstumsfaktoren und von CRF mittels ELISA	48
4.3.1.	NGF	49
4.3.2.	BDNF	49
4.3.3.	NT3	51
4.3.4.	CRF	52
5.	Diskussion	53
5.1.	Einleitung	53
5.2.	Einfluss von PRG1 auf das Verhalten	54
5.2.1.	Open Field Verhalten - Motility-Box	54
5.2.2.	Acht-Arm-Radiallabyrinth	55
5.3.	Einfluss von PRG1 auf die Morphologie	57
5.4.	Einfluss von PRG1 auf die Wachstumsfaktoren	59
5.5.	Schlussfolgerung	61
6.	Zusammenfassung	63
7.	Literaturverzeichnis	64
8.	Danksagung	80
9.	Ehrenerklärung	81

10.	Bildungsweg	82
11.	Anlagen	83
11.1.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	83
11.2.	Protokolle	84
11.2.1.	NISSL – Färbung	84
11.2.2.	Immunhistochemie – Protokolle	84
11.2.2.1.	PARV – Immunhistochemie	84
11.2.2.2.	ChAT – Immunhistochemie	85
11.2.2.3.	NPY – Immunhistochemie	85
11.2.3.	Protokoll TIMM – Färbung	86
11.2.4.	ELISA – Protokolle	87
11.2.4.1.	NGF – ELISA	87
11.2.4.2.	BDNF – ELISA	87
11.2.4.3.	NT3 – ELISA	88
11.2.4.4.	CRF – ELISA	88
11.3.	Publikation und Posterpräsentation	89
11.3.1.	Publikation	89
11.3.2.	Posterpräsentation	89

## 1. Abkürzungsverzeichnis

### 1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5 methylisoxazole-4 propionic acid
ANOVA	Analysis of Variance
APV	2-Amino 5-phosphonovaleric
AS	Aminosäure
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATX	Autotaxin
BDNF	Brain- derived neurotrophic Factor
CA	Cornu ammonis
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
ChAT	Cholinacetyltransferase
CNQX	6-cyano-7nitroquinoxaline-2,3,-dione
CRF	Corticotropin Releasing Factor
C-1-P	Ceramid 1-phosphat
DAB	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DAG	Diacylglycerol
DB	Diagonales Band von Broca
df	degrees of freedom (Freiheitsgrade)
DG	Gyrus dentatus
ELISA	Enzyme linked Immuno Sorbent Assay
FD	Fascia dentata
FI	Fimbria hippocampi
GABA	Gamma- Aminobuttersäure
GC	Stratum granulare
GluR	Glutamat- Rezeptor
GTPase	Guanosine-5-triphosphatase
HE	heterozygote Mäuse
HRP	horseradish peroxidase
IL	Interleukin
IIPMF	infra/intrapiramidale Moosfasern
KO	knock-out Mäuse
LM	Stratum lacunosum-moleculare
LPA	Lysophosphatidat
LPAR	Lysophosphatidat- Rezeptor
LPP	Lipid Phosphat Phosphatasen
LTP	Langzeitpotenzierung
lysoPLD	Lysophospholipase D
MAG	Monoacylglycerol
mGluR	metabolischer Glutamatrezeptor
MF	Moosfasern
ML	mittlere Molekularschicht der Fascia dentata
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MS	mediales Septum
Munc 13/18	mammalian unc 13/18 homolog
nArms	new Arm entries
NGF	Nerve Growth Factor
NMDA	N- methyl-D Aspartat
NPP2	ectoNukleotidPyrophosphatase/Phosphodiesterase
NPY	Neuropeptid Y
NSF	N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein
NT 3	Neurotrophin 3
OL	äußere Molekularschicht der Fascia dentata
OR	Stratum oriens

## 1. Abkürzungsverzeichnis

PA	Phosphatidat
PARV	Parvalbumin
PB	Phosphatpuffer
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
PMMA	Polymethylmethacrylat
PP2A	Phosphatase 2A
PRG	Plasticity Related Gene
PY	Stratum pyramidales
p75NTR	p75 Neurotrophinrezeptor
Rab	Ras- related in brain
RD	Stratum radiatum
RIM	Rab3- interacting molecule
SA-HRP	Streptavidin-Meerrettichperoxidase
SG	supragranuläre Schicht
SGZ	subgranuläre Zone
SNAP	soluble NSF-Attachment protein
SNARE	soluble-N-ethylmaleimide-sensitive- factor attachment receptors
SPMF	suprapyramidale Moosfasern
SVZ	subventrikuläre Zone
S-1-P	Sphingosin 1-phosphat
TBST	Tris buffered salin with Tween 20
TMB	Tetramethylbenzidin
TrK	Tyrosinkinaserzeptor
t-SNARE	target-SNARE
v-SNARE	vesicle-SNARE
WME	Working memory error
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

## 2. Einführung

### 2. Einführung

#### 2.1. Plasticity Related Genes - PRG

Im Jahr 2003 wurde durch Bräuer und Mitarbeiter das Plasticity Related Gene 1 (PRG1) erstmals beschrieben. Es wird im Hippocampus während der Entwicklung und nach entorhinaler Cortextläsion exprimiert und ermöglicht das Aussprossen von Axonen (Bräuer et al. 2003). Bisher wurden durch Sequenzvergleiche vier weitere Mitglieder der Plasticity Related Gen Familie (PRG2 bis PRG5) entdeckt, die vertebraten- und gehirnspezifisch exprimiert werden (Sigal et al. 2005; Bräuer und Nitsch 2008). Alle fünf Mitglieder gleichen sich in ihren sechs N-terminalen Transmembrandomänen und einem hydrophilen, intrazellulären C-Terminus. Sie unterscheiden sich in ihrer Anzahl von Aminosäuren (AS) und der Länge ihres C-Terminus und können so in Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe, bestehend aus PRG1 (763 AS, Abb. 1) und PRG2 (746 AS), besitzt einen ca. 400 AS langen C-Terminus. Ähnlich sind auch humanes PRG3 (325 AS) und PRG5 (316 AS) als zweite Gruppe mit ihrem ca. 50 AS langen hydrophilen C-Terminus. PRG4 hat als eigene dritte Gruppe mit 343 AS weniger Ähnlichkeiten mit den anderen vier zuvor beschriebenen Molekülen (Savaskan et al. 2004; Bräuer und Nitsch 2008; Sigal et al. 2005; Sigal et al. 2007; Brogini et al. 2010).

Es zeigt sich eine große Sequenzhomologie der Transmembrandomänen zu den Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP), weshalb die PRGs der LPP-Superfamilie zugerechnet werden (Brindley 2004; Sigal et al. 2005). LPPs bestehen aus sechs membrandurchspannenden hydrophoben Einheiten mit drei extrazellulären Schleifen mit enzymatischer Funktion. Die katalytischen Zentren befinden sich auf der zweiten und dritten Schleife der extrazellulären Seite der Plasmamembran bzw. luminal bei intrazellulären Membransystemen (Sigal et al. 2005; Brindley et al. 2002; Brindley et al. 2009). Sie sind vorwiegend in Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und in Plasmamembranen lokalisiert (Sigal et al. 2005) und regulieren den Abbau und die Konzentration verschiedener Phospholipide wie Phosphatidat (PA), Lysophosphatidat (LPA), Ceramid 1-phosphat (C-1-P), Sphingosin 1-phosphat (S-1-P) und Diacylglycerol (DAG) Pyrophosphat durch Dephosphorylierung mittels Hydrolyse (Brindley 2004; Brindley et al. 2002; Brindley und Pilquil 2009). Bisher wurden drei Splicing-Varianten der LPPs identifiziert (LPP1-3) (Brindley und Pilquil 2009; Sigal et al. 2005; Brindley und Waggoner 1998). Alle drei LPPs wurden im cerebralen Gewebe detektiert, wobei die Konzentration von LPP2 am niedrigsten liegt (Sigal et al. 2005). LPP1 und LPP3 werden zudem in vielen weiteren Geweben und Organen, darunter das periphere Nervensystem, der Uterus, die Nieren, die Brustdrüsen, die Prostata und das Gefäßsystem, exprimiert (Sigal et al. 2005), während die Konzentration von LPP2 auf einige wenige Gewebe wie Darm, Pankreas und Uterus beschränkt ist (Sigal et al. 2005).

## 2. Einführung

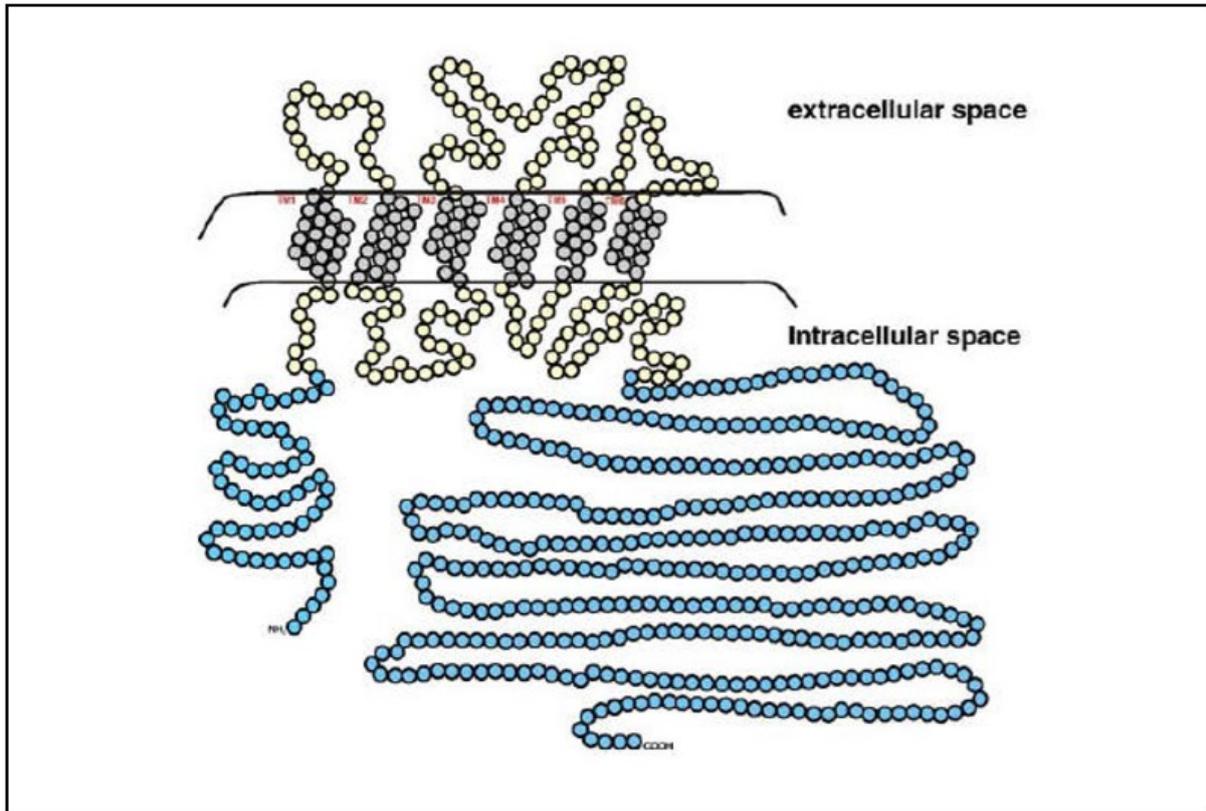


Abb.1 PRG1 in der postsynaptischen Membran mit den sechs membrandurchspannenden Domänen, den 3 extrazellulären Schleifen und dem intrazellulären C- und N-Terminus (nach Bräuer und Nitsch 2008).

### 2.1.1 PRG1

PRG1 wurde im Jahr 2003 von Bräuer und Mitarbeitern an der Postsynapse glutamaterger Neurone entdeckt (Bräuer et al. 2003). Es kontrolliert die Konzentration vieler Phospholipide u.a. von PA, S-1-P, aber auch der LPAs (Trimbuch et al. 2009) und macht diese Lipide funktionsunfähig. LPAs haben vielfältige Aufgaben und beeinflussen die Neurogenese (Kingsbury et al. 2004), Zellproliferation (van Corven et al. 1989), Zellmigration (Lümmen et al. 1997), Neuritenretraktion (Fukushima et al. 2002; Jalink et al. 1993; Tigyi und Miledi 1992) und corticale Entwicklungsprozesse (Kingsbury et al. 2003; Kingsbury et al. 2004). Extracerebral fungieren sie als Faktor für die Blutzellaggregation (Schumacher et al. 1979; Tokumura et al. 1981). Zusätzlich spielen sie im kardiovaskulären System (Smyth et al. 2003) u.a. bei der Arteriosklerose, der Adipositasentstehung (van Meeteren und Moolenaar 2007), beim Gefäßremodeling und dem Tumorwachstum eine Rolle (Bräuer und Nitsch 2008). Auch das Immunsystem, Reproduktionssystem sowie Entzündungsreaktionen (Choi et al. 2010; Okudaira et al. 2010; Meyer zu Heringdorf und Jakobs 2007) und die Freisetzung von Zytokinen in Krebszellen (IL-6, IL-8), Fibroblasten, Leukozyten und epithelialen/endothelialen Zellen sind von den Signalwegen der LPAs betroffen (van Meeteren und Moolenaar 2007). Sie

## 2. Einführung

lösen dabei über sechs verschiedenen LPA-Rezeptoren (LPA<sub>1-6</sub>R) G-Protein gekoppelte Signalkaskaden aus (Chun et al. 2010; Fukushima et al. 2002).

Vor allem LPA<sub>1</sub>R und LPA<sub>2</sub>R sind an Entwicklungsprozessen des Gehirns wie der Regulation der Neurogenese, der Myelinisierung der Schwann-Zellen (Weiner et al. 2001), der Plastizität und Neuritenretraktion beteiligt (Kingsbury et al. 2003; van Meeteren und Moolenaar 2007). Zusätzlich sind diese beiden Rezeptoren in die Karzinomentstehung involviert (Choi et al. 2010). LPA<sub>1</sub>R spielt außerdem beim neuropathischen Schmerz, der Nierenfibrose, der Lungenfibrose, im Geruchssystem und der männlichen Fertilität eine Rolle (Choi et al. 2010; van Meeteren und Moolenaar 2007). Der LPA<sub>2</sub>R ist auf Neuronen am stärksten exprimiert (Dissertation Trimbuch 2009), hat aber auch außerhalb des Nervensystems eine Bedeutung bei der männlichen Fortpflanzung sowie beim Asthma bronchiale (Chun et al. 2010). Die anderen LPA<sub>3-6</sub>Ren haben vor allem nicht-neuronale Effekte bei der Embryoimplantation in den Uterus und der männlichen Fertilität (beide LPA<sub>3</sub>R), der Zellmotilität (LPA<sub>4</sub>R), Blut- und Lymphgefäßformation (LPA<sub>4</sub>R), Thrombozytenfunktion (LPA<sub>5</sub>R) sowie dem Carcinom der Harnblase und dem Haarwachstum (beide LPA<sub>6</sub>R) (Choi et al. 2010).

Alle LPA<sub>1-6</sub>Ren lösen über ein heterotrimeres G-Protein (G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub>, G<sub>12/13</sub>, G<sub>s</sub>) eine spezifische second-messenger Kaskade aus, wodurch die Kalziumhomöostase, das Zytoskelett, das Wachstum, das Überleben, sowie die Ausbreitung und Anlagerung an Zellen beeinflusst wird (Meyer zu Heringdorf und Jakobs 2007).

LPAs werden zum einen durch die Lysophospholipase D (lysoPLD), die Autotaxin (ATX), einer ectoNukleotidPyrophosphatase/Phosphodiesterase (NPP2), entspricht, gebildet (Stracke et al. 1992; Tokumura et al. 2002). Zum anderen verläuft die extrazelluläre LPA-Bildung während Entzündungsreaktionen Phospholipase A2 (PLA2)-gesteuert (Neidlinger et al. 2006). Der Abbau zu Monoacylglycerol (MAG) wird sowohl über membrangebundene als auch über lösliche LPPs gesteuert (Brindley 2004; van Meeteren und Moolenaar 2007). Bisher wurden die LPAs in verschiedenen Flüssigkeiten wie Speichel (Sugiura et al. 2002), Samen/Follikelflüssigkeit (Hama et al. 2002; Tokumura et al. 1999), Liquor (Sato et al. 2005) und Serum (Eichholtz et al. 1993) nachgewiesen.

Zunächst wurde von Bräuer und Mitarbeitern angenommen, dass PRG1 den Abbau durch die extrazellulären Schleifen, ähnlich wie die LPPs, mittels Phosphataseaktivität beeinflusst (Bräuer et al. 2003; Bräuer und Nitsch 2008). Das Abbauprodukt der LPAs, MAG, konnte in vivo fünffach erhöht nachgewiesen werden und auch die Neuritenretraktion wurde nach Exposition mit LPA durch eine Überexpression von PRG1 eliminiert (Bräuer et al. 2003). Allerdings konnte das Phosphatasemotiv der LPPs bei PRG1 nicht nachgewiesen werden (Brindley 2004; Zhang et al. 2000). Zusammenschauend geht man momentan von einer indirekten Stimulation anderer LPPs durch PRG1 aus, was zu einer Modulation des LPA-

## 2. Einführung

Einflusses führt (Brindley 2004; McDermott et al. 2004). Es wird auch eine rezeptorähnliche Funktion diskutiert, durch die, ähnlich wie bei anderen Proteinfamilien, das inaktive Homologe als sogenanntes Nonenzym, dennoch mit dem jeweiligen Substrat reagiert (Nandurkar et al. 2001; Todd et al. 2002). PRG1 erhöht die LPA-Aufnahme in die postsynaptische Zelle (Trimbuch et al. 2009; Vogt et al. 2016). Zusätzlich wird angenommen, dass es von der Postsynapse aus mit dem präsynaptischen LPA<sub>2</sub>R über LPA interagiert (Trimbuch et al. 2009). Wie dies genau geschieht, ist noch nicht letztendlich geklärt. Möglicherweise wird die Exzitation über die Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration und nachfolgende Transmitterfreisetzung reguliert (Bräuer und Nitsch 2008; Tokumitsu et al. 2010). Mittlerweile geht man davon aus, dass über diesen nicht-zellautonomen Mechanismus die Hyperexzitation reguliert wird, während das räumliche Lernen und die synaptische Plastizität zellautonom gesteuert wird. Dabei bindet das an der postsynaptischen Membran gelegene PRG1 durch seinen intrazellulär gelegenen C-Terminus an die Proteinphosphatase 2A (PP2A), die weiter via  $\beta$ 1-Integrin reagiert (Liu et al. 2016).

PRG1 wird perinatal, im Mausmodell ab Embryonaltag 19, und nach Gehirnschädigungen auf neu wachsenden Axonen exprimiert (Bräuer und Nitsch 2008) und ist damit an der Ausbreitung von Neuriten und ihrem Wachstum, der Reorganisation nach Verletzungen und der Führung von Axonen beteiligt (Trimbuch et al. 2009). Wie bereits erwähnt, wird die Expression nach entorhinaler Cortexläsion und während des Wachstums im Hippocampus hochreguliert (Bräuer und Nitsch 2008). Homozygoten PRG1-defizienten Mäusen fehlt das PRG1 und damit die Fähigkeit, phosphorylierte Lipide zu verändern (Trimbuch et al. 2009). Der Überschuss an LPA führt zu einer Übererregung der glutamatergen Neurone. Dies bedeutet eine eingeschränkte Verarbeitung der synaptischen Information sowie damit einhergehend eine gestörte neuronale Netzwerksynchronisierung. Aufgrund der Überexzitation zeigten ca. 50% der Jungtiere bis zum Alter von 2 Wochen epileptische Anfälle (Trimbuch et al. 2009). Morphologisch konnten jedoch keine Veränderungen gezeigt werden. Am ehesten sieht man die Ursache der Überexzitation im Rahmen der veränderten LPA-Signaltransduktion zwischen Prä- und Postsynapse (Trimbuch et al. 2009). Dagegen zeigten Tiere, bei denen sowohl das PRG1 als auch der LPA<sub>2</sub>R ausgeschaltet wurde, signifikant niedrigere postsynaptische Ströme und keine epileptischen Anfälle mehr (Trimbuch et al. 2009). Durch diesen gleichzeitigen knock-out von PRG1 und LPA<sub>2</sub>R können also übersteigerte Reaktionen des PRG1-Mangels teilweise kompensiert und wieder aufgehoben werden (Petzold et al. 2016).

### 2.2. Das glutamaterge System

Die Erregung vieler exzitatorischer Synapsen im Gehirn geschieht über den Neurotransmitter Glutamat. Er wird aus alpha-Ketoglutarat, einem Metaboliten des Citratzyklus, mit Hilfe eines

## 2. Einführung

Ammoniumions durch das Enzym Glutamatdehydrogenase synthetisiert. Für die Funktion als Transmitter wird es in Vesikel verpackt und in die Präsynapse transportiert. Nach seiner Ausschüttung und der Erregung der Postsynapse über unterschiedliche Rezeptoren wird es von Astrozyten aufgenommen und dort mit Hilfe des Enzyms Glutamatsynthase zu Glutamin umgewandelt. Glutamin kann in ein Neuron diffundieren und wieder mittels Hydrolyse zu Glutamat umgewandelt und damit recycelt werden (Kandel et al. 2013).

Als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem kommt es in den meisten Projektionsneuronen vor und ist an fast allen Hirnfunktionen beteiligt. Im Hippocampus wurde das glutamaterge System bisher am intensivsten untersucht, da es dort an der Langzeitpotenzierung (LTP) und damit an der Speicherung expliziter Gedächtnisinhalte beteiligt ist (Kandel et al. 2013; Morris et al. 1986). Auch während der Angstkonditionierung, an der u. a. die Amygdala und der präfrontale Cortex beteiligt sind, spielt die LTP und damit Glutamat eine wichtige Rolle (Rogan et al. 1997).

Glutamat löst sowohl an ionotropen als auch metabotropen Rezeptoren ein exzitatorisches Membranpotential aus (Dingledine et al. 1999). Beim ionotropen Rezeptor öffnet Glutamat direkt Ionenkanäle, die metabotropen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden indirekt durch eine second-messenger Kaskade aktiviert (Conn und Pin 1997; Dingledine et al. 1999).

Es lassen sich drei Haupttypen der ionotropen Glutamatrezeptoren unterscheiden, NMDA-(N-methyl-D Aspartat), AMPA-(alpha-amino-3-hydroxy-5 methylisoxazole-4 propionic acid) und Kainat-Rezeptoren. Da der NMDA-Rezeptor durch APV (2-Amino 5-phosphonovaleric) und der Kainat- sowie AMPA-Rezeptor durch CNQX (6-cyano-7nitroquinoxaline-2,3,-dione) geblockt werden können, nennt man beide letztgenannten auch non-NMDA-Rezeptoren (Kandel et al. 2013; Traynelis et al. 2010).

NMDA-Rezeptoren sind im Gegensatz zu non-NMDA-Rezeptoren, die durch Öffnen der Ionenkanäle für Natrium und Kalium permeabel werden, zusätzlich für Kalzium permeabel (Citri und Malenka 2008). Dies liegt am Austausch einer Aminosäure einer Untereinheit der Ionenkanäle, die ansonsten ähnlich aufgebaut sind (Kandel et al. 2013). Um seinen Ionenkanal zu öffnen, benötigt der NMDA-Rezeptor neben extrazellulärem Glycin auch ein gewisses Membranpotential, damit ein Magnesiumion, welches im Bereich des Ruhepotentials den Kanal blockiert, ausgestoßen wird (Citri und Malenka 2008; Kandel et al. 2013).

Das intrazelluläre Kalzium aktiviert verschiedene kalziumabhängige Signalkaskaden, so dass die elektrische Stimulation in ein biochemisches Signal umgewandelt wird und zur Veränderung der Synapse und der Stärke der Verbindung führt. Eine zu hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration führt über Proteasen und Phospholipasen zu einer erhöhten Konzentration an freien Radikalen und wirkt toxisch (Kandel et al. 2013).

## 2. Einführung

Es sind acht verschiedene Arten von metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) bekannt, an deren Ende das Glutamat bindet (Conn und Pin 1997). Sie werden nach ihrem Aufbau, ihren Eigenschaften, den intrazellulär G-Protein gekoppelten Signalkaskaden sowie ihrer Lokalisation in drei verschiedene Gruppen eingeteilt (Shigemoto et al. 1997; Swanson et al. 2005).

An der glutamatergen Synapse spielt die Transmitterfreisetzung an der präsynaptischen Membran eine entscheidende Rolle. An der Präsynapse werden bei Eintreffen des Potentials Kalziumkanäle geöffnet (Katz und Miledi 1967). Diese Kalziumkanäle befinden sich an der präsynaptischen Membran, genau gegenüber den Ionenkanälen der postsynaptischen Membran, in einer aktiven Zone (Robitaille et al. 1990) um dort sowohl die Depolarisation zu verstärken als auch als biochemisches Signal den Vorgang der Transmitterfreisetzung als second-messenger zu starten (Katz und Miledi 1967). Die Transmitter werden in Vesikeln gespeichert und in Quanten entlassen. In der Membran der Vesikel sind viele wichtige Proteine untergebracht. Unter anderem die Transmitter-Transporter, die das Glutamat in den Vesikel befördern (Kandel et al. 2013). Es finden sich aber auch Proteine, die die Vesikel zu der Stelle der Freisetzung führen, die mittels Exozytose an der Freisetzung mitwirken und die die Regeneration der Vesikelmembran unterstützen.

Synapsin sitzt an der zytoplasmatischen Seite des Vesikels und wird sowohl von der Proteinkinase A als auch von der Kalzium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase I nach dem Einstrom der Kalziumionen in die Präsynapse phosphoryliert und vom Vesikel freigelassen, um den Reservepool der Vesikel für die Transmitterfreilassung zu mobilisieren (Gitler et al. 2004). Um die Energie für die Membranfusion der synaptischen Membran und der Vesikelmembran aufzubringen, sind die SNARE (soluble-N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptors)-Proteine beteiligt. Man unterscheidet dabei v-SNARE (vesicle-SNARE)-Proteine, die sich an der Vesikelmembran befinden und t-SNARE-Proteinen (target-SNARE), die sich in der Plasmamembran befinden (Kandel et al. 2013). Während des Exozytosevorgangs verbindet sich das v-SNARE-Motiv des Vesikels, Synaptobrevin, mit den beiden SNARE-Motiven der Membran, SNAP (soluble NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) -Attachment protein)-25 und Syntaxin, zu einem SNARE-Komplex. Synaptobrevin interagiert mit Synaptophysin I/II. Dabei kommt das Synaptophysin I in nahezu allen neuronalen Zellen vor, das Synaptophysin II vor allem an den Moosfasern (MF) des Hippocampus (McMahon et al. 1996). Es reguliert den SNARE-Komplex, die Transmitterfreisetzung und die Exo-Endozytose (Valtorta et al. 2004). Zusätzlich wird noch das intrazelluläre, präsynaptische Munc 18 (mammalian unc 18 homolog) Protein benötigt, das an das Syntaxin bindet (Rizo et al. 2006; Rizo und Südhof 2002).

## 2. Einführung

Für die unmittelbare Fusion der Vesikel mit der Zellmembran sowie die frühzeitige Anlagerung an die präsynaptische Membran beim ersten Kalziumeinstrom sorgt das Kalzium-gesteuerte Protein Synaptotagmin (Schiavo et al. 1997; Zimmerberg et al. 2006).

Die Proteine RIM (Rab3- interacting molecules) und Munc 13 führen zu einem wichtigen Schritt der Exozytose. Sie sind Teil der zytoskelettalen Matrix der präsynaptischen aktiven Zone und fest mit ihr verbunden. Die beiden Proteine werden durch ein Vesikelmembranprotein der Rab3 Familie gebunden, das eine GTPase beinhaltet. Die Phosphorylierung von RIM durch cAMP-abhängigen Proteinkinasen nach dem Kalziumeinstrom ist ein Schlüsselschritt der Langzeitverstärkung der Transmitterausschüttung beim Lernen und der Gedächtnisbildung. Die Regulation von Munc 13 spielt eine entscheidende Rolle bei der kurzfristigen Plastizität der Gedächtnisbildung (Betz et al. 2001; Kandel et al. 2013).

Um den Komplex nach dem Exozytosevorgang aufzulösen, bindet die zytoplasmatische ATPase NSF mittels SNAP an den Vesikel um mit der Hilfe von ATP den SNARE-Komplex von der Plasmamembran zu befreien (Rizo und Südhof 2002).

Postsynaptisch befindet sich in den Endigungen mit unmittelbarer Assoziation zum Zytoskelett Synaptopodin. Es wird cerebral im Bulbus olfactorius, Striatum, dem cerebralen Cortex und dem Hippocampus exprimiert (Deller et al. 2000; Mundel et al. 1997). Außerhalb des Gehirns wurde es in Podozyten der Niere beschrieben (Asanuma et al. 2005). Synaptopodin greift mittels Änderung des dendritischen, strukturell sehr dynamischen Spineapparates in die Langzeitpotenzierung und damit postsynaptisch in das Lernverhalten ein. Durch die Verbindung zu Kalziumspeichern werden mGluR1 in die postsynaptische Membran eingebaut, was zusätzlich zur glutamatabhängigen Langzeitpotenzierung führt (Segal et al. 2010).

Normalerweise wird der Kalziumeinstrom schnell durch zytoplasmatische kalciumbindende Proteine und die Mitochondrien abgefangen, zusätzlich bestehen noch transmembranöse Transporter, die das Kalzium-Ion aus der Zelle befördern. Sobald aber durch einen tetanischen Reiz viel Kalzium in die Zelle fließt, sind die Systeme überlastet und Kalzium befindet sich im Überschuss in der präsynaptischen Zelle. Dies führt zu einer erhöhten Transmitterausschüttung durch Aktivierung von Kalzium/Calmodulin abhängigen Proteinkinasen (Kandel et al. 2013).

Welche Rolle die Wechselwirkung von PRG1 und LPA<sub>2</sub>R in der Glutamatfreisetzung spielt, ist noch unklar. Vermutlich kommt diesen beiden Molekülen die Rolle eines Modulators der Aktivität zu. Sie sind beide in den Membranen eingebaut und haben damit möglicherweise einen Einfluss auf die Fluidität und somit die Interaktion oben beschriebener Moleküle.

## **2.3. Hippocampus**

### **2.3.1. Makroskopischer und mikroskopischer Aufbau und Schichtengliederung**

Beim Menschen liegt der Hippocampus als Teil des Archicortex zwischen dem Temporallappen und der medialen Wand des Seitenventrikels. Dort beginnt der Hauptteil (Hippocampus retrocommisuralis) als tatzenförmige Struktur, dem Pes hippocampi, und zieht sich erst nach occipital und dann nach superior/dorsal bis in die Nähe des Splenium des Corpus callosum. Von dort zieht ein kleiner Teil (Pars supracommisuralis) als dünnes Band, dem Indusium griseum, über den Balken bis zur Area subcallosa. Die Fimbria hippocampi, die medial und oben am Hippocampus zu finden sind, trennen sich unter dem Balken vom Hippocampus und ziehen als Fornix vor allem in die Corpora mamillaria (Trepel 2006; Kahle und Frotscher 2001). Bei der Maus liegt er weiter kranial, direkt unterhalb des Cortex. Zudem verläuft er im Vergleich zum Menschen medial in der Nähe des Septums nach ventral.

In Abb. 2 erkennt man mittels eines Frontalschnittes durch den Hippocampus ein eingerolltes Band, das Cornu Ammonis (CA), welches neben dem Gyrus dentatus liegt (DG). Das CA wird in 3 Abschnitte eingeteilt (CA1-3), die vor allem nach Breite, Zellgröße und -dichte der Pyramidenzellen eingeteilt sind (Kahle und Frotscher 2001). Die CA-Region wird vom Ventrikel beginnend wie folgt in Schichten unterteilt: zunächst der Alveus, der überwiegend die efferenten Fasern führt, die den Fornix bilden. In der folgenden Schicht, dem Stratum oriens, erkennt man die Zellkörper der Korbzellen, die über Axonkollateralen der Pyramidenzellen erregt werden und deren Axone ein dichtes Fasergeflecht mit hemmenden Synapsen um die Pyramidenzellen bilden. Die Pyramidenzellen stellen wiederum das Stratum pyramidale dar. Die apikalen Dendriten dieser Pyramidenzellen sind dem nächstgelegenen Stratum radiatum zugekehrt, die basalen Dendriten dem Stratum oriens. Somit sind die Dendritenbäume in beide Richtungen verzweigt, die Basalen reichen über das Stratum radiatum hinaus in das Stratum lacunosum-molekulare in dem die Afferenzen der Regio entorhinalis eintreffen. Das Stratum lucidum lässt sich nur in der CA3 Region abgrenzen, in dem die MF verlaufen (Kahle und Frotscher 2001).

## 2. Einführung

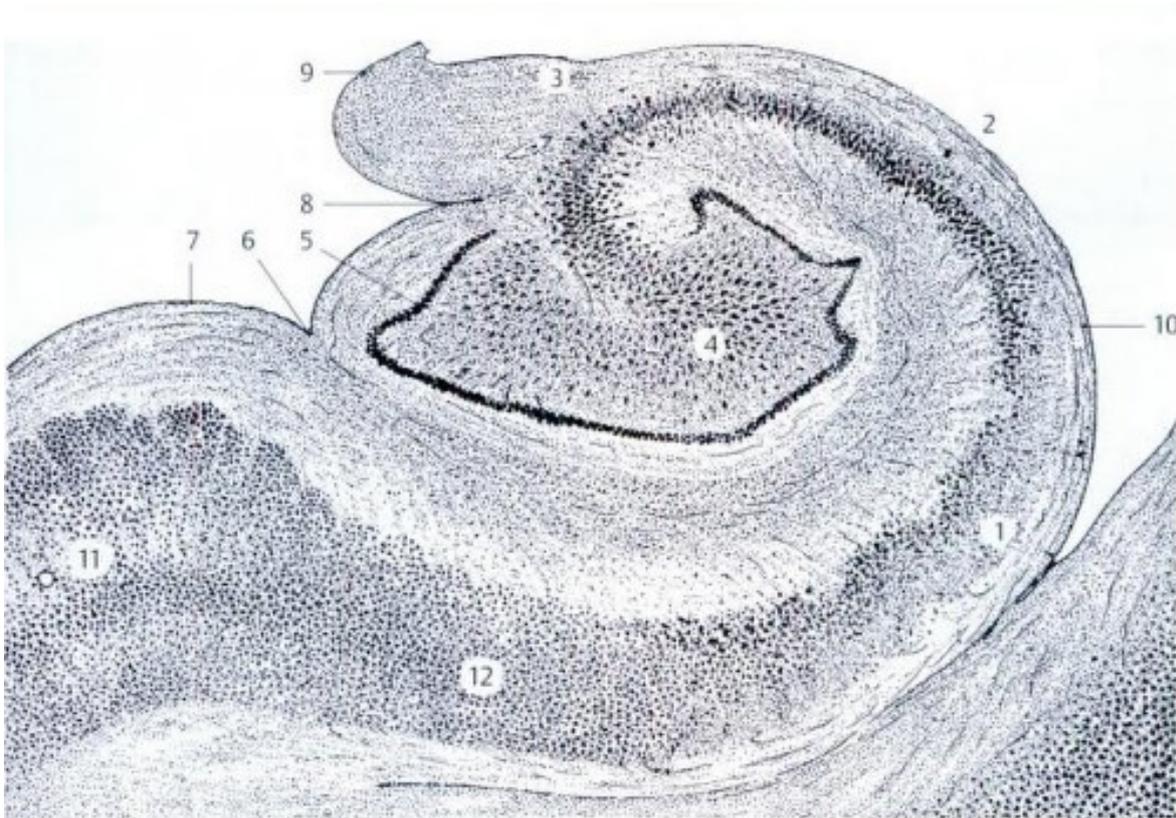


Abb.2 Ein Frontalschnitt durch den menschlichen Hippocampus. 1, 2, 3 und 4 stellen die CA1-CA3-Regionen dar. Umrahmt wird sie von der Fascia dentata des Gyrus dentatus (5). Zusätzlich erkennt man noch Sulcus hippocampi (6), Gyrus parahippocampalis (7) sowie den Sulcus fimbriodentatus (8). Ventrikelseitig zeigt sich der Alveus hippocampi (10). Das Subiculum (12) markiert die Übergangsschicht zur entorhinalen Rinde (11) (Kahle und Frotscher 2001)

Der DG wird in das Stratum moleculare, das Stratum granulare, in dem sich die Körnerzellen befinden, und den Hilus Fascia dentatae eingeteilt. Das Stratum moleculare des DG, in dem ebenfalls Fasern des Tractus perforans enden, besteht aus den Dendriten der Körnerzellen und wird weiter in eine innere und äußere Schicht eingeteilt.

### 2.3.2. Faserverbindungen des Hippocampus

Als eine bedeutende afferente Bahn gilt der Tractus perforans, der aus der Regio entorhinalis über das Subiculum corticale, glutamaterge Afferenzen aus der Regio praepiriformis, dem Corpus amygdaloideum und verschiedenen Bezirken des Neocortex (Kahle und Frotscher 2001) in das Stratum moleculare sowohl an die Dendriten der Körnerzellen des DG als auch der Pyramidenzellen des CA führt. An den proximalen Dendriten der Körnerzellen enden auch

## 2. Einführung

glutamaterge Kommissurfasern aus dem kontralateralen Hippocampus. Zusätzlich enden ebenfalls glutamaterge Schaffer-Kollaterale an den apikalen Dendriten im Stratum radiatum der CA-Region (CA1). Weiterhin terminieren sowohl GABAerge als auch cholinerge Neurone aus dem medialen Septum (MS) und diagonalen Band von Broca (DB) im Hippocampus, wobei die GABAergen Neurone gezielt auf GABAerge Neurone des Hippocampus projizieren, die cholinergen Fasern jedoch auf unterschiedliche Neurone verschalten (Bähr und Frotscher 2014). Daneben projizieren serotonerge, noradrenerge und dopaminerge Fasern in den Hippocampus.

### 2.3.3. Erregungsausbreitung des Hippocampus

Es finden sich zahlreiche glutamaterge Synapsen an glutamatergen Neuronen im Hippocampus. Zum einen verläuft ein direkter Weg von der Lamina III des entorhinalen Cortex zu dem distalen Abschnitt der apikalen Dendriten der CA1-Region und endet dort mittels glutamaterger Synapsen. Der indirekte Weg führt von der Lamina II des entorhinalen Cortex über den trisynaptischen Weg zunächst mittels glutamaterger Neurone zu den Körnerzellen des DG, die ihrerseits wieder über glutamaterge MF mit einem suprapyramidalen (SP) und infra/intrapiramidale Anteil (IIP) die Pyramidenzellen der CA3-Region erregen (Kandel et al. 2013). Von dort aus gelangt die Erregung über die glutamatergen Schaffer-Kollaterale letztendlich in die CA1-Region. Durch die Interneurone (Korb- und Chandaliere Zellen), die GABA als Transmitter benutzen, wird die Erregungsausbreitung innerhalb des Hippocampus gesteuert und kontrolliert (Bähr und Frotscher 2014). PRG1 wurde an der postsynaptischen Membran der exzitatorischen, glutamatergen Neurone der Körner- und Pyramidenzellen und postnatal im entorhinalen Cortex beschrieben (Bräuer et al. 2003; Trimbuch et al. 2009).

## 2.4. Lernen und Gedächtnis

Unter Gedächtnis versteht man die Fähigkeit des Gehirns, ankommende Informationen zu verschlüsseln, zu verstärken und diese abzuspeichern, um sie später wieder abrufen zu können (Kandel et al. 2013). Um dies zu gewährleisten, müssen im Gehirn während des Lernprozesses die Stärke der synaptischen Übertragung, d.h. die Funktion und/oder Stärke der Synapse verändert werden. Bereits 1949 formulierte der Psychologe Donald Olding Hebb in seinem Buch „Organization of Behavior“ folgenden, als Hebbsche Lernregel bekannt gewordenen Satz: „Wenn ein Axon der Zelle A[...] Zelle B erregt und wiederholt und dauerhaft zur Erzeugung von Aktionspotentialen in Zelle B beiträgt, so resultiert dies in Wachstumsprozessen oder metabolischen Veränderungen in einer oder in beiden Zellen, die bewirken, dass die Effizienz von Zelle A in Bezug auf die Erzeugung eines Aktionspotentials

## 2. Einführung

in B größer wird“ (Morris 1999). Die Neurogenese, als eine der extremsten Formen der synaptischen Plastizität, ist bisher im adulten Gehirn in der subgranulären Zone (SGZ) des DG, dem Bulbus olfactorius und der subventrikulären Zone (SVZ) nachgewiesen worden (Eriksson et al. 1998; Gould et al. 1999; Kornack und Rakic 1999, 2001). Diese neuronale Plastizität ist eine Grundlage vieler Lernprozesse (Meyer et al. 2014; Yang et al. 2014) und spielt eine entscheidende Rolle bei der Gedächtnisbildung im Zusammenhang mit dem Hippocampus.

Die chronologische Gliederung der Gedächtnisbildung unterscheidet das sensorische Gedächtnis, das nur wenige Millisekunden bis Sekunden anhält, von dem Kurzzeit- oder Arbeitsgedächtnis, das etwa 30 Sekunden andauert, sowie das Langzeitgedächtnis, das ein Leben lang fortbestehen kann. Das sensorische Gedächtnis schafft eine Verbindung zwischen Wahrnehmung und dem bleibenden Gedächtnis, indem unbewusst aus vielen Reizen der Außenwelt nach Verarbeitung die wichtigsten herausgefiltert und je nach Wichtigkeit an das Kurzzeitgedächtnis weitergeleitet werden (Atkinson und Shiffrin 1968, 1971).

Die Theorie des Arbeitsgedächtnisses folgt einer Mehrkomponententheorie aus dem Jahr 1974 von Alan D. Baddeley und Graham J. Hitch (Bower 1973; Gluck et al. 2008; Baddeley 2003). Durch Beobachtungen zeigte sich, dass es möglich ist, mehrere Aufgaben unterschiedlichen Typs zur gleichen Zeit zu bewerkstelligen, es allerdings schwierig ist, Aufgaben gleichen Typs gleichzeitig auszuführen. Dabei wird zwischen der zentralen Exekutive, die die Verteilung der Prioritäten der Arbeitsvorgänge regelt, und ihren untergeordneten Subsystemen der phonologischen Schleife, dem räumlich visuellen Notizblock und dem episodischen Puffer unterschieden. Der Letztgenannte wurde erst im Jahr 2000 ergänzt (Baddeley 2000). Im Jahr 1970 beschrieben Shallice und Warrington den Patienten H.F. der nach einer Läsion des linken perisylvischen Cortex ein extrem schlechtes Kurzzeitgedächtnis für akustisch dargebotene Buchstaben und Zahlen bot. Das Kurzzeitgedächtnis für visuelle Reize blieb allerdings intakt (Shallice und Warrington 1970). Das Arbeitsgedächtnis ist somit kein einheitliches System, sondern besteht aus modalitätsspezifischen Teilen (Baddeley 2003; Gluck et al. 2008).

Das Langzeitgedächtnis wird funktional in das implizite Gedächtnis sowie das explizite Gedächtnis unterteilt. Das implizite Gedächtnis umfasst das unbewusste Lernen wie das Priming, das prozedurale Gedächtnis, assoziatives Lernen, wie klassische und operante Konditionierung, und nicht assoziatives Lernen, wie Habituation und Sensitivierung. Im expliziten oder deklarativen Gedächtnis werden zum einen Fakten und Daten der Weltgeschichte (semantisches Gedächtnis), zum anderen Ereignisse der eigenen Biographie bewusst abgespeichert (Kandel et al. 2013).

## 2. Einführung

Die Existenz von Lang- und Kurzzeitgedächtnis als unterschiedliche Speichermodule wurde Mitte der 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts bewiesen. Der Patient H.M. litt aufgrund einer traumatischen Gehirnverletzung im jugendlichen Alter an einer schwer behandelbaren Temporallappenepilepsie. Nach Resektion beider Hippocampi, der Amygdalae und weiterer Teile des Temporallappens waren die Anfälle zwar besser kontrollierbar, der Patient hatte allerdings in bestimmten Bereichen eine schwerwiegende retrograde Amnesie. Das Arbeitsgedächtnis war intakt, zusätzlich konnte er sich gut an Dinge, die vor der Operation passiert waren, erinnern (Job, Name, Kindheit), auch wenn die Gedächtnisinhalte, die er vor der OP erlangt hatte, sehr fragil waren. H. M. konnte allerdings nichts mehr vom Arbeits- ins Langzeitgedächtnis transferieren, konnte sich keine Informationen über Plätze, Menschen oder Sachen über einen längeren Zeitraum merken. Unbewusst erlernte Dinge konnte er gut wiederholen, beim Erlernen von Inhalten des impliziten Gedächtnisses (motorische Fähigkeiten, reflektives Erlernen wie Habituation, Sensitivierung, klassische und operante Konditionierung sowie Priming) hatte der Patient keine Schwierigkeiten (Kandel et al. 2013; Scoville und Milner 1957; Squire und Larry 2009).

Die Informationen des expliziten Gedächtnisses werden durch Encodierung, Speicherung, Konsolidierung und Abruf der gespeicherten Daten verwaltet (Nakamaru 2016). Mittels Enkodierung werden ankommende Informationen in einem mehrstufigen Prozess aus ihren physikalischen Trägerprozessen in einen neuronalen Code übersetzt und weiterverarbeitet. Sie werden dabei mit ähnlichen, bereits existierenden Informationen verglichen und es wird ein Zusammenhang hergestellt. Die Speicherung und Konsolidierung der Information entsteht durch stetiges Wiederholen der Informationen, dafür sind strukturelle Veränderungen der Synapsen notwendig (Kandel et al. 2013).

Die Enkodierung findet im präfrontalen Cortex und Temporallappen statt. Nach einer bestimmten Zeit werden die Erinnerungen vermutlich aber in verschiedenen Cortexarealen abgespeichert. Dies zeigt der Erhalt bereits länger bestehender Gedächtnisinhalte nach Läsionen des medialen Temporallappens (Kandel et al. 2013).

### **2.4.1. Die Rolle des Hippocampus beim Lernen als Teil des limbischen Systems und des Papez-Neuronenkreis**

Der Hippocampus spielt eine zentrale Rolle im limbischen System unter anderem für das Lernen und die Gedächtnisbildung. Über weitere Bestandteile des limbischen Systems (Hippocampus, Gyrus hippocampalis mit Area entorhinalis, DG, Gyrus cinguli, Corpora mamillaria und Corpus amygdolideum) sind der Hippocampus, die Großhirnrinde, das Zwischen- und Mittelhirn über den Papez-Neuronenkreis verbunden (Bähr und Frotscher

## 2. Einführung

2014). Der Papez-Neuronenkreis wurde 1937 von James Papez postuliert, da er einen Zusammenhang dieser Faserverbindungen in der Regulation des emotionalen Trieb- und Affektverhaltens sowie der Motivation und Antriebe sah (Papez 1995). Mittlerweile weiß man über die Rolle des Kreises und des limbischen Systems bei der Gedächtniskonsolidierung. Man erkannte aber auch, dass das affektive Verhalten durch eine Läsion beeinflusst wird. Dabei sind beide Systeme keine isolierten Einheiten, sondern fungieren über ihre Verbindungen zu anderen Hirnbereichen. Es bestehen über den Hypothalamus und Thalamus Verbindungen zum präfrontalen Cortex, außerdem verbinden die Corpora mamillaria das System mit dem Mittelhirn und der Formatio reticularis (Bähr und Frotscher 2014).

### 2.4.2. Lernen mit Verhaltensmodellen

Durch verschiedene Verhaltensmodelle kann das räumliche Lernen und Gedächtnis bei Klein- und Nagetieren, in unserem Fall bei Mäusen, getestet werden. Neben dem Morris water maze, bei dem die Tiere schwimmenderweise in einer undurchsichtigen Flüssigkeit eine Plattform finden müssen, existieren noch das *T maze*, das *Radial arm maze* und das *Barnes maze* (Pritchett und Mulder 2003). Eine Habituation erfolgt bei allen Testsystemen. Wir entschieden uns bei unseren Untersuchungen für das *Radial arm maze*, um den Tieren den Stressfaktor „Wasser“ des *Morris water maze* zu nehmen und für eine geringere Beeinflussung der Lernleistung durch Stress zu sorgen. In diesen Lernmodellen kann man sowohl das räumliche als auch das nicht-räumliche Lernen untersuchen. Durch das *Radial arm maze* kann das räumliche Lernen sehr gut bestimmt werden, da hier das natürliche Verhalten, Futter zu sammeln genutzt wird. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit größeren IIPMF im Hippocampus dieses räumliche Lernen im *Radial arm maze* besser absolvieren (Crusio und Schwegler 2005; Gerlai et al. 2002). Allerdings muss bei dieser Testanordnung, ebenso wie beim *T maze*, das Versuchstier zur Steigerung der Motivation, Futterbelohnungen einzusammeln, futterdepriviert werden. Das *Radial arm maze* besteht im Allgemeinen aus 8 bis 12 Armen mit einer zentralen Plattform. Am Ende jedes Armes kann das Tier je nach Versuchsaufbau eine Belohnung erhalten. Im Rahmen der Verwendung dieser Verhaltensmodelle wurde der Begriff Working Memory, der nicht zu verwechseln ist mit dem Working Memory-Begriff von Baddeley und Hitch, sowie der Begriff Reference Memory eingeführt. Das Working Memory misst die Gedächtnisleistung, welche jeweils mit dem aktuellen Lauf zusammenhängt (Hulse et al. 2018). Das Reference Memory ist eine Art Langzeitgedächtnis über den gesamten Zeitraum des Experiments. Es konnte gezeigt werden, dass durch Läsionen des Hippocampus insbesondere das Working Memory beeinträchtigt wird (Morris et al. 1982), das Reference Memory aber eher erhalten bleibt (Nadel und Hardt 2011).

### 2.5. Neurotrophine

Der Hippocampus als eine wichtige Struktur der Gedächtnisbildung behält auch noch im Erwachsenenalter die Fähigkeit zur Neurogenese (Eriksson et al. 1998). Dabei spielen Neurotrophine eine wichtige Rolle, indem sie die Proliferation, das Überleben, die Entwicklung und die Funktionen sowie auch die Differenzierung und den programmierten Zelltod (Squire 2013) der Neurone beeinflussen (Hempstead 2006; Reichardt 2006). Neben dem lange bekannten Nerve growth factor (NGF) sind mittlerweile Brain derived factor (BDNF) sowie Neurotrophin 3 (NT3), 4/5 (NT4/5), 6 (NT6) und 7 (NT7) bekannt. Alle neuronalen Wachstumsfaktoren binden an einen niedrig-affinen, glykosylierten Rezeptor, den p75 Neurotrophinrezeptor (p75NTR). Daneben binden sie spezifisch an Subtypen von Tyrosinkinaserzeptoren (TrK A, B und C) (Arévalo und Wu 2006; Reichardt 2006).

#### 2.5.1. Nerve growth factor - NGF

NGF wurde in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts als erster neuronaler Wachstumsfaktor beschrieben (Levi-Montalcini et al. 1954). NGF gilt damit als Prototyp der weiteren, später gefundenen, Nervenwachstumsfaktoren. Er bindet sowohl an den hochaffinen TrKA als auch an den weniger affinen p75NTR. Er hat zum einen Bedeutung für das Wachstum und Proliferation der Nervenzellen, spielt aber auch in seiner ungespaltenen Vorläuferform proNGF als hochaffiner Ligand für den p75NTR eine Rolle beim programmierten Zelltod (Lee et al. 2001).

Nachdem NGF an den TrKA gebunden hat, wird er mitsamt dem Rezeptor in das Neuron aufgenommen, um dort vom Axon in den Nervenzellkörper transportiert zu werden und das Überleben der Nervenzelle zu beeinflussen (Harrington und Ginty 2013).

Bei einigen psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen konnte eine Veränderung der NGF-Konzentration gezeigt werden. Dazu zählen die bipolare Störung (Barbosa et al. 2011), Alzheimer und andere dementielle Erkrankungen (Counts und Mufson 2005; Hefti und Schneider 1991; Tuszynski et al. 2015), Schizophrenie (Parikh et al. 2003), das Rett-Syndrom (Gorbachevskaya et al. 2001; Riiikonen und Vanhala 1999), Multiple Sklerose (Althaus 2004; Villoslada und Genain 2004) sowie die Essstörungen Bulimia nervosa und Anorexia nervosa (Chaldakov et al. 2009).

Außerhalb des Gehirns und des Nervensystems kontrolliert NGF das Wachstum der beta-Zellen des Pankreas (Pierucci et al. 2001) sowie die Regulation des Immunsystems (Lambiase et al. 1997). Es ist an kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes mellitus Typ 2 und Adipositas, zusammenfassend dem metabolischen Syndrom, beteiligt (Chaldakov et al. 2009). Beim

## 2. Einführung

akuten Koronarsyndrom sowie beim metabolischen Syndrom ist die Konzentration an NGF und auch BDNF erniedrigt (Manni et al. 2005; Chaldakov et al. 2004).

### **2.5.2. Brain derived neurotrophic factor - BDNF**

BDNF ist sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem nachweisbar. Man findet es in Teilen des Gehirns (Hippocampus, Cortex, Amygdala und basales Vorderhirn), die mit der Gedächtnisleistung assoziiert sind (Yamada und Nabeshima 2003).

Zusätzlich ist es in den Speicheldrüsen inklusive dem Speichel, dem Herzen, der Milz, der Haut (Mandel et al. 2009; Rosenthal et al. 1991; Tirassa et al. 2000), den Blutplättchen (Yamamoto und Gurney 1990) sowie dem Blutplasma (Rosenfeld et al. 1995) nachweisbar. BDNF ist eines der aktivsten Neurotrophine (Pencea et al. 2001; Zigova et al. 1998) und unter anderem wichtig für das Langzeitgedächtnis (Bekinschtein et al. 2008). Es wird ihm auch eine wichtige Rolle im Angstgedächtnis, an dem die Amygdala beteiligt ist, zugeschrieben (Rattiner et al. 2005).

BDNF bindet sowohl an den TrKB als auch an den weniger affinen p75NTR (Patapoutian und Reichardt 2001). Eine reizgefüllte Umgebung führt zu einer Erhöhung von BDNF und bewirkt über TrKB eine Phosphorylierung und damit eine erhöhte Aktivität des NMDA-Rezeptors im Hippocampus (Mizuno et al. 2003; Slack et al. 2004). Über den TrKB ist es BDNF möglich, die Expression der AMPA-Rezeptoren, im speziellen die GluR1- und GluR2-Untereinheiten, hoch zu regulieren (Caldeira et al. 2007). Zusätzlich kann über den NMDA-Rezeptor die Aktivität der GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors beeinflusst werden (Wu et al. 2004).

Aber auch die GABAerge Transmission wird durch BDNF über den TrKB mit Hilfe der Proteinkinase C (PKC) beeinflusst und dadurch gehemmt (Henneberger et al. 2002). Über die PKC wird die Expression von GABA-Rezeptoren an der Postsynapse herunterreguliert (Chou et al. 2010).

BDNF trägt zur neuronalen Plastizität bei und fördert die generelle Synaptogenese (Cotman und Berchtold 2002; Thoenen 2005). Während der embryonalen und adulten Neurogenese spielt BDNF eine bedeutende Rolle (Bartkowska et al. 2007; Bath et al. 2012). Über TrKB ist der Nervenwachstumsfaktor ein wichtiger Katalysator der Differenzierung und Proliferation neuronaler Stammzellen (Bartkowska et al. 2007).

Es gibt Belege, dass die Konzentration an BDNF einen Zusammenhang mit diversen psychiatrischen Erkrankungen wie Depression (Brunoni et al. 2008; Dwivedi 2009), Zwangsstörungen (Maina et al. 2010), Schizophrenie (Xiu et al. 2009), Alzheimer und anderen dementiellen Erkrankungen (Arancio und Chao 2007; Zuccato und Cattaneo 2009), Chorea

## 2. Einführung

Huntington (Zajac et al. 2010), dem Rett-Syndrom (Zeev et al. 2009) sowie den Essstörungen Bulimia nervosa (Kaplan et al. 2008) und Anorexia nervosa (Mercader et al. 2007) hat.

### **2.5.3. Neurotrophin 3 – NT3**

Neben NGF und BDNF wurden noch weitere Nervenwachstumsfaktoren entdeckt. NT3 ist der dritte, nach NGF und BDNF entdeckte, neuronale Wachstumsfaktor (Hohn et al. 1990). Er ist ebenso wie die beiden zuvor beschriebenen sowohl an der Differenzierung und dem Wachstum neuer Synapsen, als auch an der Differenzierung und dem Wachstum bereits existierender Neurone beteiligt (Maisonpierre et al. 1990b). Dabei wirkt er auf Nervenzellen des peripheren und zentralen Nervensystems und dabei hauptsächlich an sensorischen Neuronen (Hohn et al. 1990; Vargas et al. 2008). Während der pränatalen Entwicklung zeigt NT3 im Vergleich zu NGF und BDNF höhere Level besonders im Hippocampus, Neocortex und Kleinhirn (Ernfors et al. 1990; Maisonpierre et al. 1990a). Auch im Hippocampus neugeborener Tiere wurde eine höhere Konzentration an NT3 gemessen als an den anderen beiden Nervenwachstumsfaktoren (Maisonpierre et al. 1990b). Somit scheint NT3 eine zentrale Rolle in der frühen neuronalen Entwicklung des Hippocampus zu spielen (Vargas et al. 2008).

Veränderte Konzentrationen wurden bei neuropsychiatrischen Krankheiten wie der Schizophrenie (Rodrigues-Amorim et al. 2018) und der bipolaren Störung (Tseng et al. 2016) gemessen. Im Gegensatz zu den anderen beiden Wachstumsfaktoren wirkt er sowohl über TrKC (Lamballe et al. 1991; Tessarollo et al. 1993) als auch weniger affin über die beiden anderen TrK, und ebenso wie NGF und BDNF über den niedrig affinen p75NTR (Huang und Reichardt 2001).

Neben diesen drei Wachstumsfaktoren existiert noch NT4, das auch als NT5 bekannt ist, und über den TrKB und weniger präferenziell über TrKA agiert (Klein et al. 1992). NT6 und NT7 wurden nur bei Fischen beschrieben und bisher nicht bei Säugetieren gefunden (Götz et al. 1994; Nilsson et al. 1998; Huang und Reichardt 2001).

### **2.6. Ziel der Arbeit**

Ein PRG1-Mangel ist für eine lebenslange Übererregbarkeit und bei jungen Mäusen auch epileptischen Anfällen verantwortlich. Die Ursachen dafür finden sich vermutlich in einer unregelmäßigen und erhöhten Aktivität glutamaterger Synapsen. Glutamaterge Neurone sind unter anderem an der Langzeitpotenzierung und demzufolge über den Hippocampus an der Gedächtnisleistung beteiligt.

Deshalb sollten zunächst die räumlichen Lernleistungen im Acht-Arm-Radiallabyrinth von homozygoten, heterozygoten PRG1-defizienten Tieren und ihren Wildtyp-Geschwistern untersucht werden. Ergänzend wurde vorher das Verhalten der Tiere in einem Open Field, der Motility-Box, beobachtet, um aufgrund der bekannten Hyperexzitation der glutamatergen Übertragung die Aktivität der Tiere zu bestimmen.

Danach sollten in dieser Arbeit mögliche morphologische Veränderungen der Tiere im Hippocampus untersucht werden. Dazu wurden GABAerge, cholinerge und NPY-immunpositive Neurone dargestellt und quantifiziert. Zusätzlich wurde die Dichte glutamaterger Fasern am Beispiel der MF im Hippocampus dargestellt und quantifiziert.

Aufgrund des Einflusses der Nervenwachstumsfaktoren auf die Plastizität glutamaterger Neuronen (Lessmann 1998; Mattson 2008), bestimmte ich im Hippocampus bei den drei verschiedenen Genotypen mittels ELISA-Technik die Nervenwachstumsfaktoren NGF, BDNF und NT3. Mittels dieser Technik wurde zudem das Hormon Corticotropin Releasing Factor (CRF) aufgrund seiner Rolle bei Stresssituationen im Hippocampus quantifiziert.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Tiere und Behandlung**

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 54 Mäuse eingesetzt, welche wir dankenswerterweise von der Arbeitsgruppe R. Nitsch / J.Vogt (Charité Berlin, Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin; jetzt Universität Mainz, Zentrale Versuchstiereinrichtung) erhielten. Konkret wurden 10 hetero- (HE), 22 homozygote PRG1 knock-out Mäuse (KO) und 22 ihrer Wurfgeschwister als Wildtypgruppe (WT) untersucht. Die PRG1-Linien wurden durch gezieltes Verändern und damit Inaktivieren des PRG1-Gens in embryonalen Stammzellen erzeugt. Dabei wurden die Exons 4 bis 5 des PRG1 mit einer IRES- $\beta$ -Gal-Neo cassette ersetzt (für weitere Details siehe Trimbuch, et al., 2009. Supplement Data). Die Zucht und Genotypisierung erfolgte in den jeweiligen Laboren in Berlin bzw. Mainz.

Nachdem wir die erwachsenen Tiere erhalten hatten, wurden sie im Zentralen Tierlabor der Universität Magdeburg bei standardisierten Bedingungen (Temperatur von 22° C +/- 2° C, relative Luftfeuchtigkeit 55 +/- 5 %) mit einem 12/12 Stunden hell/dunkel Rhythmus (Licht an 08:00, Licht aus 18:00, mit jeweiliger Dämmerung) einzeln in transparenten Käfigen gehalten. Die Tiere bekamen Wasser und Futter ad libitum. Alle Tests wurden während der Helligkeitsphase zwischen 10 Uhr und 14 Uhr durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte in Übereinstimmung mit den Festlegungen der Nationalen Gesetze der Tierhaltung (Deutsches Tierschutzgesetz, Tierversuchsgenehmigung Land Sachsen-Anhalt Nr. 42502-2-966) und der EU Richtlinien (86/609/EEC).

### **3.2. Verhalten**

Die Mäuse wurden zunächst in einem Open Field Test (Motility-Box) untersucht und danach (mit mindestens einer Woche Pause) im Acht-Arm-Radiallabyrinth getestet.

#### **3.2.1. Open Field - Motility-Box**

Mit Hilfe der Motility-Box wurde das Explorationsverhalten der Mäuse in einer neuen und unbekanntem Umgebung untersucht und quantifiziert. Diese Motility-Box (TSE-Systems, Bad Homburg, D) besteht aus durchsichtigen Polymethylmethacrylat (PMMA)-Platten (45 x 45 x 45 cm) mit einer Abdeckung aus dem gleichen Material. Die Bewegungen der Tiere in der Horizontalen wurden von je 15 Infrarotsensoren aufgezeichnet, die nebeneinander in der x-Achse und in der y-Achse in einem Abstand von 2,8 cm angeordnet waren. In der z-Achse wurde mit Hilfe eines Sensors, der sich 4 cm über dem Boden befand, die vertikale Aktivität (Aufrichten – rearing) automatisch registriert. Diese Daten wurden automatisch mit Hilfe der Software MOTI-Test-System (TSE-Systems, Bad Homburg, Deutschland) mit einer

### 3. Material und Methoden

Aufnahmerate von 10 Datensätzen pro Sekunde aufgezeichnet und für die spätere Auswertung gespeichert. Zwei Stunden vor dem Versuch wurden die Versuchstiere an den Testraum habituieret.

Zu Beginn des Versuchs wurden die Mäuse in die Mitte der Box gesetzt, der Deckel aufgesetzt und die Maus konnte die Box für 15 Minuten frei erkunden. Nach jeder Maus wurde die Box gereinigt. Ausgewertet wurden die Laufstrecke und die Zeiten für Aktivität (Laufen) und Ruhe im inneren und äußeren Bereich der Motility-Box. Des Weiteren erfolgte die Registrierung der Anzahl und Gesamtdauer der vertikalen Aufrichtungen.

#### **3.2.2. Acht-Arm-Radiallabyrinth**

Im Acht-Arm-Radiallabyrinth (Abb. 3) wird das räumliche Lernverhalten der Tiere untersucht. Die Mitte des Labyrinths besteht aus einer achteckigen Plattform mit einem Durchmesser von ca. 22 cm. Von dieser Plattform gehen acht gleich gebaute Arme mit je 25 cm Länge, 6 cm Breite und 6 cm Höhe aus. Die einzelnen Arme bestehen aus transparenten PMMA-Platten und haben ein abnehmbares Dach. Am Ende jedes Armes befand sich eine kleine Barriere hinter der ein kleines Futterpellet (ca. 1 x 1 x 1 mm) versteckt wurde und welches somit für das Tier erst bei Näherkommen sichtbar wird. Das Labyrinth wurde an jedem Versuchstag im Raum in der gleichen Richtung ausgerichtet und der Maus wurden zusätzlich in der unmittelbaren Umgebung räumliche Orientierungsmarken gegeben. Die identisch aussehenden abnehmbaren PMMA-Arme wurden täglich einmal in der Position vertauscht, um zu vermeiden, dass sich die Mäuse an internen Markern orientieren. Es erfolgte nach jedem Versuchstier eine gründliche Reinigung des Labyrinths.

Zur Bestimmung des Lernverhaltens im Radiallabyrinth ist Appetenz- und Explorationsverhalten unabdingbar. Deshalb wurden die Versuchstiere 3 Tage vor dem eigentlichen Versuchsbeginn gewogen und in den folgenden beiden Tagen bis zum Beginn des Trainings auf 85 – 90% des Ausgangsgewichts futterdepriviert. Trinkwasser stand ad libitum zur Verfügung.

Zur Gewöhnung an die Testapparatur und die externen Marker wurden die Tiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 10 Minuten habituieret. Dabei erhielten sie in jedem der acht Arme eine Belohnung. Wenn sie diese Belohnung gefunden und gefressen hatten, wurde der Arm nicht neu bestückt. Die Reihenfolge der Tiere wurde per Los bestimmt und diese während aller Habituations- und Versuchstage beibehalten.

Unmittelbar an den fünf folgenden Testtagen (Tag 1 - 5) wurden die Mäuse täglich einmal im Radiallabyrinth getestet. Wie bei der Habituation wurden alle Arme mit einer Belohnung versehen, die nach dem Fressen nicht erneuert wurde. Als Ziel wurde das Finden und Fressen aller Belohnungen durch die Mäuse festgelegt. Der Versuchstag wurde für das Tier beendet, sobald es die letzte Belohnung gefunden und gefressen hatte bzw. nach maximal 10 min. Im

### 3. Material und Methoden

Idealfall benötigte ein Tier acht Armbesuche, jeweils jeden Arm einmal, um alle Belohnungen einzusammeln. Als Besuch eines Arms wurde gewertet, sobald ein Tier mit allen vier Pfoten den Arm betreten hatte. Die Aufzeichnung erfolgte visuell durch einen externen Beobachter, der dabei in immer gleicher räumlicher Orientierung zum Labyrinth stand. Zu Beginn des Versuchs wurde die Maus in identischer Richtung auf die zentrale Plattform gesetzt. Folgende Parameter wurden während der 5 Testtage erhoben:

- die totale Laufzeit (Maximum zehn Minuten).
- *Working memory error (WME)*: Fehler im sogenannten Arbeitsgedächtnis, hier wurden als Fehler das wiederholte Betreten eines bereits erfolgreich betretenen Arms oder das fehlende Fressen der Belohnung eines betretenen Arms gewertet. Wenn die Maus nach maximal 10 min noch nicht alle Belohnungen gefunden hatte, wurden die nicht gefundenen Belohnungen als zusätzliche WME gewertet.
- *New arm entries (nArms)*: Beschreibt die Anzahl der neu besuchten Arme während der ersten acht Armbesuche.
- *Aktivität*: wurde berechnet nach der Formel:  $\text{Aktivität} = \text{Anzahl der besuchten Arme} \times 50 \text{ cm} / \text{Laufzeit}$ .

In diesem Test wurden die Tiere, die schon in der Motility-Box getestet wurden, untersucht. Es wurden jeweils 10 Mäuse aus den Gruppen (KO, HE und WT) eingesetzt.

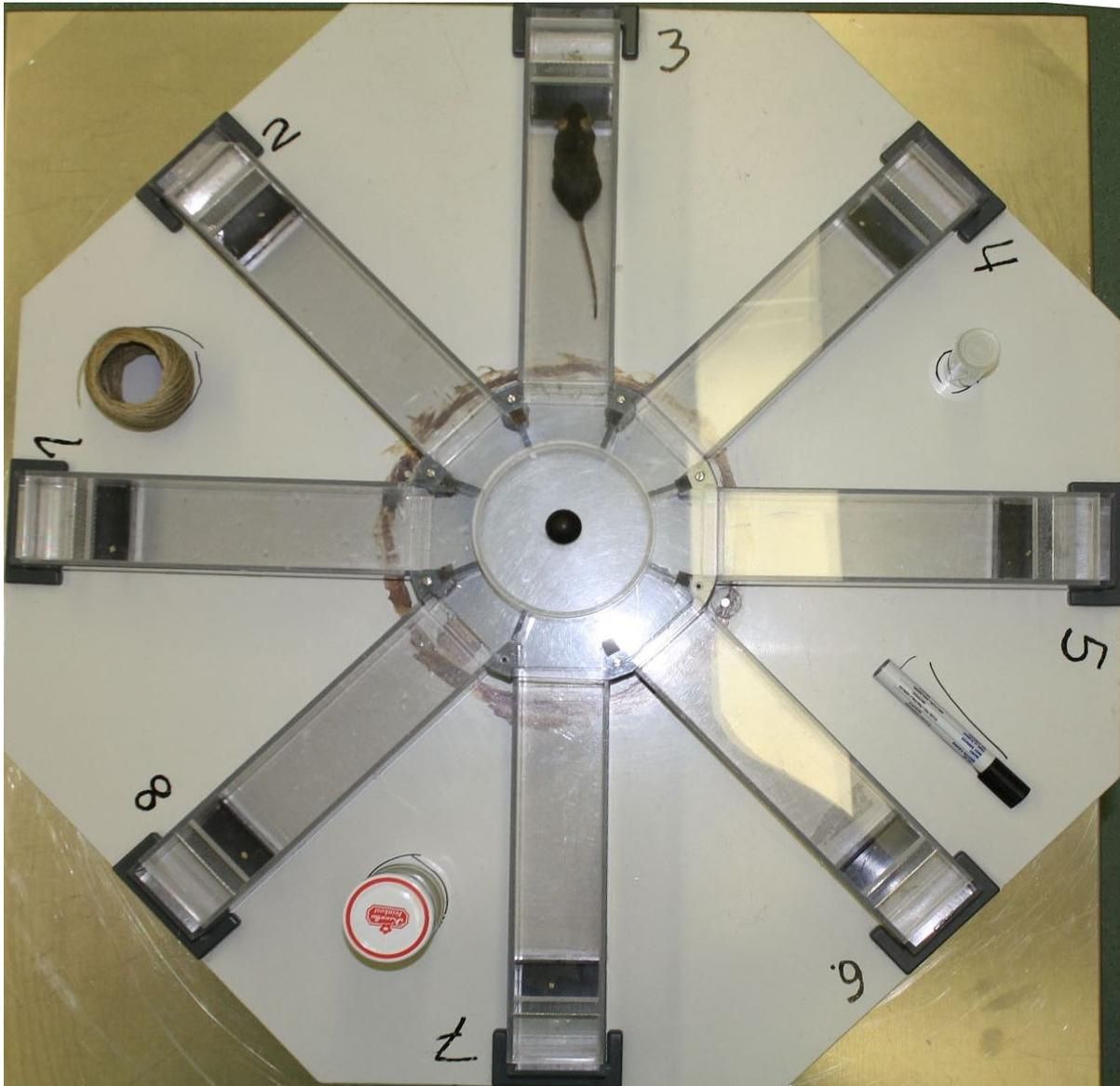


Abb. 3 Darstellung des verwendeten Acht-Arm-Radiallabyrinth. Es handelt sich um acht vollkommen identische von einer zentralen Plattform ausgehende Arme, an deren Ende sich eine Barriere aus einer schwarzen, undurchsichtigen PMMA-Platte befindet. Hinter dieser Barriere sind die Futterbelohnungen platziert. Die Maus wird in der zentralen Plattform in das Labyrinth gesetzt und kann frei zwischen den acht Armen wählen (hier in Arm Nr. 3). An einigen Stellen sind optische Marker außerhalb des Labyrinthes positioniert (ein Knäuel, einen Stift, ein großer und kleinerer Glasbehälter).

#### 3.3. Immunhistochemie

Nach den Untersuchungen im Radiallabyrinth wurden die Mäuse (KO n=9, HE n=4 und WT n=9) für weitere morphologische Untersuchungen getötet. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion von 0,15 ml 6%iges Narcoren (Pentobarbital) tief narkotisiert. Über einen transabdominalen Zugang wurde der Brustkorb eröffnet und das Herz freigelegt. Der linke Ventrikel wurde punktiert und das Tier zuerst ca. 2 min mit 0,9% NaCl-Lösung in PB (pH=7,4) und anschließend zur Fixierung des Gehirns ca. 12 min mit etwa 120 ml Fixierlösung

### 3. Material und Methoden

(4% Paraformaldehyd und 15% Pikrinsäure in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) (pH=7,4)) perfundiert. Um das Abfließen der Perfusionsflüssigkeit zu ermöglichen, wurde sofort während der Perfusion der rechte Vorhof eröffnet. Nach der Fixierung trennten wir den Kopf vom Körper und präparierten das Gehirn aus dem knöchernen Schädel. Nach einer Nachfixierung von 2-4 Stunden wurden die Gehirne mit einer 20 %igen Saccharoselösung in 0,1 M PB (pH=7,4) für 24 Stunden zur Kryoprotektion gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung mit Hilfe von 2-Methylbutan als Kühlmediator eingefroren und dann bei – 80° C gelagert.

Die Hirne wurden mit einem Kryostaten in 40 µm dicke frontale Schnitte in 4 Serien geschnitten. Jeweils die erste Serie wurde nach NISSL (Cresylviolett) gefärbt, um eine Orientierung in den verschiedenen Kerngebieten zu ermöglichen. In der zweiten Serie wurde ein monoklonaler Parvalbumin (PARV)-Antikörper aus der Maus (SWant; Bellizona, Switzerland) zum Nachweis GABAerger Neurone verwendet. In der dritten Serie wurde ein polyklonaler Cholinacetyltransferase (ChAT)-Antikörper aus dem Huhn (Novus Biologicals; Inc; Littleton, USA) zur Sichtbarmachung der cholinergen Neurone benutzt. Für die vierte Serie kam der polyklonale Neuropeptid Y (NPY)-Antikörper aus dem Kaninchen (GeneTex, Irvine, USA) zum Einsatz. Mittels eines biotinylierten sekundären Antikörpers (*Bio anti mouse* für den PARV-Nachweis, *Bio anti chicken* für den ChAT-Nachweis und *Bio anti rabbit* für den NPY-Nachweis, alle drei BiozolDiagnostica, Echinger, Germany) sowie eines Avidin-Biotin-Komplex mit Diaminobenzidin erfolgte die jeweilige Färbung der Schnitte. Die detaillierten Protokolle finden sich im Anhang auf Seite 84 und Seite 85.

#### 3.4. TIMM-Färbung

Für die TIMM-Färbung wurden jeweils 6 weitere Mäuse aus der KO- und WT-Gruppe verwendet. Die Tiere wurden ebenfalls unter tiefer Narkose perfundiert (0,15 ml 6%iges Narcoren - Pentobarbital). Hier wurden folgende Lösungen zur Perfusion eingesetzt: 1. für 3 min mit ca. 30 ml Sulfidpuffer (0,15 M Na<sub>2</sub>S in 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), gefolgt von 2. für 3 min ca. 30 ml PB nach Sørensen (0,15 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / 0,15 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH=7,35) mit 2% Glutaraldehyd und abschließend für 3 min noch einmal ca. 30 ml Sulfidpuffer. Nach sofortiger Entnahme wurden die Gehirne über Nacht bei Raumtemperatur in PB mit 2% Glutaraldehyd und 20% Saccharose nachfixiert. Danach wurden sie am Kryostaten in 40µm dicke Horizontalschnitte aufgearbeitet.

Die TIMM-Färbung dient der Darstellung zinkhaltiger Synapsen im Gehirn. In dieser Arbeit ist sie die Grundlage für die Quantifizierung der MF im Hippocampus. Das detaillierte Protokoll dieser Darstellung ist im Anhang (S. 86).

#### 3.5. Quantifizierung

##### 3.5.1. Quantifizierung der immunpositiven Neurone (PARV, NPY und ChAT)

Es wurden PARV-immunpositive Neurone als eine große Subpopulation GABAerger Neurone im medialen Septum/diagonalem Band von Broca (MS/DB) und im Hippocampus quantifiziert. Ebenfalls im MS/DB wurden ChAT-immunpositive Neurone gezählt. Im Hippocampus wurden als eine weitere GABAerge Subpopulation NPY-immunpositive Neurone quantifiziert. Zur Ermittlung der untersuchungsrelevanten Regionen wurden die nach NISSL gefärbten Schnitte eingesetzt und zur Orientierung der Atlas *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* von George Paxinos und Keith B. J. Franklin, 2. Auflage (Paxinos und Franklin 2004) verwendet. Im MS/DB wurden jeweils 5 Schnitte in einer Serie, also jeder 4. Schnitt des Gehirns, ausgewertet. Als Startpunkt wurde der erste Schnitt des Auftretens des MS definiert (entspricht etwa 1,18mm vor dem Bregma). Das Ende lag kurz vor dem kompletten Erscheinen der Commissura anterior (entspricht etwa 0,26mm vor dem Bregma). Im dorsalen Hippocampus wurden ebenfalls 5 Schnitte ab dem 4. Schnitt, nachdem der Hippocampus erstmals angeschnitten wurde, ausgewertet (entspricht Bregma-Bereich von -1,58 bis -2,30mm). Die Neuronen in den zu untersuchenden Regionen zählten wir jeweils mit 400-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Axioplan-Mikroskops (Zeiss, Jena, Deutschland) und einer Kamera (AxioCam HRc, Zeiss, Jena, Deutschland), welche an einen PC mit der Software AxioVision Ver. 4.7 (Zeiss, Jena, Deutschland) angeschlossen war. Es wurden alle Neurone im jeweiligen Areal ausgewertet. Im MS/DB wurde das MS als Ganzes, d.h. rechte und linke Seite zusammen, quantifiziert. Im DB wurden rechte und linke Seite getrennt ausgewertet. Im Hippocampus wurden die immunpositiven Neurone im DG und CA3 in der linken Hemisphäre gezählt. Es wurde dann die Gesamtanzahl der immunpositiven Neuronen berechnet und verglichen. Die Proben wurden vor der Quantifizierung von einer dritten Person verblindet.

### 3.5.2. Quantifizierung der Flächen der Moosfasern im Hippocampus

Die durch die TIMM-Färbung dargestellten MF wurden in Horizontalschnitten im DG und CA3 quantifiziert (Abb. 4). Im CA3-Areal wurden des Weiteren noch suprapyramidale (SP) und infra/intrapramidale (IIP) Bereiche unterschieden. Die Proben wurden ebenfalls von einer dritten Person verblindet. Es wurden auch fünf Schnitte, d.h. jeder 4. Schnitt, ausgewertet. Der erste Schnitt lag dabei in Höhe der Commissura habenularum, für Details siehe Schwegler and Lipp 1983 (Schwegler und Lipp 1983). Es wurde jeweils wieder die linke Seite ausgewertet. Die morphometrische Analyse erfolgte mit Hilfe eines Projektionsmikroskops (160x, Leitz, Wetzlar, Germany). Damit wurden die Moosfaserprojektionen mit Hilfe eines Grafiktablets aufgezeichnet und digitalisiert. Die digitalisierten Areale wurden dann mit Hilfe individueller Maßstäbe von Pixel in Flächen (mm<sup>2</sup>) umgerechnet. Dazu wurde die freie Software ScionImage (Scion Corp., Bethesta USA) verwendet.

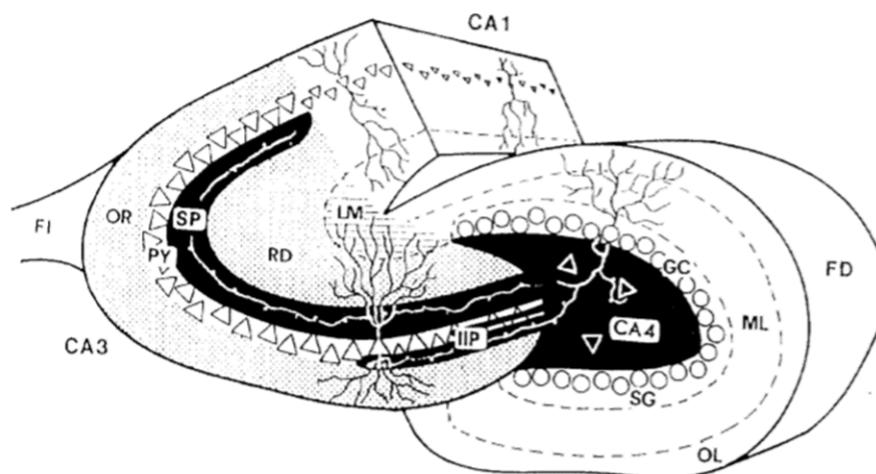


Abb. 4 Horizontalschnitt durch den Hippocampus. Es wurden die IIP= infra/intrapramidale und SPMF= suprapyramidale Moosfasern quantifiziert sowie die hilären MF im DG, die in dieser Darstellung als CA4 benannt sind. Mittlerweile sieht man dies aber als veraltet an. Zusätzlich erkennt man noch: CA1 und CA3, FI=Fimbria hippocampi, OR= Stratum oriens, PY= Stratum pyramidale, RD= Stratum radiatum, LM= Stratum lacunosum-moleculare, FD= Fascia dentata, OL und ML= äußere und mittlere Molekularschicht der Fascia dentata, SG= supragranuläre Schicht, GC= Stratum granulare (Crusio und Schwegler 2005)

#### 3.6. Quantifizierung der Nervenwachstumsfaktoren

##### 3.6.1. Vorbereitung der Gehirne

Für die Quantifizierung der Nervenwachstumsfaktoren NGF, BDNF und NT3 in KO, HE und WT wurden jeweils 6 Tiere dekapitiert, die Gehirne sofort entnommen und die Regionen MS/DB und Hippocampus präpariert. Diese wurden sofort in Flüssigstickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Das Gewebe wurde, nachdem es gewogen wurde, mit dem 30-fachen Volumen 10 mM PB, 0,2% Nonidet P-40 (pH=7,2) versetzt und homogenisiert. Anschließend wurde das homogenisierte Gewebe bei 4°C mit 15.000 rpm/min für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C weggefroren.

(KO und WT waren dabei zusätzliche Tiere, HE-Mäuse nach den vorherigen Verhaltensversuchen weiterverwendete Tiere.)

##### 3.6.2. Quantifizierung mittels Enzyme linked Immuno Sorbent Assay - ELISA

Zur Messung der Proteinmenge an Nervenwachstumsfaktoren NGF, BDNF und NT3 benutzten wir jeweils einen spezifischen Enzyme linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)-Kit (Promega Cooperation, E<sub>max</sub><sup>R</sup>ImmunoAssaySystem, Madison, WI, USA). Ein ELISA ist ein Nachweisverfahren, das auf spezifischen Antikörpern gegen das nachzuweisende Protein/Antigen basiert. In dem von uns verwendeten Verfahren bedienen wir uns der Sandwich-ELISA-Methode. Bei dieser Technik binden zwei verschiedene Antikörper an verschiedene Epitope des gesuchten Antigens. Der erste polyklonale Antikörper (bei BDNF ein monoklonaler Antikörper) war an den verwendeten Platten (96-well Platten) gebunden und lag im Überschuss vor. Danach wurde die entsprechende Probe mit dem gesuchten Antigen hinzugegeben. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde die Platte gespült und zurück blieb das an dem ersten Antikörper in der Platte gebundene Antigen. Es erfolgte die Inkubation mit dem zweiten monoklonalen Antikörper (bei BDNF polyklonaler Antikörper). Dieser band an ein weiteres Epitop des gesuchten Proteins und alle nicht gebundenen Antikörper wurden wieder ausgespült. Am zweiten Antikörper war eine Peroxidase gebunden, mit deren Hilfe ein Chromogen umgesetzt werden konnte. Dabei handelt es sich um TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidin), welches zugesetzt und die Reaktion nach 10-15 Minuten mit 1 M Phosphorsäure gestoppt und die Absorption der entstandenen Farbreaktion mit einem Photometer (Sunrise, Tekan, Gröding/Salzburg Österreich) bei 450 nm gemessen wird. Mit Hilfe einer Standardreihe, die mittels einer bekannten Menge des gesuchten Antigens erstellt wurde, wurden die unbekannt Konzentrationen berechnet. Es wurde eine Standardkurve für jede Platte hergestellt und diese deckte für NGF und BDNF den Konzentrationsbereich von

### 3. Material und Methoden

500 bis 7,8 pg/ml und für NT3 den Bereich zwischen 300 bis 4,7 pg/ml, jeweils in 1:2 Verdünnungsschritten ab. Es wurde ebenfalls ein Wert ohne Antigen = Leerwert bestimmt.

Die detaillierten Protokolle finden sich im Anhang (S. 87 und 88).

Für die Messung von CRF benutzen wir ein hoch sensitives ELISA-Kit (Cosmobio Tokyo, Japan). Auch hierzu findet sich ein detailliertes Protokoll im Anhang (S. 88).

#### **3.7. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der SPSS-Software. Die Entscheidungen basieren auf einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%.

Die Verhaltenstests wurden mittels einer ANOVA analysiert mit folgendem post-hoc Test. Wurden nur zwei Gruppen verglichen, geschah dies mittels eines Student T-Tests. Die Einflussvariable stellte dabei jeweils der Genotyp dar. Zur Testung der Varianzhomogenität wurde der Levene-Test genutzt.

Alle P Werte ab  $\leq 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet, alle  $\leq 0,01$  als statistisch hochsignifikant.

## 4. Ergebnisse

### 4. Ergebnisse

#### 4.1. Verhalten

##### 4.1.1. Motility-Box

In den meisten beobachteten Parametern (Laufstrecken und verschiedene Zeiten) fanden sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen in den verschiedenen Bereichen der Motility-Box (Abb. 5, Tab. 1).

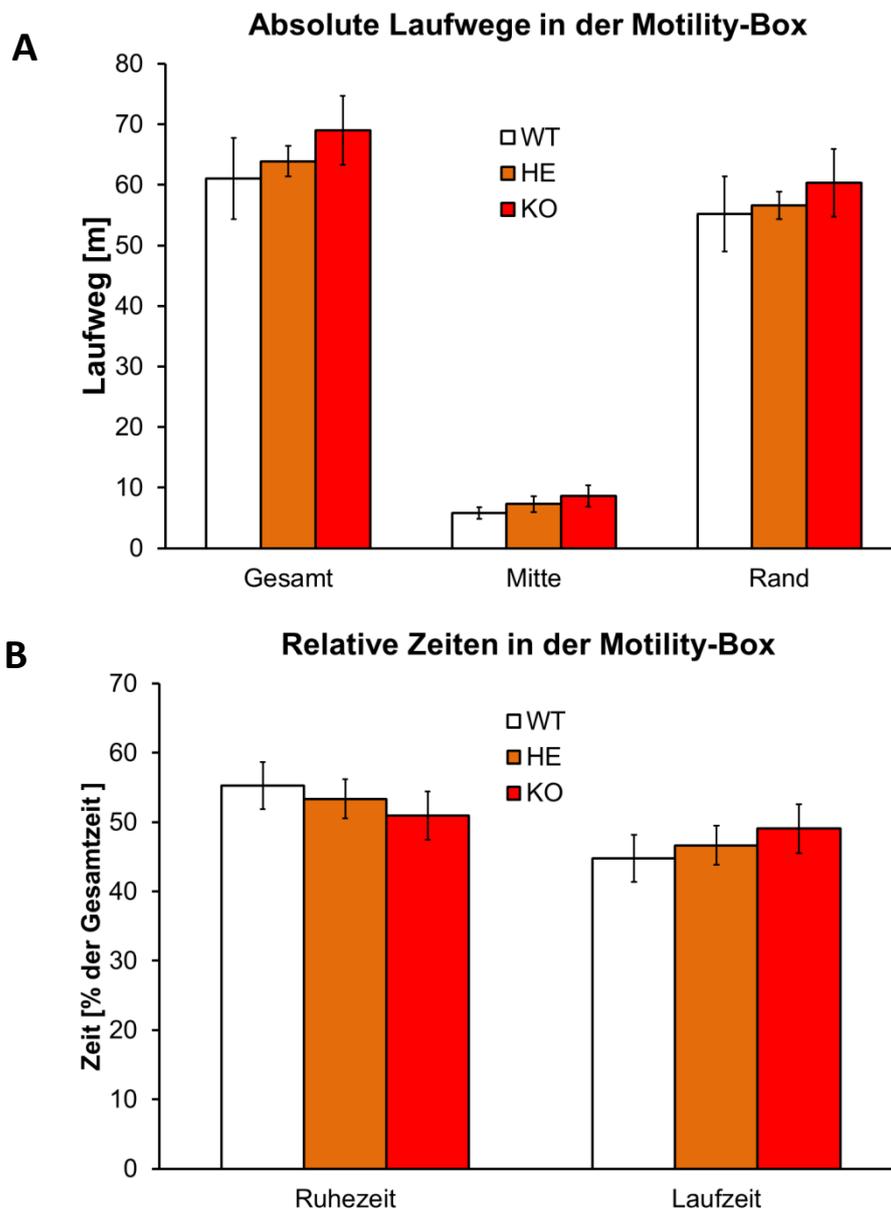


Abb.5 **A** Laufwege (gesamt, am Rand und in der Mitte) sowie **B** Ruhe- und Gesamtlaufzeit in der Motility-Box über 15 min. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen gefunden. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

#### 4. Ergebnisse

Tab. 1 Werte der ANOVA für alle gemessenen Parameter in der Motility-Box

Parameter	Df	F-Wert	P-Wert
Ruhezeit	2, 27	0,440	0,65
Laufzeit	2, 27	0,440	0,65
Gesamt Weg	2, 27	0,588	0,56
Weg am Rand	2, 27	0,287	0,75
Weg in Ecken	2, 27	0,032	0,97
Weg in der Mitte	2, 27	1,054	0,36
Anzahl Aufrichten	2, 27	0,400	0,67
Aufenthalts-Zeit am Rand	2, 27	1,589	0,22
<b>Aufenthalts-Zeit in Ecken</b>	2, 27	<b>3,958</b>	<b>0,031 *</b>
Aufenthalts-Zeit in der Mitte	2, 27	1,589	0,22
Geschwindigkeit Gesamt	2, 27	0,599	0,56
Geschwindigkeit am Rand	2, 27	0,685	0,51
Geschwindigkeit in den Ecken	2, 27	2,527	0,099
Geschwindigkeit in der Mitte	2, 27	0,803	0,46

Lediglich in der Aufenthaltszeit in den Ecken zeigte die ANOVA einen signifikanten Genotyp-Effekt (Abb. 6;  $F_{2,27} = 3,958$   $P < 0,05$ ). Der post-hoc Test ergab dabei signifikante Unterschiede zwischen den KO- und WT- sowie KO- und HE-Tieren (Bonferroni jeweils  $P \leq 0,05$ ). Dies spricht für eine teilweise höhere Aktivität der KO-Mäuse im Vergleich mit den WT und HE, da sie sich kürzer in den sicheren Eckbereichen aufhielten, dafür aber zumindest tendenziell länger in der Mitte liefen. Weiterhin zeigten nur die KO-Mäuse (5 von 10) ein stereotypisches Verhalten (Springen in den Ecken und sehr schnelles Laufen in einer Richtung im Kreis), das zwar von der Kamera erfasst wurde, das Springen vom automatischen Zählsystem allerdings nicht registriert werden konnte. Dieses Verhalten wurde bei den WT und HE nicht beobachtet.

#### 4. Ergebnisse

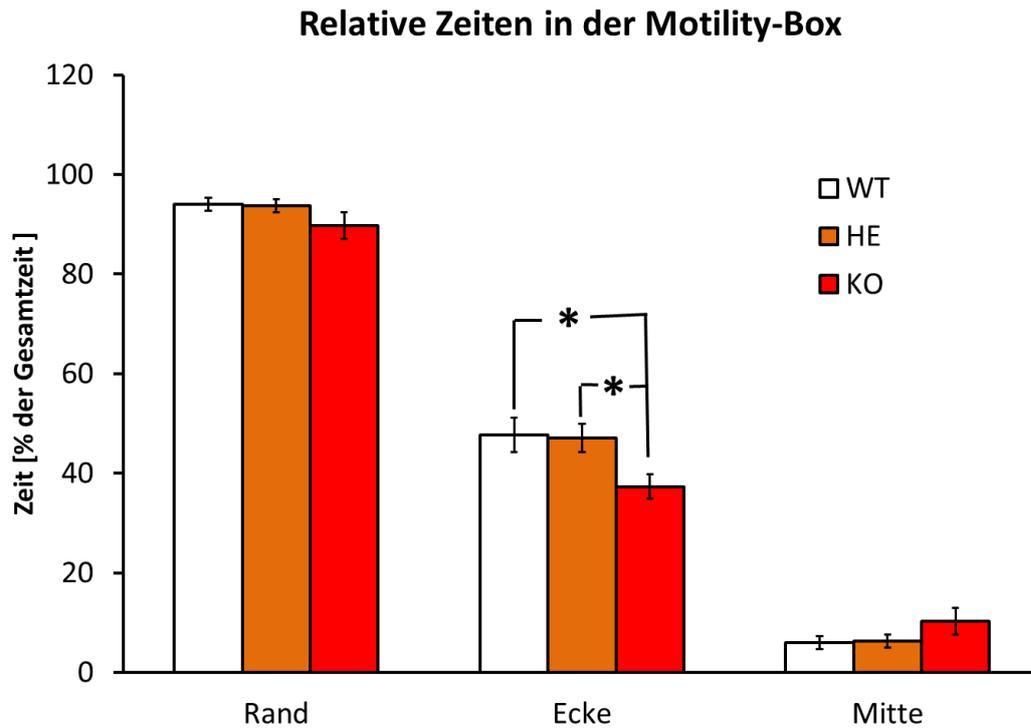


Abb. 6 Relative Zeiten in den verschiedenen Bereichen der Motility-Box. Im Bereich Ecken war die Aufenthaltszeit der KO signifikant geringer im Vergleich mit den WT- und HE-Mäusen. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler, post-hoc Test nach ANOVA, \*  $P \leq 0,05$ )

#### 4.1.2. Acht-Arm-Radiallabyrinth

Die Ergebnisse des räumlichen Lernens im Acht-Arm-Radiallabyrinth zeigten signifikante Unterschiede zwischen KO, HE und WT.

Im Vergleich der Fehler des Arbeitsgedächtnisses (*working memory error* – WME) ergab eine ANOVA einen Trend ( $F_{(2,27)} = 2,259$   $P = 0,09$ ). Bei der Analyse der einzelnen Versuchstage fand sich am Tag 4 ein signifikanter Genotyp Effekt (Abb. 7); Tag 1:  $F_{(2,27)} = 1,701$   $P = 0,20$ ; Tag 2:  $F_{(2,27)} = 1,368$   $P = 0,27$ ; Tag 3:  $F_{(2,27)} = 0,008$   $P = 0,99$ ; **Tag 4:  $F_{(2,27)} = 4,389$   $P = 0,02$  \***; Tag 5:  $F_{(2,27)} = 0,553$   $P = 0,58$ ). Es zeigte sich, dass sowohl HE- als auch KO-Mäuse keine signifikante Verringerung der WME von den ersten Versuchstagen zu den letzten Versuchstagen erbrachten, die WT dagegen schon.

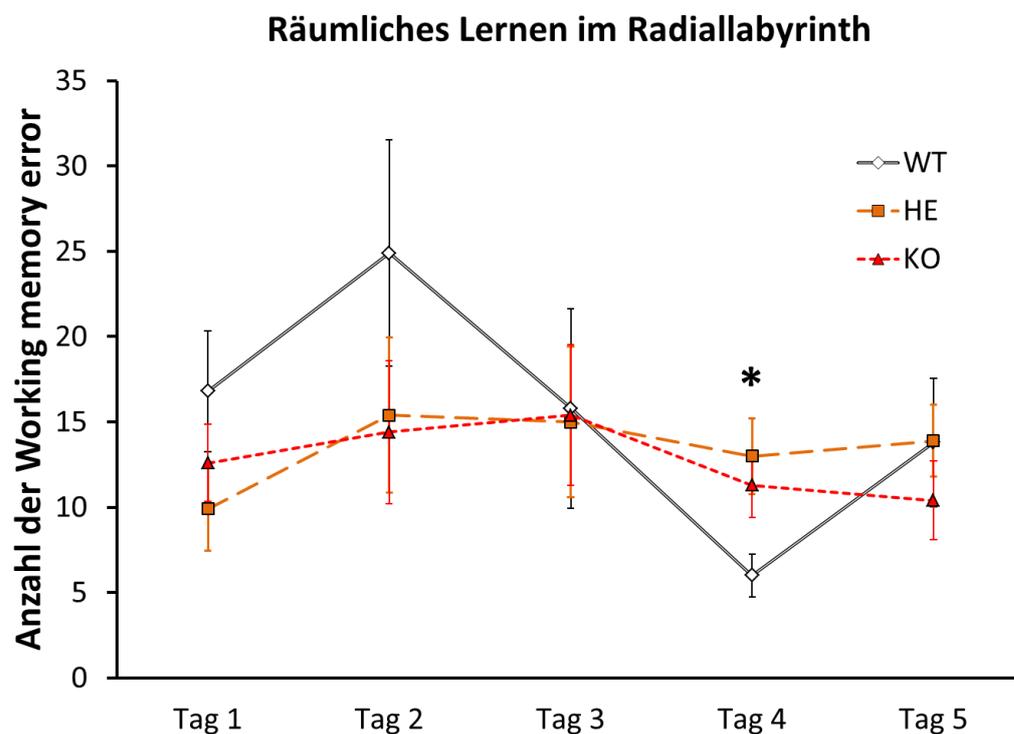


Abb. 7 Working memory error im Radiallabyrinth an fünf Versuchstagen. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen an Tag 4 gefunden. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; ANOVA \*  $P < 0,05$ )

#### 4. Ergebnisse

Um starke Schwankungen der einzelnen Versuchstage auszugleichen, bildete ich den Mittelwert aus den ersten beiden Versuchstagen und verglich sie mit den drei letzten Versuchstagen. Hier zeigten sich beim direkten Vergleich der Gruppen keine Unterschiede (Abb. 8). Allerdings zeigten die WT-Mäuse eine signifikante Abnahme der WME von den ersten Versuchstagen im Vergleich mit den Tagen 3 bis 5 (T-Test  $P < 0,05$ ). Die beiden anderen Gruppen (KO und HE) zeigten keine signifikanten Veränderungen im Sinne eines verbesserten räumlichen Lernens.

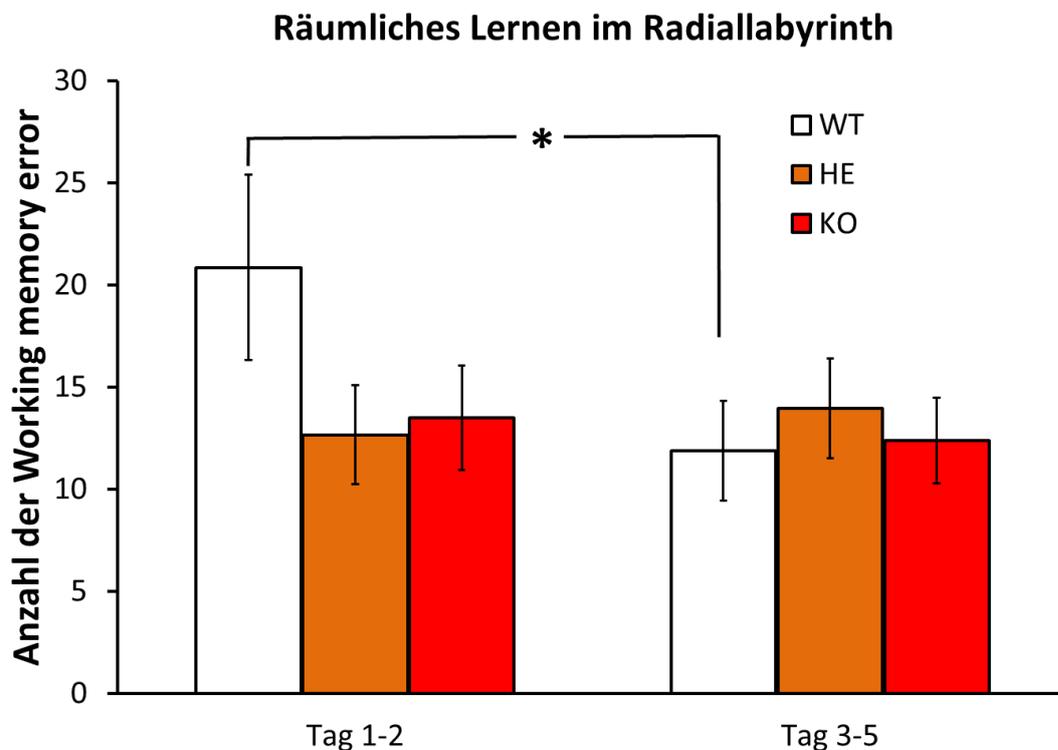


Abb. 8 Working memory error (WME) im Radiallabyrinth an den Versuchstagen 1 und 2 gegen 3 bis 5. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen wurden gefunden. WT-Mäuse verbesserten ihre räumliche Lernleistung von Tag 1 + 2 auf Tag 3 - 5. HE- und KO-Tiere verringern ihre WME nicht. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; T-Test \*  $P < 0,05$ )

#### 4. Ergebnisse

Untersucht man den Parameter nArms ergaben sich Unterschiede zwischen den Gruppen. Dieser Parameter beschreibt die Anzahl neu betretener Arme während der ersten acht Armbesuche. Eine ANOVA mit Genotyp und Versuchstag als Faktoren ergab für diesen Parameter nArms einen signifikanten Effekt ( $F_{(2,27)} = 2,802$   $P < 0,05$ ). An den einzelnen Versuchstagen ergaben sich allerdings keine einzelnen signifikanten Genotyp-Unterschiede. (Abb. 9; Tag 1:  $F_{(2,27)} = 0,191$   $P = 0,83$ ; Tag 2:  $F_{(2,27)} = 0,171$   $P = 0,84$ ; Tag 3:  $F_{(2,27)} = 1,359$   $P = 0,27$ ; Tag 4:  $F_{(2,27)} = 1,476$   $P = 0,25$ ; Tag 5:  $F_{(2,27)} = 2,730$   $P = 0,08$ ).

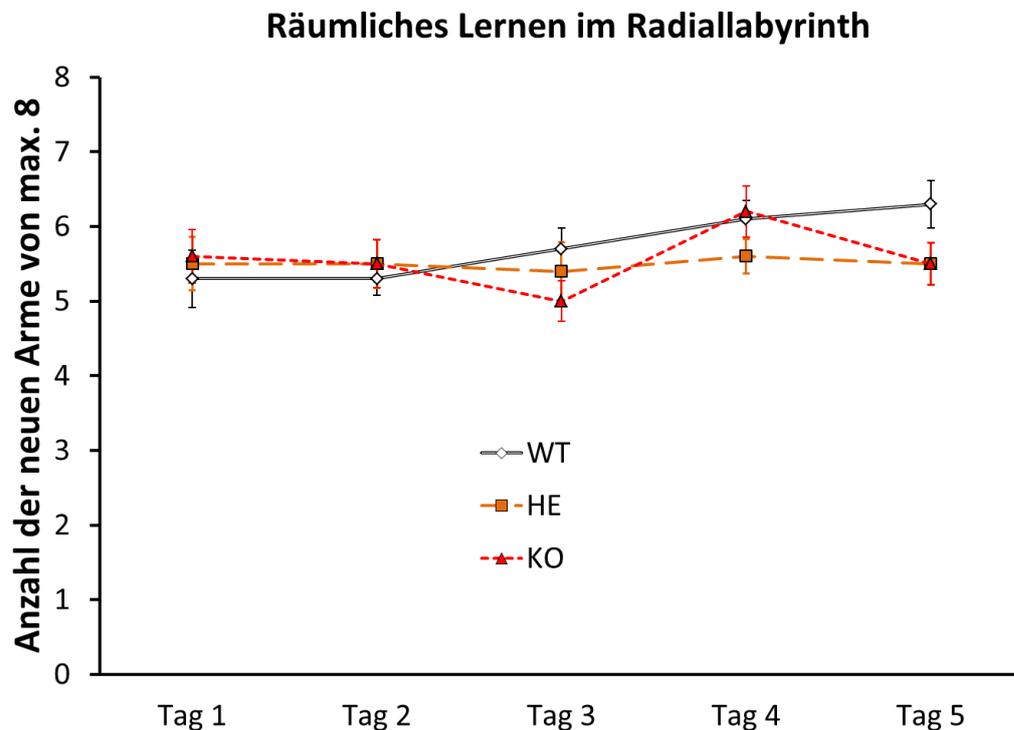


Abb. 9 Eintritt in neue Arme im Radiallabyrinth an fünf Versuchstagen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

Bildete man wieder den Mittelwert aus den ersten beiden Versuchstagen und verglich sie mit den drei letzten Versuchstagen, zeigten sich beim direkten Vergleich der Gruppen Unterschiede (Abb. 10). So liefen die WT in mehr neue Arme, verglichen mit den HE- (T-Test  $P < 0,05$ ) und den KO-Tieren (T-Test  $P = 0,05$ ) an den Versuchstagen 3–5. An den ersten beiden Versuchstagen zeigten sich keine Unterschiede.

#### 4. Ergebnisse

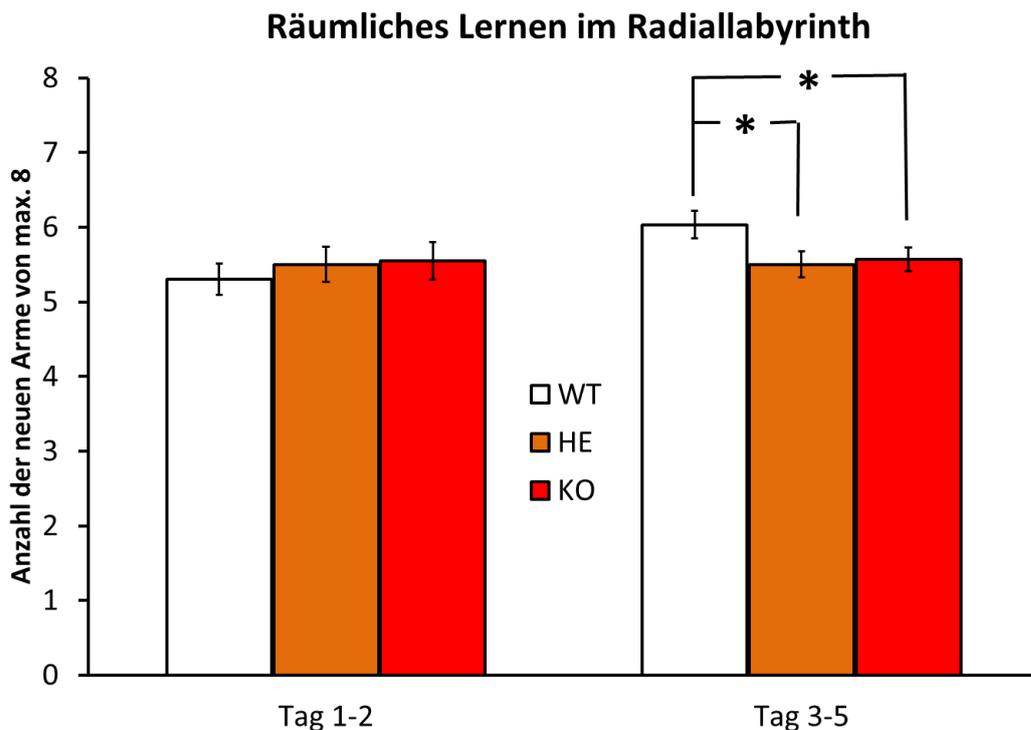


Abb. 10 Eintritt in neue Arme im Radiallabyrinth an den Versuchstagen 1 und 2 gegen 3 bis 5. Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen an den ersten Tagen aber an den letzten Tagen zeigten sich Unterschiede zwischen WT- und HE- bzw. KO-Mäusen. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; T-Test \*  $P < 0,05$ )

Eine ANOVA für die Laufzeit (Zeit bis zum Einsammeln aller acht Belohnungen, max. 600 sec) erbrachte keine signifikanten Unterschiede. ( $F_{(2,27)} = 2,263$   $P = 0,09$ ). Auch zeigten alle 5 Versuchstage keine Genotypunterschiede (Tag 1:  $F_{(2,27)} = 1,442$   $P = 0,25$ ; Tag 2:  $F_{(2,27)} = 0,899$   $P = 0,42$ ; Tag 3:  $F_{(2,27)} = 1,272$   $P = 0,30$ ; Tag 4:  $F_{(2,27)} = 1,009$   $P = 0,38$ ; Tag 5:  $F_{(2,27)} = 0,139$   $P = 0,87$ ). Hier war zu beobachten, dass eine ganze Reihe von Mäusen die maximale Laufzeit benötigte.

Berechnet man allerdings die Aktivität (= Anzahl der Armbesuche  $\times$  doppelte Armlänge 50 cm / Laufzeit), so ergaben sich signifikante Unterschiede. Eine ANOVA mit Genotyp und Versuchstag als Faktoren war nicht signifikant ( $F_{(2,27)} = 1,201$   $P = 0,33$ ). Allerdings zeigten alle 5 Versuchstage teilweise hoch signifikante Genotypunterschiede (Abb. 11 **Tag 1:**  $F_{(2,27)} = 9,547$   $P < 0,001$ ; **Tag 2:**  $F_{(2,27)} = 6,178$   $P < 0,01$ ; **Tag 3:**  $F_{(2,27)} = 8,015$   $P < 0,01$ ; **Tag 4:**  $F_{(2,27)} = 6,670$   $P < 0,01$ ; **Tag 5:**  $F_{(2,27)} = 5,083$   $P < 0,05$ ).

#### 4. Ergebnisse

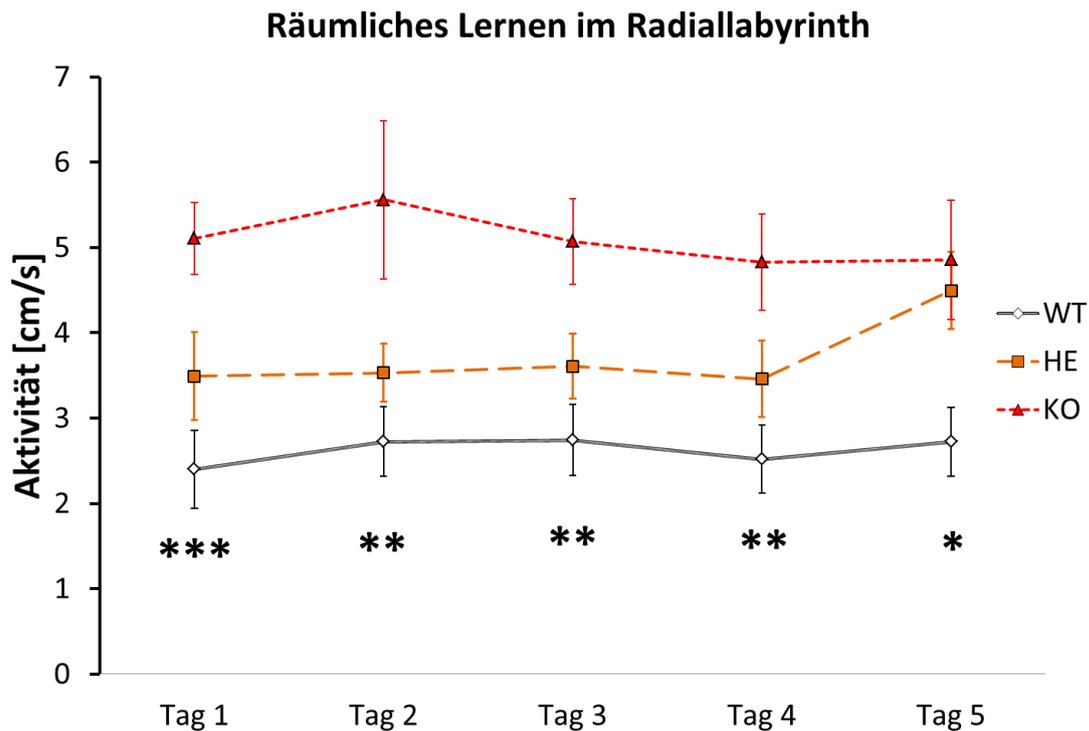


Abb.11 Aktivität (Anzahl der Armbesuche x doppelte Armlänge / Laufzeit) im Radiallabyrinth an den Versuchstagen 1 bis 5. An allen Tagen konnten signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gezeigt werden. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; ANOVA \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ )

Beim Vergleich der Mittelwerte zwischen den ersten beiden und den drei letzten Versuchstagen waren beim direkten Vergleich der Gruppen Unterschiede ersichtlich (Abb. 12). So zeigten die WT eine signifikant geringere Aktivität, verglichen mit den KO-Mäusen, sowohl am Anfang (T-Test  $P < 0,001$ ) als auch am Ende (T-Test  $P < 0,01$ ) des Radiallabyrinth-Tests. Zusätzlich zeigten auch die HE am Anfang eine geringere Aktivität als die KO-Tiere (T-Test  $P < 0,05$ ). Insgesamt zeigte sich hier möglicherweise ein Gen-Dosis-Effekt des PRG1 auf die motorische Aktivität = Laufgeschwindigkeit im Radiallabyrinth. Die Aktivitäten unterschieden sich an den einzelnen Versuchstagen kaum. Vergleich man nun die Mittelwerte (Versuchstag 1 – 5), so ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen (T-Test: WT vs. HE  $P < 0,05$ ; WT vs. KO  $P < 0,01$ ; HE vs. KO  $P < 0,05$ ).

#### 4. Ergebnisse

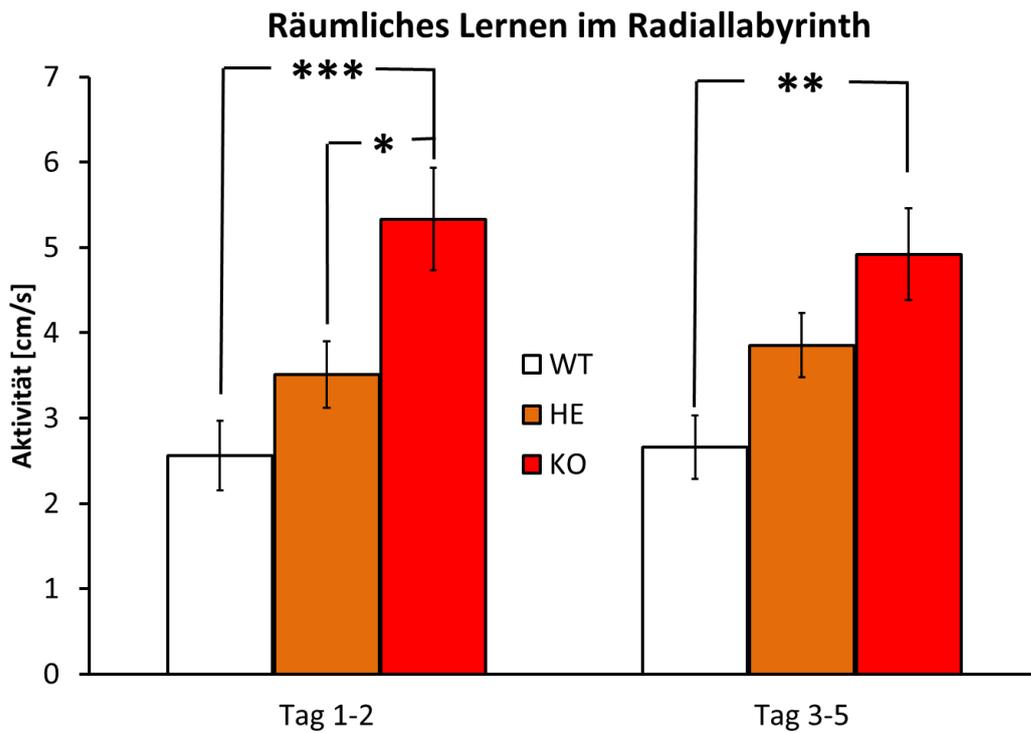


Abb.12 Aktivität (Anzahl der Armbesuche x doppelte Armlänge / Laufzeit) im Radiallabyrinth an den Versuchstagen 1 und 2 gegen 3 bis 5. Hochsignifikant höhere Aktivität der KO-Tiere im Vergleich zu den WT am Anfang und Ende des Versuchs. Anfangs zeigten auch HE-Mäuse signifikant niedrigere Aktivitäten als die KO-Gruppe. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; T-Test \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*  $P < 0,05$ )

## 4.2. Morphologie

### 4.2.1. Immunhistochemische Färbungen

#### 4.2.1.1. PARV-immunpositive GABAerge Neurone

##### 4.2.1.1.1. Hippocampus

Im Hippocampus fanden sich keine Unterschiede in der Anzahl der GABAergen PARV-immunpositiven Neurone (Abb. 13; ANOVA DG:  $F_{2,20} = 2,281$   $P = 0,13$ ; CA3:  $F_{2,20} = 1,792$   $P = 0,19$ ; DG und CA3 zusammen:  $F_{2,20} = 2,451$   $P = 0,11$ ). Weder im DG noch in der CA3 Region fanden sich Unterschiede. Die HE-Gruppe schien tendenziell weniger PARV-immunpositive Neurone im Hippocampus aufzuweisen als die beiden anderen Genotypen (T-Test: DG: HE vs. WT  $P=0,097$  und HE vs. KO  $P=0,068$ ; CA3: HE vs. WT  $P=0,113$  und HE vs. KO  $P=0,057$ ).

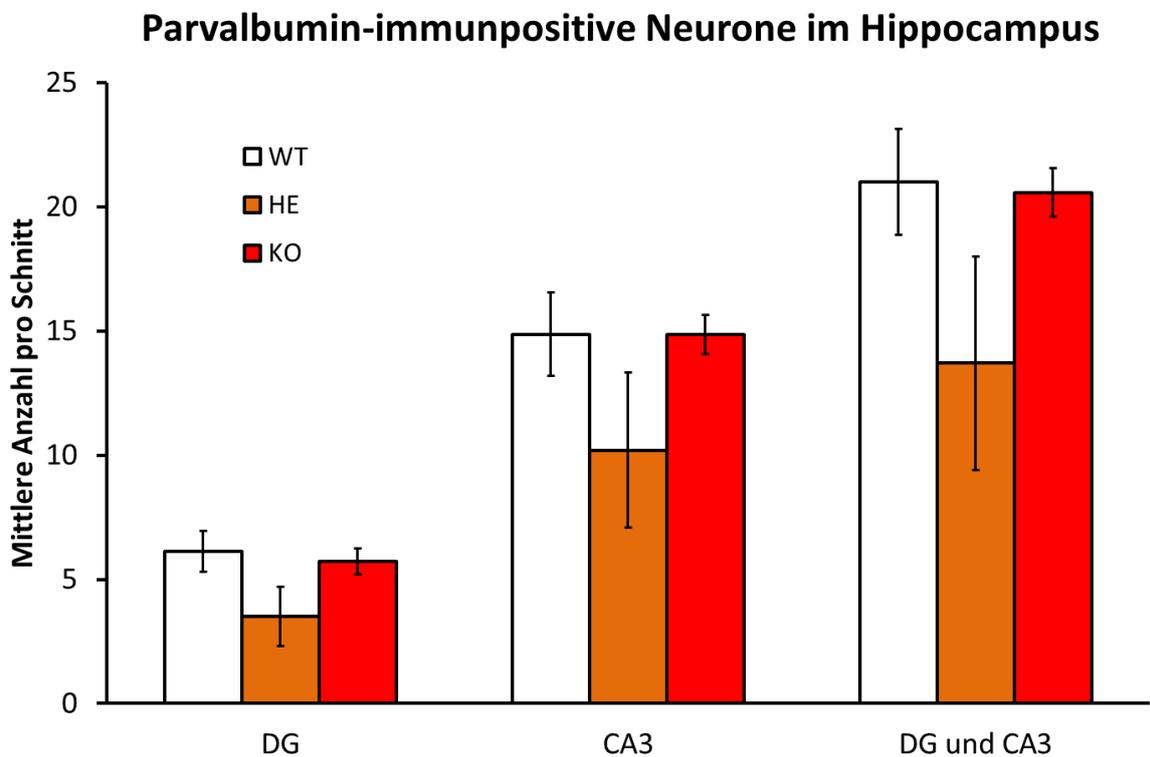


Abb. 13 PARV-immunpositive Neurone im Hippocampus. Es wurden keine signifikanten Genotyp-Unterschiede beobachtet. HE-Mäuse schienen tendenziell weniger PARV-immunpositive Neurone zu haben im Vergleich mit WT- und KO-Mäusen. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

#### 4.2.1.1.2. Mediales Septum und Diagonales Band von Broca

Auch im MS/DB fand sich kein Unterschied in der Anzahl GABAerger PARV-immunpositiver Neurone zwischen den Genotypen (Abb.14; ANOVA: MS:  $F_{2,20} = 0,584$   $P = 0,57$ ; DB links:  $F_{2,20} = 0,265$   $P = 0,77$ ; DB rechts:  $F_{2,20} = 0,562$   $P = 0,58$ ; MS/DB:  $F_{2,20} = 0,439$   $P = 0,65$ ). Seitenunterschiede zwischen rechten und linkem DB wurden nicht gefunden (T-Test: WT  $P = 0,21$ ; HE  $P = 0,57$ ; KO  $P = 0,23$ ).

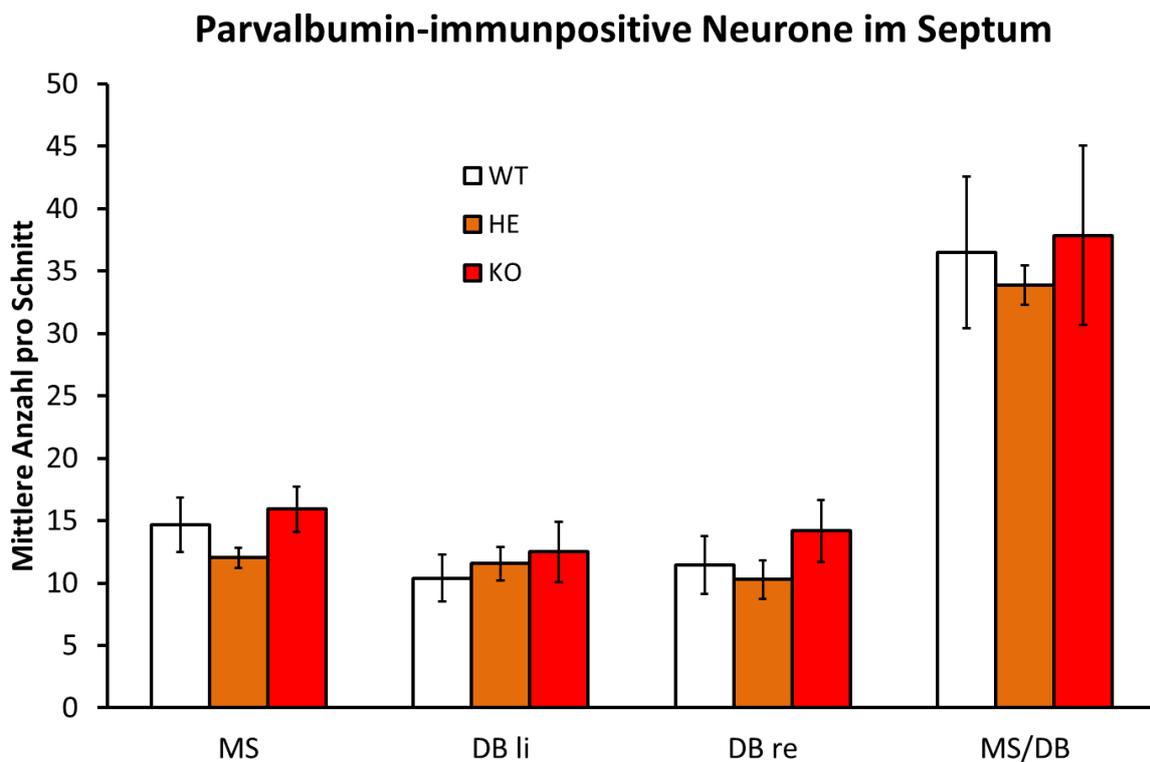


Abb.14 PARV-immunpositive Neurone im medialen Septum (MS)/diagonalem Band von Broca (DB). Es konnten keine signifikanten Genotyp-Unterschiede beobachtet werden. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

#### 4.2.1.2. ChAT-immunpositive Neurone im MS/DB

Wir wiesen die cholinergen Neurone im MS/DB mit Hilfe der Immunfärbung ChAT nach. Diese ChAT-positiven Neurone der septalen Region zeigten auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen (Abb. 15; ANOVA: MS:  $F_{2,19} = 2,340$   $P = 0,13$ ; DB links:  $F_{2,19} = 2,769$   $P = 0,09$ ; DB rechts:  $F_{2,19} = 1,372$   $P = 0,28$ ; MS/DB:  $F_{2,19} = 2,186$   $P = 0,14$ ). Seitenunterschiede zwischen rechten und linkem DB wurden nicht gefunden (T-Test: WT  $P = 0,15$ ; HE  $P = 0,65$ ; KO  $P = 0,82$ ).

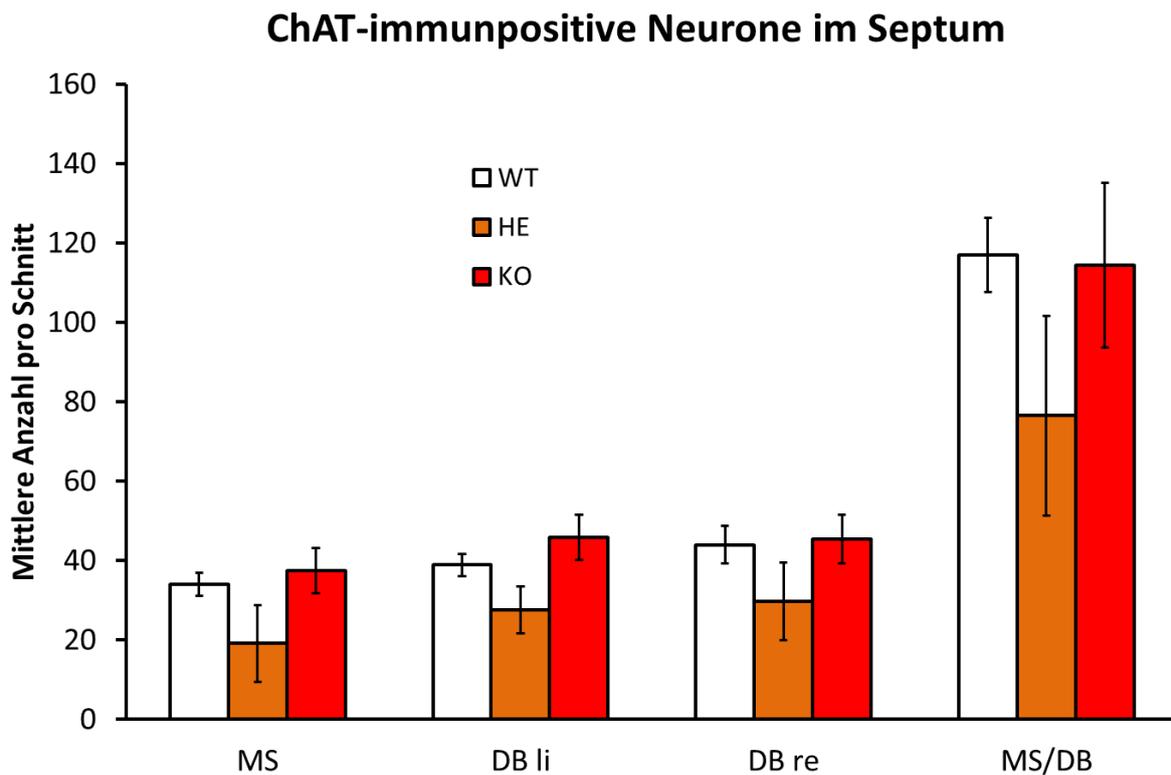


Abb.15 ChAT-immunpositive Neurone im MS/DB. Es konnten keine signifikanten Genotyp-Unterschiede beobachtet werden. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

#### 4.2.1.3. NPY-immunpositive Neurone im Hippocampus

Hier wurden nur die WT- mit den KO-Tieren verglichen. Die Färbung bei den HE-Mäusen konnte nicht ausgewertet werden. Es zeigte sich im DG und im DG plus CA3 eine erhöhte Anzahl von NPY-positiven Neurone bei den KO-Mäusen im Vergleich mit ihren WT-Geschwistern (Abb.16; ANOVA **DG**:  $F_{2,15} = 12,047$   $P < 0,01$  **\*\***; **CA3**:  $F_{2,15} = 0,022$   $P = 0,88$ ; **DG und CA3 zusammen**:  $F_{2,15} = 10,127$   $P < 0,01$  **\*\***).

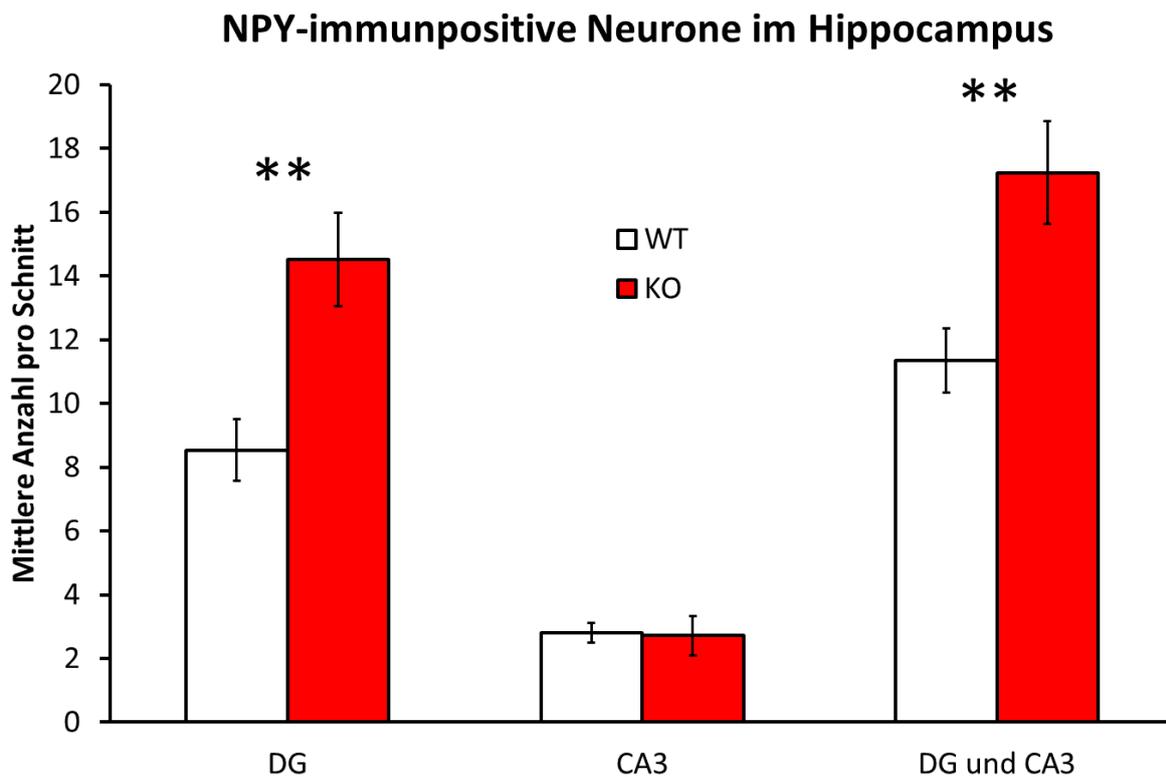


Abb.16 NPY-immunpositive Neurone im Hippocampus Die KO-Mäuse zeigten hochsignifikant mehr NPY-positive Neurone im Vergleich mit der WT-Gruppe. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; ANOVA, **\*\***  $P \leq 0,01$ )

## 4. Ergebnisse

### 4.2.2. Darstellung glutamaterger Moosfasern im Hippocampus (TIMM-Färbung)

Die Anteile der glutamatergen MF im Hippocampus waren in den KO-Mäusen im Vergleich mit den WT erhöht. Dies betraf sowohl die MF im DG (T-Test  $P < 0,01$ ) als auch in der CA3-Region (T-Test  $P < 0,05$ ). Im CA3 waren die IIPMF signifikant erhöht (Abb. 18; T-Test  $P < 0,05$ ), die SPMF dagegen nicht (T-Test  $P = 0,23$ ). Die Abb. 17 zeigt eine repräsentative Darstellung der MF mittels einer TIMM- Färbung.

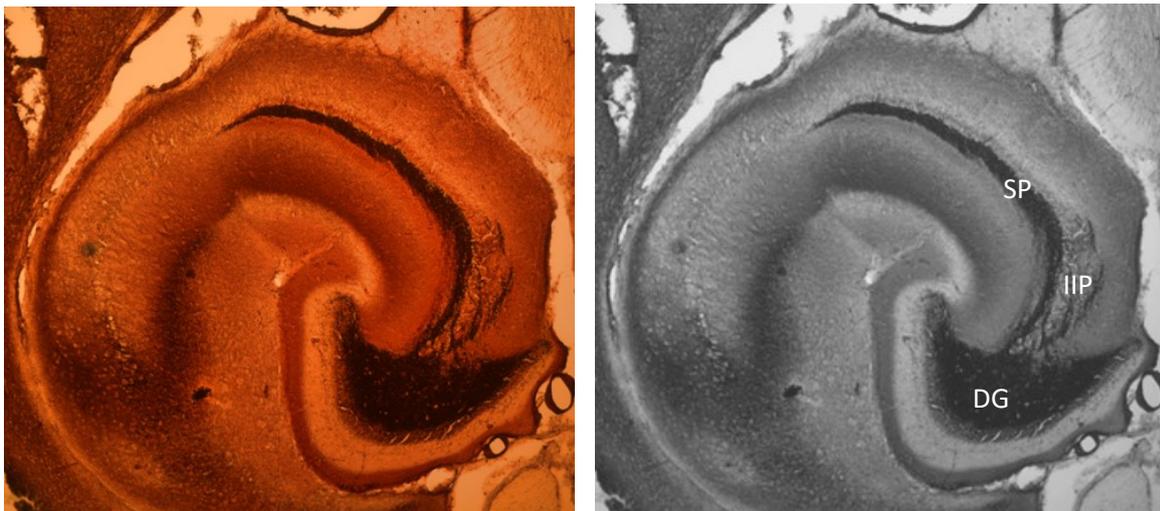


Abb. 17 Die Darstellung der Moosfasern (MF) mittels TIMM-Färbung an einem Beispiel (KO). Dabei wurde die CA3-Region noch in die infra/intrapyramidalen MF (IIP) und die suprapyramidalen MF (SP) eingeteilt. Gyrus dentatus (DG) – hier Hilus des DG. Einteilung der Regionen siehe auch Abb. 4

#### 4. Ergebnisse

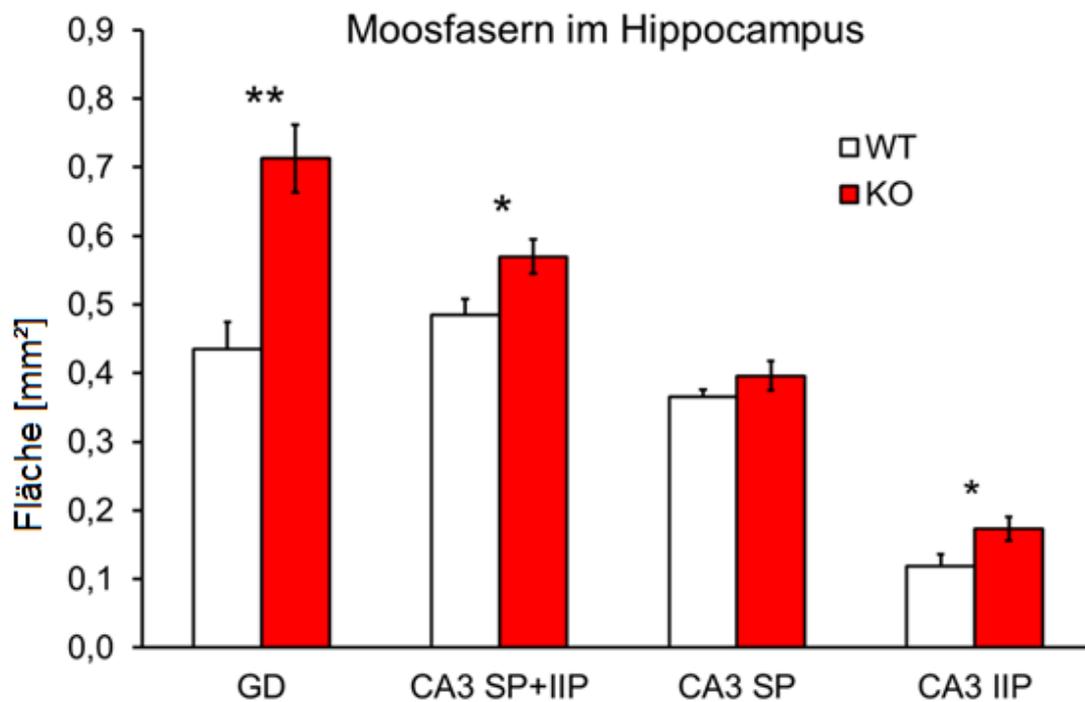


Abb. 18 Darstellung der Moosfasern (MF) im Hippocampus mittels TIMM-Färbung. Die KO-Mäuse zeigten signifikant bzw. hochsignifikant größere TIMM-positive Flächen im Vergleich mit den WT-Tieren. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; ANOVA, \*\*  $P \leq 0,01$  \*  $P < 0,05$ )

#### 4.3. Proteinbestimmung der Nervenwachstumsfaktoren und CRF mittels ELISA

In einer multivariaten ANOVA mit Genotyp und Nervenwachstumsfaktoren NGF, BDNF und NT3 ergab sich ein signifikanter Effekt ( $F_{2,15} = 2,550$   $P < 0,05$ ). Allerdings zeigten sich für die einzelnen Nervenwachstumsfaktoren Unterschiede. Es fand sich kein Genotypeneffekt im Hippocampus für NGF. Bei BDNF gab es deutliche Trends mit erhöhten Werten für die KO-Tiere. Hier lagen die Werte der HE-Mäuse eher bei den Werten der WT. Beim NT3 zeigten sowohl die HE- als auch die KO-Mäuse eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den WT. Im Gegensatz zu BDNF zeigten die HE bei NT3 hier vergleichbare Werte wie die KO-Tiere. Im Weiteren werden die einzelnen Faktoren dargestellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.3.1. NGF

Der Proteingehalt im Hippocampus unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Abb. 19; ANOVA  $F_{2,15} = 0,467$   $P = 0,64$ )

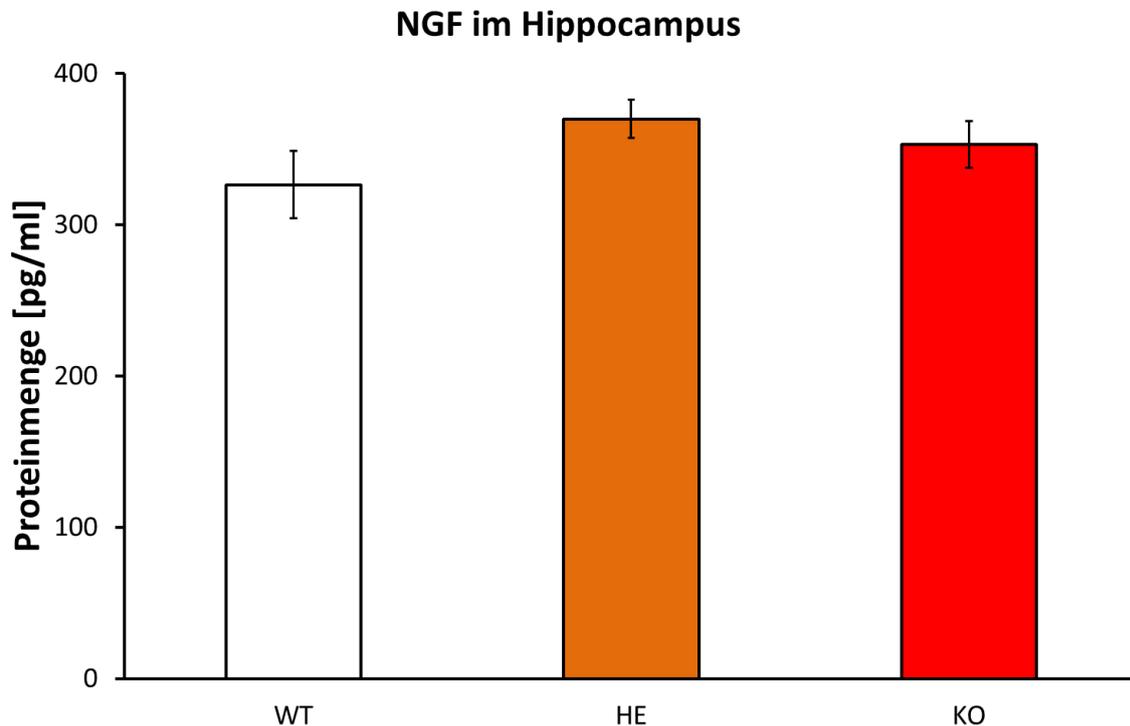


Abb. 19 Darstellung der NGF-Proteinmenge im Hippocampus mit einem ELISA. Zwischen WT, HE und KO waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

### 4.3.2. BDNF

Für den Nervenwachstumsfaktor BDNF ergab die ANOVA einen Trend (Abb.20; ANOVA  $F_{2,15} = 2,907$   $P = 0,09$ ). Dabei war im Hippocampus der KO-Mäuse tendenziell mehr BDNF vorhanden als in den HE oder WT. Diese beiden unterschieden sich nicht. Im post-hoc Test (LSD) zeigten sowohl KO vs. WT als auch KO vs. HE jeweils  $P = 0,06$  einen deutlichen Trend. Ging man davon aus, dass sich beim BDNF-Proteingehalt WT und HE nicht unterschieden ( $P = 0,87$ ) und berechnete einen T-Test KO gegen WT und HE, so ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen WT+HE- und KO-Mäusen (Abb. 21;  $P < 0,05$ ).

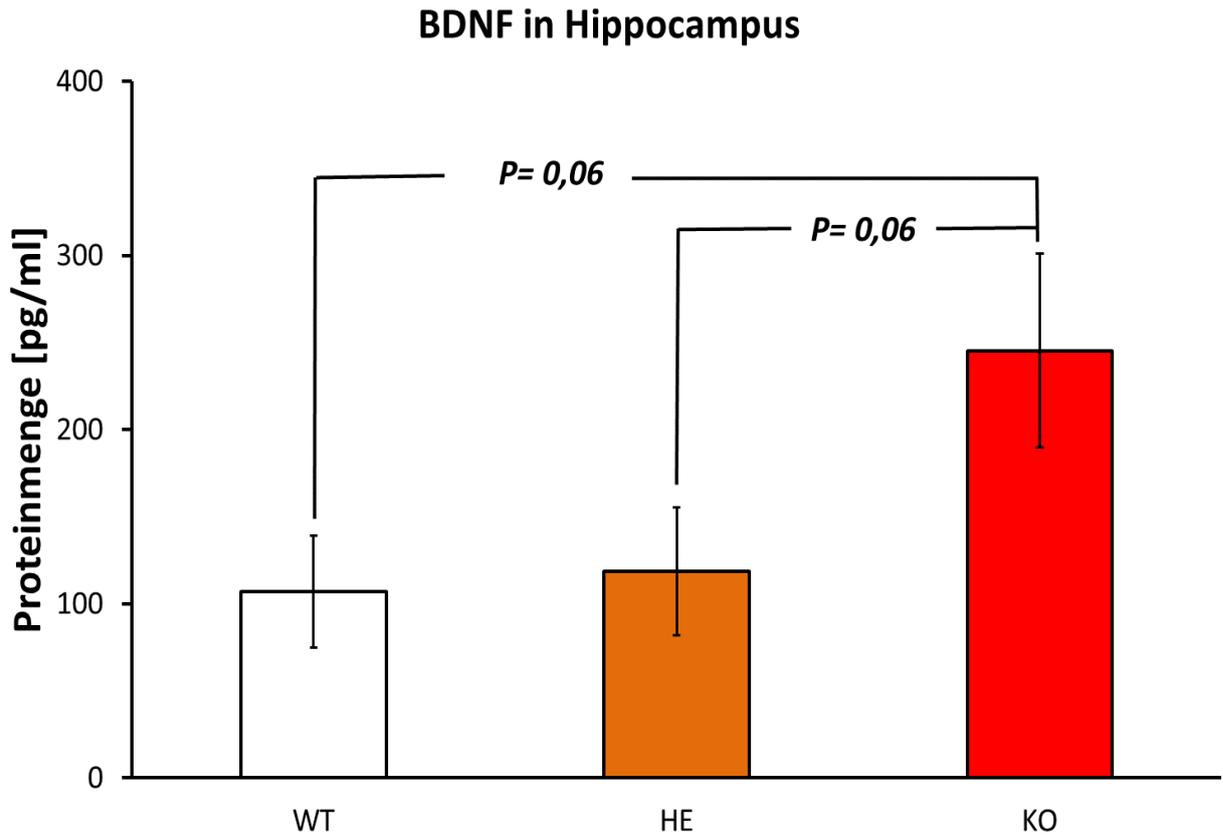


Abb. 20 Darstellung der BDNF-Proteinmenge im Hippocampus mit einem ELISA. Keine signifikanten Unterschiede zwischen WT, HE und KO waren vorhanden. Es zeigten sich Trends. Die KO-Mäuse hatten mehr BDNF im Vergleich mit HE oder WT. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler) (ANOVA Trend  $P=0,09$ ; post-hoc LSD-Test Trend  $P=0,06$ )

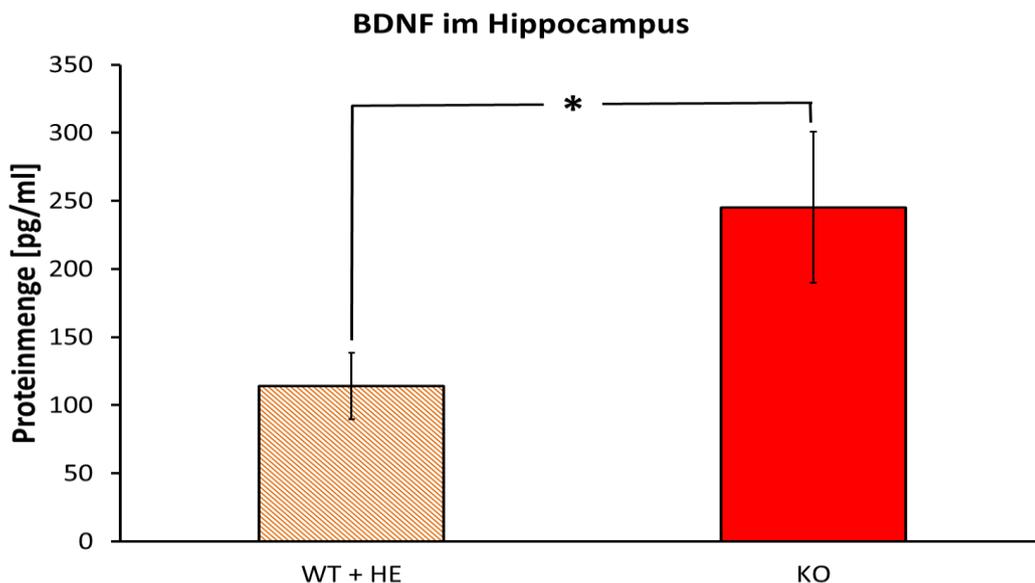


Abb. 21 Darstellung der BDNF-Proteinmenge im Hippocampus mit einem ELISA. Vergleicht man die KO-Mäuse gegen HE und WT zusammen, so zeigt dies einen signifikanten Unterschied. Die KO-Gruppe hatte signifikant mehr BDNF im Vergleich mit HE und KO als gemeinsame Gruppe. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler T-Test \*  $P < 0,05$ )

### 4.3.3. NT3

Beim NT3-Protein unterschieden sich die Gruppen deutlich (Abb. 22; ANOVA  $F_{2,15} = 5,648$   $P < 0,02$ ). Hier zeigten ebenfalls die KO-Mäuse deutlich höhere Werte für NT3 (post-hoc KO vs. WT  $P = 0,005$ ). Es fand sich aber kein Unterschied zwischen KO und HE (post-hoc KO vs. HE  $P = 0,195$ ). Das bedeutet, die HE waren hier mit den KO vergleichbar, denn hier unterschieden sich auch die HE und WT signifikant voneinander (post-hoc HE vs. WT  $P = 0,05$ ).

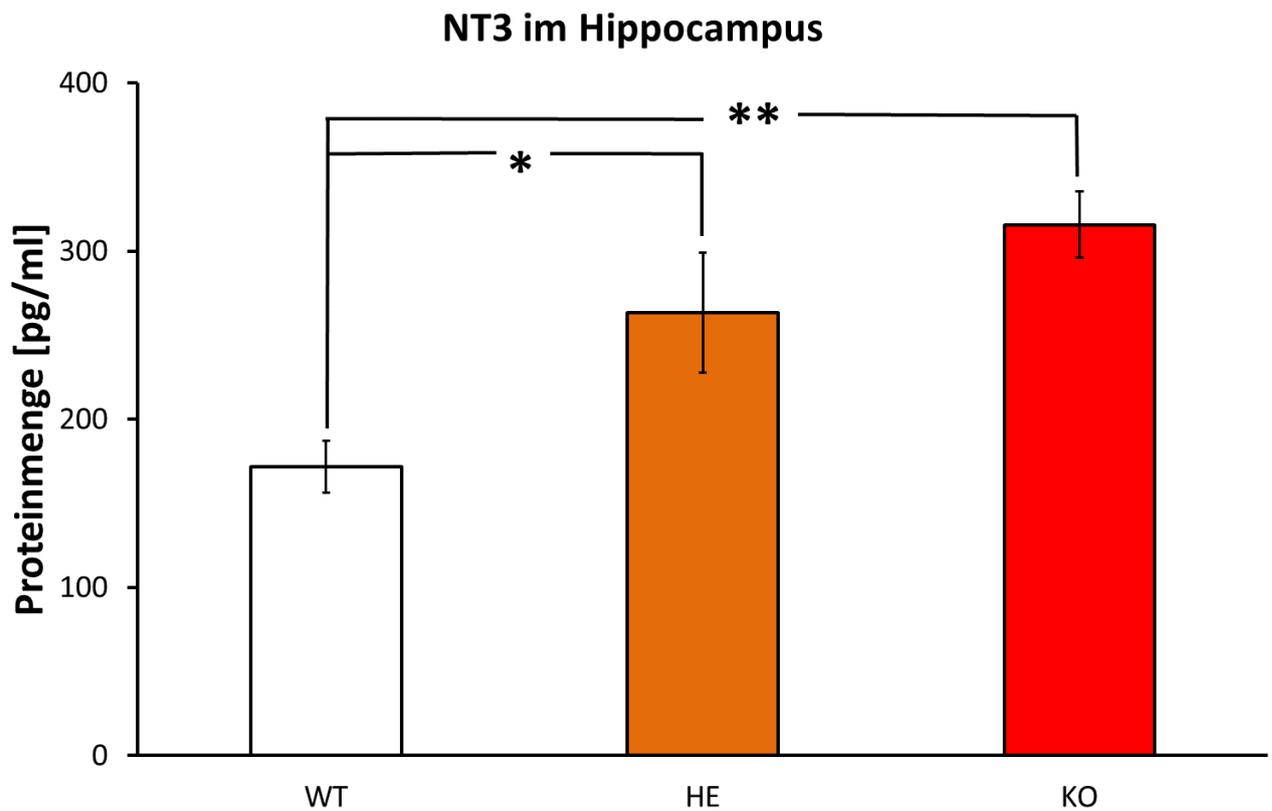


Abb. 22 Darstellung der NT3-Proteinmenge im Hippocampus mit einem ELISA. Sowohl die KO- als auch HE-Mäuse hatten signifikant bzw hochsignifikant mehr NT3 im Hippocampus. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler T-Test \*  $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$ )

## 4. Ergebnisse

### 4.3.4. CRF

Als weiterer Faktor wurde CRF bestimmt. Hier zeigten sich allerdings keine Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen im Hippocampus (Abb. 23; ANOVA  $F_{2,15} = 2,257$   $P = 0,14$ ).

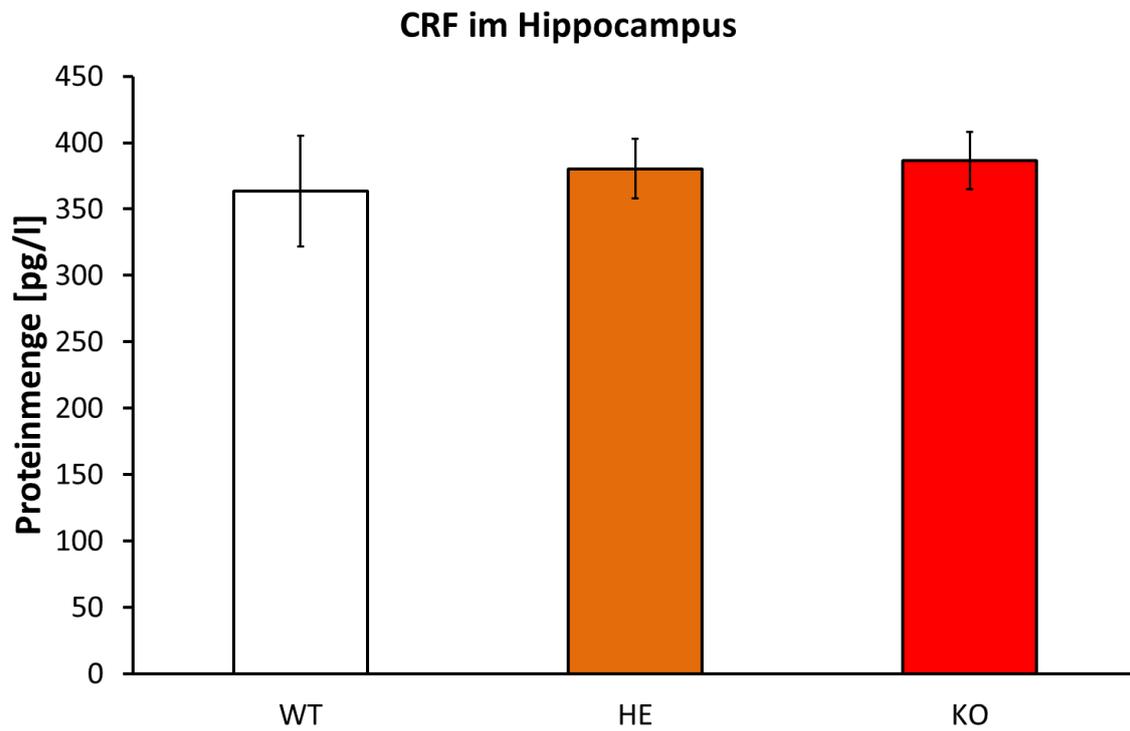


Abb. 23 Darstellung der CRF-Proteinmenge im Hippocampus mit einem ELISA. Es fand sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen im Hippocampus. (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

## **5. Diskussion**

### **5.1. Einleitung**

Das Protein PRG1 wurde 2003 von Bräuer und Mitarbeitern (Bräuer et al. 2003) erstmals in Zellmembranen vorkommend beschrieben und den LPPs zugeordnet. Seitdem wurden sowohl die Struktur als auch seine Funktion näher untersucht. Es wurde bereits gezeigt, dass das Fehlen von PRG1 zu einer gestörten glutamatergen Transmission an Synapsen in Richtung Hyperexzitation und hierbei zu einem erhöhten epileptischen Potential von PRG1-defizienten Jungtieren führt (Trimbuch et al. 2009). Dies wurde im Hippocampus beschrieben, der unter anderem eine wichtige Rolle bei der Lern- und Gedächtnisleistung spielt. Deshalb testete ich homo- und heterozygote PRG1-defiziente Mäuse im Acht-Arm-Radiallabyrinth im Vergleich mit ihren Wildtyp-Geschwistern, um das räumliche Lernen und die Aktivität zu ermitteln. Die Aktivität wurde zuvor schon einmal in einem Open Field (Motility-Box) bestimmt.

Nach Abschluss der Verhaltensuntersuchungen wurden die Tiere getötet und die Gehirne zur weiteren Analyse entnommen. In Abhängigkeit der Verhaltenstests konzentrierte ich mich auf den Hippocampus und MS/DB. Mittels immunhistochemischer Färbungen wurden dabei GABAerge, cholinerge und NPY-haltige Neurone dargestellt und quantifiziert. Weiterhin sollte auch CRF-Neurone quantifiziert werden. Aufgrund einer nicht etablierbaren Immunfärbung für diese Protein in der Maus wurde alternativ der Proteingehalt mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Des Weiteren analysierte ich die Verteilung der MF im Hippocampus im DG und CA3.

Als Ergänzung quantifizierte ich die Konzentration verschiedener Nervenwachstumsfaktoren, welche einen wichtigen Beitrag für die neuronale Plastizität und Neurogenese leisten, in weiteren Gehirnen.

## **5.2. Einfluss von PRG1 auf das Verhalten**

### **5.2.1. Open Field Verhalten – Motility-Box**

In Open Field Modellen wie der Motility-Box wird unter anderem die lokomotorische Aktivität und das Erkundungsverhalten in einer neuen Umgebung gemessen (Burgess et al. 2002; Crawley und Paylor 1997). In den meisten Parametern (Laufstrecke, -zeit, Geschwindigkeit) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Ein signifikanter Unterschied zwischen KO-, HE- und WT-Tieren zeigte sich beim Aufenthalt in den Ecken (Zeit in den Ecken). Dies spricht für eine höhere Aktivität der KO-Tiere, da sich diese weniger in den Ecken aufhalten. Allerdings konnten im Gegensatz dazu Untersuchungen in der Motility-Box mit einer größeren Anzahl an Tieren keine signifikanten Unterschiede bei den Aufenthaltszeiten zeigen (Schneider et al. 2018). Hier ergab sich aber eine signifikant erhöhte Geschwindigkeit sowohl insgesamt als auch in den Ecken und an den Seiten bei den KO-Tieren, was als Hinweis für eine erhöhte Aktivität der PRG1-defizienten Tiere gewertet werden kann (Schneider et al. 2018).

Ausschließlich die KO-Mäuse zeigten ein motorisch-stereotypisches Verhalten wie ein wiederholtes Hochspringen („jumping-behavior“) und das wiederholte/dauerhafte Laufen im Kreis in der Motility-Box. In einem anderen durchgeführten Test konnte zumindest das jumping-behavior quantifiziert werden und erbrachte einen gesteigerten Bewegungsdrang mit sich wiederholendem jumping-behavior der KO (Schneider et al. 2018; unpublished results). Die Motility-Box ist als Open Field Arena relativ klein (45 x 45 cm Grundfläche). In weiteren Untersuchungen konnten in einer größeren Open Field Arena (85 x 85 cm Grundfläche) signifikante Unterschiede zwischen KO und WT in der Laufstrecke und –zeit demonstriert werden. Damit haben die KO-Tiere im Open Field eine erhöhte Aktivität gezeigt (Schneider et al. 2018; Unichenko et al. 2016). Betrachtet man dies vor dem Hintergrund, dass die PRG1-defizienten Tiere in ihren engen Homeboxen und der kleineren Motility-Box das oben beschriebene stereotypische Verhalten zeigten, das im größeren Open Field nicht gezeigt wurde, sollte an einen Zusammenhang zwischen der Größe des Testaufbaus und dem stereotypischen Verhalten gedacht werden. Schneider und Mitarbeiter konnten aber später das stereotypische Verhalten sowohl in der kleineren als auch in der größeren Open Field Arena beobachten. Deshalb könnten diese diskrepanten Ergebnisse mit der unterschiedlichen Anzahl an Versuchstieren zusammenhängen (Schneider et al. 2018).

Zusammenfassend konnten in diesen Untersuchungen die Beobachtungen in beiden Open Field Arenen signifikante Ergebnisse liefern, mit einer deutlicheren Signifikanz des größeren Aufbaus. Allerdings sind meine Ergebnisse in der Motility-Box als Trends der signifikant gemessenen Unterschiede im größeren Open Field zu sehen.

## 5. Diskussion

Der Einfluss der Größe von Open Field Arenen auf das Verhalten wurde bereits früher gezeigt (Lebedev et al. 2012; Shoji 2016). Somit bestätigt sich, dass bei hoher Aktivität der Tiere ein eher größeres Open Field zur Untersuchung eingesetzt werden sollte. Im Gegensatz dazu kann angenommen werden, dass für Analysen motorisch-stereotypischer Verhaltensweisen eine kleinere Arena eher Vorteile bietet.

Zusätzlich bewegten sich die KO-Mäuse in meinen Untersuchungen länger im mittleren Areal des Open Fields. Dies bedeutet zum einen, dass sie möglicherweise weniger ängstlich sind und in das riskantere mittlere Areal gehen bzw. dass sie eine bessere räumliche Orientierung im Vergleich mit den WT-Mäusen besitzen. Auch in den Ergebnissen der kleineren Open Field Arena in den Tests von Schneider und Mitarbeitern (Schneider et al. 2018) verbrachten die PRG1-defizienten Tiere einen, wenn auch nicht signifikant längeren Anteil, in der Mitte der Arena. Die Ergebnisse der größeren Open Field Arena zeigten allerdings eine signifikant geringere Zeit in der Mitte und signifikant weniger Aufrichten im freien Feld. Dies muss kontrovers betrachtet werden, da durch diese Ergebnisse eine schlechtere räumliche Orientierung und ein erhöhtes Angstverhalten der KO-Tieren diskutiert wird (Schneider et al. 2018), was sich auch in meinen Ergebnissen des Radial arm maze bestätigte. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können durchaus durch die unterschiedliche Anzahl der Versuchstiere für die kleinere und größere Open Field Arena und damit verändertem Bias gesehen werden. Auch hierbei zeigt sich erneut der Einfluss der Größe des Aufbaus auf die Ergebnisse.

### 5.2.2. Acht-Arm-Radiallabyrinth

In diesem Test konnte ich darlegen, dass die WT-Mäuse im Vergleich zu den anderen beiden PRG1-defizienten Gruppen eine signifikante Verringerung der WME und damit eine signifikante Verbesserung des räumlichen Lernens zeigen. Die Fehlerquote bei den HE- und KO-Mäusen blieb, während der untersuchten Testtage, praktisch konstant. Auch im zweiten ermittelten Parameter für das räumliche Lernen, der Anzahl neu betretener Arme, zeigten nur die WT eine Verbesserung. Hier ergaben sich auch signifikante Unterschiede zwischen WT und den beiden anderen Gruppen. Die HE und KO verhielten sich in diesem Parameter sehr ähnlich, so dass im räumlichen Lernen kein Gen-Dosis-Effekt beobachtet werden konnte. Dieser Effekt kann aber bei den Ergebnissen der Aktivität diskutiert werden. Hier zeigten sich an den Versuchstagen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die KO-Tiere zeigten eine signifikant höhere Aktivität im Vergleich mit den WT-Mäusen. Bei den HE liegt die Aktivität fast immer im Bereich zwischen den KO- und WT-Geschwistern. Ein Gen-Dosis-Effekt wäre interessant, da angenommen wird, dass Proteine mit enzymatischer Funktion diesen Effekt nicht zeigen (Kondrashov und Koonin 2004). Von PRG1 wird

## 5. Diskussion

angenommen, dass es unter anderem von der Postsynapse aus durch Veränderung des präsynaptisch gelegenen LPA<sub>2</sub>R die Wirkung der LPAs beeinflusst. Eine rein enzymatische Funktion wird aufgrund des Fehlens des Phosphatasemotivs nicht postuliert (Trimbuch et al. 2009). Aktuell ist der genaue Mechanismus der PRG1-Funktion noch ungeklärt, es ist aber bekannt, dass PRG1 postsynaptisch Kalzium-abhängig an Calmodulin bindet, weshalb angenommen wird, dass die postsynaptische Kalziumkonzentration Einfluss auf die Wirkung von PRG1 hat (Tokumitsu et al. 2010; Unichenko et al. 2016). Mittels des Calmodulin-bindenden-Motives bindet PRG1 mit seinem intrazellulär gelegenen C-Terminus an die PP2A, die über  $\beta$ 1-Integrin die synaptische Plastizität und das räumliche Lernen zellautonom reguliert, während man davon ausgeht, dass die Hyperexzitation über den präsynaptisch gelegenen LPA<sub>2</sub>R nicht-zellautonom beeinflusst wird (Liu et al. 2016).

Die höhere Aktivität der KO-Mäuse sehe ich im Rahmen einer gestörten neuronalen Übertragung und Netzwerksynchronisation, die bisher ausschließlich an glutamatergen Neuronen verschiedener Hirnstrukturen, unter anderem dem Hippocampus und dem Neocortex, beobachtet wurde (Unichenko et al. 2016). Es gibt eindeutige Hinweise, dass PRG1 für die sensorische Cortexfunktion mitverantwortlich ist und dadurch zu einer schlechteren sensomotorischen Leistung der KO führt (Unichenko et al. 2016). Die rein motorischen Fähigkeiten zeigen sich bei den PRG1-defizienten Tieren unbeeinträchtigt bzw. sogar besser im Vergleich zu den WT. So wurde in einem Rota-Rod-Test, der die motorischen Fähigkeiten testet, ein hoher Bewegungsdrang und deutlich gesteigerte Aktivität beobachtet. Dabei zeigten die KO ein gesteigertes Ausmaß normaler Reaktionen, vermutlich aufgrund einer verminderten Kontrolle der glutamatergen Exzitation bzw. gestörten Exzitation-Inhibitionsbalance (Schneider et al. 2018). Dies erklärt die erhöhte lokomotorische Aktivität durch das Fehlen von PRG1. PRG1-defiziente Tiere zeigen eine hypersynchronisierte neuronale Aktivität in vivo um den postnatalen 20ten Tag (Trimbuch et al. 2009). Dies bestätigen auch die Ergebnisse von Unichenko und Mitarbeitern, dass in vivo am postnatalen Tag 16-19 PRG1-defiziente Tiere noch eine signifikant erniedrigte spontane synchronisierte Aktivität besitzen, es aber nach P19 zu einer entwicklungsabhängigen Verstärkung der spontanen Aktivität und damit Hypersynchronisation kommt (Unichenko et al. 2016).

Es ist bekannt, dass durch Läsionen des Hippocampus das Arbeitsgedächtnis (=WME) beeinträchtigt wird (Nadel und Hardt 2011). Durch das Fehlen des PRG1 kommt es zu einer Beeinträchtigung der glutamatergen Übertragung und zu einer Funktionseinschränkung der neuronalen Verschaltungen für das räumliche Lernen. Ob auch noch andere Bereiche der Gedächtnisleistung beeinträchtigt sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen, die andere Formen des Lernens und der Gedächtnisleistung bestimmen können.

## 5. Diskussion

Die Unterschiede in der Anzahl der neu besuchten Arme ergaben einen signifikanten Effekt zwischen KO/HE und WT. Dieser Unterschied passt zu der These der eingeschränkten Lernfähigkeit der Tiere mit fehlendem PRG1. Es zeigte sich dabei kein Gen-Dosis-Effekt. Ob dies damit begründet ist, dass das räumliche Gedächtnis zellautonom über die PP2A gesteuert wird und sich damit der Gen-Dosis-Effekt für das PRG1 lediglich auf die Übererregbarkeit der glutamatergen Synapsen und damit die Aktivität bezieht und auf die Lernleistung keinen Einfluss hat, muss in zukünftigen Untersuchungen noch näher betrachtet werden. Berücksichtigen sollte man bei diesem Ergebnis allerdings, dass man die Anzahl der neu betretenen Arme auch im Rahmen des Reference Memory, das nicht durch hippocampale Läsionen beeinflusst wird (Roberts et al. 2015), sehen kann. Damit wären die Ergebnisse und die Frage, ob das PRG1-Defizit auch einen Einfluss auf das Reference Memory hat, weiter zu evaluieren. Insgesamt muss in diesen Untersuchungen beachtet werden, dass diese Leistung des Betretens der neuen Arme insgesamt auch von den WT nur schwach messbar war.

Die Laufzeit, gemessen bis zum Finden der letzten Belohnung, zeigte in diesem Testversuch zwischen den einzelnen Gruppen keinen Unterschied. Interessant war allerdings, dass viele Mäuse aller drei Gruppen die maximal angesetzte Laufzeit von 10 min benötigten. Ein Grund könnte hierfür die insgesamt gesteigerte Aktivität sein, welche die Lernanforderungen bei der Leistung der Mäuse in den Hintergrund stellt. Eine Verlängerung der Laufzeit könnte in einer Folgeuntersuchung möglicherweise eindeutigere Ergebnisse liefern.

### 5.3. Einfluss von PRG1 auf die Morphologie

Zur Untersuchung mit glutamatergen Neuronen verschalteter Neurone wurden verschiedene nicht-glutamaterge Neurone im Hippocampus und Septum untersucht. Eine große Subpopulation GABAerger Neurone wurde hierfür mittels PARV-Immunfärbung im MS/DB und im Hippocampus dargestellt. GABA ist ein sehr wichtiger inhibitorischer Transmitter im adulten zentralen Nervensystem (Cherubini und Conti 2001). Er spielt unter anderem eine entscheidende Rolle bei bestimmten Epilepsieformen (Ben-Ari und Holmes 2005), bei Angststörungen (Crestani et al. 1999), aber auch bei Lern- und Gedächtnisstörungen (Mody 2005), der Regulation des Schlafes (Turek und Losee-Olson 1986) und im nozizeptiven System (Jasmin et al. 2003). Obwohl die Anzahl der GABAergen Neurone in der CA1-Region weniger als 10 Prozent der Gesamtzahl der Neurone dieser Region ausmacht, hat das GABAerge System dort durch seine intrinsisch-divergente Verschaltung einen großen inhibitorischen Einfluss (Freund und Gulyás 1997). Auch im Septum finden sich GABAerge Neurone, die an der Gedächtnis- und Lernleistung beteiligt sind. Durch die immunhistochemischen Färbungen konnten jedoch weder im MS/DB noch im Hippocampus ein signifikanter Unterschied zwischen den WT-, KO- und HE-Geschwistertieren gezeigt

## 5. Diskussion

werden. Tendenziell zeigte die HE-Gruppe die niedrigsten Werte, wohingegen WT und KO sehr ähnliche Mengen Parvalbumin-positiver Neurone aufwiesen. Damit konnte in meiner Arbeit kein Effekt des PRG1 auf die Anzahl der GABAergen Neurone im Hippocampus und MS/DB gezeigt werden.

Eine weitere von mir untersuchte Neuronenpopulation waren die cholinergen Neurone im MS/DB. Man findet cholinerge Neurone unter anderem im basalen Vorderhirn, genauer im Nucleus basalis Meynert, der in den Neocortex projiziert und dem medialen septalen Nucleus, der in den Hippocampus und Teile des cerebralen Cortex projiziert. Cholinerge Neurone haben damit Einfluss auf die zahlreichte Verhaltensweisen wie Schlaf (Jones 2005), anhaltende Aufmerksamkeit, Aktivität und Erregung (Himmelheber et al. 2000) sowie der Lern- und Gedächtnisleistung (Ridley et al. 1984). Die Anzahl der cholinergen Neurone im MS/DB zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den drei untersuchten Gruppen. Somit scheint ein Einfluss dieser cholinergen Neurone auf die Unterschiede der Lernleistung sowie auch der Aufmerksamkeit und Aktivität in meinen Untersuchungen nicht vorhanden zu sein. Des Weiteren zeigt das Ergebnis dieser Arbeit, dass das Fehlen von PRG1 keinen Einfluss auf die Anzahl der cholinergen Neurone im Bereich des MS/DB hat.

Neurone mit NPY wurden ebenfalls immunhistochemisch dargestellt und quantifiziert. NPY wird in GABAergen Neuronen hergestellt, als Co-Faktor entlassen und wirkt nach anterogradem Transport sowohl prä- als auch postsynaptisch. Es beeinflusst die Nahrungsaufnahme, den Blutdruck, das Krampfpotential, Angstzustände, die Knochenbildung, den Schmerz, Depressionen und Drogenabhängigkeit (Decressac und Barker 2012). Zusätzlich wird es mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Chorea Huntington, der Alzheimer Erkrankung und Morbus Parkinson in Verbindung gebracht. Es spielt bei der Neurogenese, die im adulten Gehirn lediglich in der subventrikulären Zone und dem Gyrus dentatus des Hippocampus stattfindet, als Co-Faktor eine entscheidende Rolle (Decressac und Barker 2012). In dieser Arbeit wurden allerdings nur die KO- und WT-Mäuse verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Anzahl der NPY-immunpositiven Neurone im DG bei den homozygot PRG1-defizienten Tieren. Bereits Ende des letzten Jahrhunderts wurde durch mehrere Autoren beschrieben, dass NPY an den Körnerzellen, MF und Interneuronen (Chafetz et al. 1995; Gruber et al. 1994; Schwarzer et al. 1995; Takahashi et al. 2000) ebenso wie sein Y2-Rezeptor an den MF und Schaffer-Kollateralen (Schwarzer et al. 1998) nach epileptischen Anfällen hochreguliert wird. Dadurch wird die Glutamatfreisetzung gehemmt (Colmers et al. 1987; Greber et al. 1994) und NPY als antikonvulsiver Faktor beschrieben (Bijak 1995; Klapstein und Colmers 1997; Smiałowska et al. 1996; Vezzani et al. 1994). Somit könnte bei den KO-Mäusen mit einer erhöhten Aktivität die Erhöhung der Anzahl der NPY-immunpositiven Neurone eine protektive Wirkung haben.

Meine Ergebnisse der Flächenmessung der MF zeigten bei den PRG1-defizienten Tieren eine signifikant größere Fläche im DG und IIPMF, wohingegen die SPMF einen Trend zeigten, aber kein signifikantes Ergebnis. Betrachtet man allerdings die gesamten MF, ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Hier wäre es möglich, eine Folgestudie mit einer größeren Anzahl an Tieren durchzuführen. Eine Ursache für die erhöhte IIPMF-Dichte könnte auch sein, dass dieser Teil der MF stärker auf äußere, neuronale, Stimulationen reagiert und sich dadurch mehr ausbreitet (Isgor et al. 2015; Ramos-Languren und Escobar 2013; Römer et al. 2011). Durch Crusio und Schwegler wurde beschrieben, dass eine Erhöhung der IIPMF mit einer verbesserten räumlichen Lernleistung (Crusio et al. 1987) und die Größe der IIPMF mit der LTP nach tetanischer Reizung korreliert (Heimrich et al. 1989). Diese Ergebnisse bestätigten sich in meinen Untersuchungen leider nicht. Es scheint sich hierbei möglicherweise um eine Um- oder Neuorganisation der MF durch das PRG1-Defizit zu handeln. Ein weiterer Aspekt einer schlechteren räumlichen Lernleistung trotz erhöhtem IIPMF könnte in der generellen Hyperexzitation dieser auch glutamatergen Fasern liegen.

Frühere Untersuchungen ergaben weiterhin, dass eine erhöhte Konzentration an NPY direkt mit einer erhöhten Ausschüttung an CRF zusammenhängt (Haas und George 1989). In der Angstkonditionierung werden sie als Gegenspieler beschrieben (Sajdyk et al. 2004). Deshalb bestimmte ich in meiner Arbeit auch die Konzentration von CRF im Hippocampus. CRF wird in Stresssituationen hochreguliert und sorgt über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse für eine erhöhte Glucocorticoid-Ausschüttung, während NPY diese Stressantwort kompensieren kann (Sajdyk et al. 2004). In dieser Arbeit wurden im Hippocampus keine erhöhten Konzentrationen an CRF gemessen. In einer weiteren Arbeit zeigten sich in der Amygdala ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. In beiden Hirnregionen zeigen die KO-Mäuse eine Tendenz zu erhöhten CRF-Konzentrationen (Dissertation Petzold 2017).

### **5.4. Einfluss von PRG1 auf die Wachstumsfaktoren**

Die Wachstumsfaktoren NGF, BDNF und NT3 werden ebenso wie die spezifischen Rezeptoren TrKA, TrKB und TrKC in einem hohen Maß im Hippocampus, aber auch im basalen Vorderhirn und Neocortex exprimiert (Lessmann 1998). Dabei zählt das enge Zusammenspiel von Glutamat und den Neurotrophinen als einer der wichtigsten Faktoren der neuronalen Plastizität (Lessmann 1998; Mattson 2008). BDNF und NT3 erhöhen die Glutamatfreisetzung der präsynaptischen Membran (Lessmann 1998), zudem schützen sie vor glutamatinduzierter Neurotoxizität (Cheng und Mattson 1994). Wir bestimmten die Proteinkonzentrationen mittels ELISA. Dabei konnte für NGF im Hippocampus kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Allerdings zeigte sich die Konzentration von

## 5. Diskussion

BDNF der KO-Tiere im Vergleich zu den zusammengerechneten Werten der WT- und HE-Geschwister signifikant erhöht. BDNF verstärkt unter anderem akut die glutamaterge synaptischen Transmission und verändert die GABAerge Transmission. Es beeinflusst längerfristig die Reifung der Neurone und der embryonalen Stammzellen. Zudem wird es für die Bildung von synaptischen Vesikeln nach tetanischer Stimulation benötigt und ist ein wichtiger Faktor der LTP an glutamatergen und GABAergen Synapsen (Gottmann et al. 2009). Die Konzentration von BDNF steigt nach epileptischen Anfällen (Mattson 2008). Betrachtet man die Hyperexzitation der PRG1-defizienten Tiere, die sich bei mir als signifikant erhöhte Aktivität im Acht-Arm-Radiallabyrinth und als erhöhte Aktivität in der Motility-Box sowie bei Trimbuch und Mitarbeitern (Trimbuch et al. 2009) als Übererregbarkeit der glutamatergen Neurone mit dem Tod von etwa 50 Prozent der Tiere durch epileptische Anfälle im Alter von 3 bis 4 Wochen zeigt, könnte man dies als Erklärung für die BDNF-Erhöhung sehen. Die Daten der im epileptischen Anfall verstorbenen Mäuse liegen hierzu nicht vor. Somit deutet aber der Trend in der erhöhten Menge an BDNF bei KO-Mäusen hier in diese Richtung.

Meine Untersuchungen ergaben, dass die KO-Tiere eine signifikant höhere Konzentration an NT3 im Vergleich zu ihren WT-Geschwistern zeigen und auch die HE-Tiere sich signifikant von den WT unterscheiden. Von NT3 ist bekannt, dass es Einfluss auf die Entwicklung von Neuriten, die Neurogenese sowie ihren Erhalt hat, aber auch mit dem Herstellen neuer Verbindungen zusammen hängt (McAllister et al. 1995; Shimazu et al. 2006). Dabei wirkt NT3 mit hoher Affinität über TrKC (Huang und Reichardt 2001), beide sind in hoher Konzentration im Hippocampus des adulten Gehirns zu finden (Ramos-Languren und Escobar 2013). TrKC wird dort gemeinsam mit TrKB an den Moosfaserenden beschrieben und sorgt für eine korrekte Aussprossung der Axone (Otal et al. 2005; Martínez et al. 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte NT3-Konzentration zu einer verstärkten Verbindung zwischen DG und CA3 führt, also zu einer Potenzierung der MF (Ramos-Languren und Escobar 2013). Dies zeigt sich im Einklang mit meinen Ergebnissen der TIMM-Färbung, da ich hierbei eine signifikant erhöhte Fläche an MF der PRG1-defizienten Tiere messen konnte. Funktionell in Bezug auf das räumliche Lernen scheint die synaptische Verschaltung der MF allerdings unvollständig oder fehlerhaft zu erfolgen.

Ein Aspekt der Erhöhung der Wachstumsfaktoren im Rahmen der glutamatinduzierten, ungerichteten Hyperexzitation ist die protektive Wirkung vor einer glutamatinduzierten Neurotoxizität. BDNF und NT3 stabilisieren die Kalzium-Homöostase und können erwiesenermaßen die Zellen im Hippocampus vor der exzitotoxischen Wirkung des Glutamats schützen, indem sie die mögliche toxische Glutamatwirkung modifizieren und damit für einen Schutz der Zelle sorgen (Cheng und Mattson 1994).

## 5. Diskussion

In der Literatur wird zudem beschrieben, dass die mRNA von NT3 aber auch von BDNF und ihrer spezifischen Rezeptoren durch die Induktion der LTP hochreguliert wird (Patterson et al. 1992). Betrachtet man dies vor dem Hintergrund, dass die LTP durch die hochfrequente Reizung an glutamatergen Synapsen entsteht, kann man dies der ungerichteten glutamatergen Erregung durch den PRG1-Mangel zurechnen. In Folge dessen kommt es zu einer ungezielten Umorganisation durch LTP, wobei die Verbindungen an Größe zunehmen und verstärkt werden.

### 5.5. Schlussfolgerung

Es konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass ein PRG1-Defizit zu Mängeln im räumlichen Lernen führt. Hierzu zeigen sowohl homozygot- als auch heterozygot-defiziente Mäuse keine Verbesserung der Lernleistung im Radiallabyrinth.

Daneben ist eine gesteigerte Aktivität verbunden mit stereotypischem Verhalten zu beobachten. Möglicherweise führt diese erhöhte Aktivität zu der Unfähigkeit, das Lernen zu verbessern. Hierzu wären weitere Untersuchungen sinnvoll. So könnte man weitere Lernmodelle testen, wie z.B. das *Morris water maze*, was allerdings weiteren Stress für die Tiere bedeutet, das *Barnes maze* und *Y maze* oder ein nicht-räumliches Lernmodell analysieren. In allen Modellen wäre allerdings die Aktivität nur bedingt einschränkbar.

Für diese Defizite im Verhalten werden Defizite in der glutamatergen Netzwerkkoordination der Neurone im Sinne einer input/output-Dysbalance diskutiert (Unichenko et al. 2016). Weitere Untersuchungen zum Angst- und Furchtverhalten zeigten deutliche Unterschiede. Hier demonstrierten die PRG1-defizienten Tiere deutlich weniger Angst und Furcht (Dissertation Petzold 2017). Auch in diesen Untersuchungen zeigten die KO-Tiere eine erhöhte Aktivität. Somit scheinen verschiedene Systeme durch das Fehlen von PRG1 unterschiedlich stark beeinträchtigt zu werden. Das ist nicht allzu überraschend, da glutamaterge Neurone in allen Systemen eine Rolle spielen. Die Stärke der Defizite hängen dann meiner Meinung nach von möglichen Kompensationsmöglichkeiten und Redundanzen in den Systemen ab.

Morphologische Veränderungen sind in dieser Studie relativ gering beobachtet worden. Eine Erhöhung von NPY im Hippocampus sowie die Vergrößerung der Moosfasern im Hippocampus der KO-Tiere sind wesentliche, hier gezeigte Ergebnisse. Das passt zum einen zur NPY-Erhöhung als antikonvulsive Faktor (Bijak 1995; Smiałowska et al. 1996; Klapstein und Colmers 1997; Vezzani et al. 1994), zum anderen zu Untersuchungen bei Epilepsie mit Veränderungen in der Organisation der Fasern im Hippocampus (Buckmaster 2012; Houser et al. 1990).

## 5. Diskussion

Eine wichtige Rolle bei der PRG1-Interaktion scheinen die Wachstumsfaktoren NT3 und eventuell BDNF zu spielen. Beide werden unter anderem auch im Hippocampus exprimiert. Der aus cholinergen Neuronen stammende NGF scheint nicht involviert zu sein.

## 6. Zusammenfassung

Das Protein Plasticity Related Gene 1 (PRG1) wurde 2003 an der postsynaptischen Zellmembran glutamatergen Synapsen entdeckt und zeigt Ähnlichkeit mit den Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP) (Bräuer et al. 2003; Trimbuch et al. 2009). Der genaue Funktionsmechanismus des PRG1 ist aktuell noch ungeklärt, es fungiert zum Beispiel über Lysophosphatidat (LPA). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es bei PRG1-defizienten Tieren aufgrund des LPA-Überschuss zu einer Übererregung an glutamatergen Neuronen und damit eingeschränkter synaptischer Information kommt (Trimbuch et al. 2009). In meinen Untersuchungen verglich ich homozygote (KO), heterozygote (HE) PRG1-defiziente Tiere sowie ihre Wildtyp (WT)-Geschwister in verschiedenen Verhaltenstests. Zum einen konnten meine Ergebnisse eine erhöhte Aktivität im Acht-Arm-Labyrinth der KO sowie eine schlechtere räumliche Lernleistung der PRG1-defizienten Tiere zeigen. In der Motility-Box zeigten die KO ebenso wie in ihren Homeboxen ein motorisch-stereotypisches Verhalten. In den Untersuchungen ergaben sich Ergebnisse mit und ohne Gen-Dosis-Effekt. Aufgrund der Ergebnisse in den Verhaltenstests zeigten die für die morphologischen Untersuchung nach dem Töten der Tiere ausgewählten Bereiche, MS/DB und Hippocampus, dass zum einen die NPY-Konzentration und zum anderen, dass der Anteil der Moosfasern, besonders im Bereich Gyrus dentatus (DG) und der infra/intrapiramidalen Moosfasern (IIPMF), bei den KO signifikant erhöht ist. Die Bestimmung der Konzentration an Wachstumsfaktoren ergab im Bereich des Hippocampus bei den PRG1-defizienten Tieren eine signifikant erhöhte Konzentration an NT3 sowie einen Trend zu erhöhter Konzentration an BDNF bei den KO. Meine Arbeit konnte zusammenfassend zeigen, dass das räumliche Lernverhalten im Radial arm maze (working memory) durch das Fehlen von PRG1 beeinträchtigt ist, zusätzlich zeigte sich die Aktivität der PRG1-defizienten Tiere erhöht. Durch das stereotypische Verhalten, das KO in ihren Homeboxen zeigten, muss ein Zusammenhang des Proteins mit neuropsychiatrischen Erkrankungen hergestellt werden (Petzold et al. 2016). Bei den morphologischen Ergebnissen sehe ich die NPY-Erhöhung des DG als antikonvulsiven Faktor (Bijak 1995; Klapstein und Colmers 1997; Smiałowska et al. 1996; Vezzani et al. 1994) durch Hemmung der Glutamatfreisetzung (Colmers et al. 1987; Greber et al. 1994; Haas et al. 1987). Die Vergrößerung der Moosfaserflächen bei den PRG1-defizienten Tieren spricht für eine Um- bzw.- Neuorganisation ohne Verbesserung der räumlichen Lernleistung. Ob diese morphologische Veränderung Einfluss auf weitere Lernbereiche hat, müssen weitere Verhaltenstests zeigen. Die signifikante Erhöhung des Wachstumsfaktors NT3 bei den PRG1-defizienten Tieren kann einerseits zu einer Verstärkung der Moosfaserverbindungen führen (Ramos-Languren und Escobar 2013), kann aber auch, ebenso wie die nicht signifikante aber tendenzielle Erhöhung von BDNF, einen Schutzmechanismus vor einer glutamatinduzierten Neurotoxizität darstellen (Cheng und Mattson 1994).

## 7. Literaturverzeichnis

1. Althaus, H. H. (2004): Remyelination in multiple sclerosis. A new role for neurotrophins? In: *Progress in brain research* 146, S. 415–432. DOI: 10.1016/S0079-6123(03)46026-3.
2. Arancio, O.; Chao, M. V. (2007): Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. In: *Current opinion in neurobiology* 17 (3), S. 325–330. DOI: 10.1016/j.conb.2007.03.013.
3. Arévalo, J. C.; Wu, S. H. (2006): Neurotrophin signaling. Many exciting surprises! In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 63 (13), S. 1523–1537. DOI: 10.1007/s00018-006-6010-1.
4. Asanuma, K.; Kim, K.; Oh, J.; Giardino, L.; Chabanis, S.; Faul, C. et al. (2005): Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. In: *The Journal of clinical investigation* 115 (5), S. 1188–1198. DOI: 10.1172/JCI23371.
5. Atkinson, R. C. & Shiffrin, R. M. (1968). Human memory: A proposed system and its control processes. In K. W. Spence & J. T. Spence (Eds.), *The psychology of learning and motivation: Advances in research and theory* (pp. 89-195). New York: Academic Press.
6. Atkinson, R. C. & Shiffrin, R. M. (1971). The control of short-term memory. *Scientific American*, 225 (2), 82-90.
7. Baddeley (2000): The episodic buffer. A new component of working memory? In: *Trends in cognitive sciences* 4 (11), S. 417–423.
8. Baddeley, A. (2003): Working memory. Looking back and looking forward. In: *Nature reviews. Neuroscience* 4 (10), S. 829–839. DOI: 10.1038/nrn1201.
9. Bähr, M.; Frotscher, M. (2014): Neurologisch-topische Diagnostik. Anatomie ; Funktion ; Klinik. 10. Aufl. s.l.: Georg Thieme Verlag KG. DOI: 10.1055/b-002-99152.
10. Barbosa, I. G.; Huguet, R. B.; Neves, F. S.; Reis, H. J.; Bauer, M. E.; Janka, Z. et al. (2011): Impaired nerve growth factor homeostasis in patients with bipolar disorder. In: *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry* 12 (3), S. 228–232. DOI: 10.3109/15622975.2010.518629.
11. Bartkowska, K.; Paquin, A.; Gauthier, A. S.; Kaplan, D. R.; Miller, F. D. (2007): Trk signaling regulates neural precursor cell proliferation and differentiation during cortical development. In: *Development (Cambridge, England)* 134 (24), S. 4369–4380. DOI: 10.1242/dev.008227.
12. Bath, K. G.; Akins, M. R.; Lee, F. S. (2012): BDNF control of adult SVZ neurogenesis. In: *Developmental psychobiology* 54 (6), S. 578–589. DOI: 10.1002/dev.20546.
13. Bekinschtein, P.; Cammarota, M.; Katche, C.; Slipczuk, Leandro; Rossato, J. I.; Goldin, A. et al. (2008): BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (7), S. 2711–2716. DOI: 10.1073/pnas.0711863105.
14. Ben-Ari, Y.; Holmes, G. L. (2005): The multiple facets of gamma-aminobutyric acid dysfunction in epilepsy. In: *Current opinion in neurology* 18 (2), S. 141–145.

## 7. Literaturverzeichnis

15. Betz, A.; Thakur, P.; Junge, H. J.; Ashery, U.; Rhee, J. S.; Scheuss, V. et al. (2001): Functional interaction of the active zone proteins Munc13-1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. In: *Neuron* 30 (1), S. 183–196.
16. Bijak, M. (1995): Inhibitory effect of neuropeptide y on epileptiform activity in the frontal cortex and hippocampus in vitro. In: *Polish journal of pharmacology* 47 (5), S. 461–463.
17. Bower, G. H. (1973): The psychology of learning and motivation. Advances in research and theory. New York: Academic Press (The psychology of learning and motivation, 7).
18. Bräuer, A. U.; Nitsch, R. (2008): Plasticity-related genes (PRGs/LRPs). A brain-specific class of lysophospholipid-modifying proteins. In: *Biochimica et biophysica acta* 1781 (9), S. 595–600. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2008.04.004.
19. Bräuer, A. U.; Savaskan, N. E.; Kühn, H.; Prehn, S.; Ninnemann, O.; Nitsch, R. (2003): A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting. In: *Nature neuroscience* 6 (6), S. 572–578. DOI: 10.1038/nn1052.
20. Brindley, D. N.; Waggoner, D. W. (1998): Mammalian lipid phosphate phosphohydrolases. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (38), S. 24281–24284.
21. Brindley, D. N. (2004): Lipid phosphate phosphatases and related proteins. Signaling functions in development, cell division, and cancer. In: *Journal of cellular biochemistry* 92 (5), S. 900–912. DOI: 10.1002/jcb.20126.
22. Brindley, D. N.; English, D.; Pilquil, C.; Buri, K.; Ling, Z. C. (2002): Lipid phosphate phosphatases regulate signal transduction through glycerolipids and sphingolipids. In: *Biochimica et biophysica acta* 1582 (1-3), S. 33–44.
23. Brindley, D. N.; Pilquil, C. (2009): Lipid phosphate phosphatases and signaling. In: *Journal of lipid research* 50 Suppl, S225-30. DOI: 10.1194/jlr.R800055-JLR200.
24. Brindley, D. N.; Pilquil, C.; Sariahmetoglu, M.; Reue, K. (2009): Phosphatidate degradation. Phosphatidate phosphatases (lipins) and lipid phosphate phosphatases. In: *Biochimica et biophysica acta* 1791 (9), S. 956–961. DOI: 10.1016/j.bbaliip.2009.02.007.
25. Brogkini, T.; Nitsch, R.; Savaskan, N. E. (2010): Plasticity-related gene 5 (PRG5) induces filopodia and neurite growth and impedes lysophosphatidic acid- and nogo-A-mediated axonal retraction. In: *Molecular biology of the cell* 21 (4), S. 521–537. DOI: 10.1091/mbc.E09-06-0506.
26. Brunoni, A. R.; Lopes, M.; Fregni, F. (2008): A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels. Implications for the role of neuroplasticity in depression. In: *The international journal of neuropsychopharmacology* 11 (8), S. 1169–1180. DOI: 10.1017/S1461145708009309.
27. Buckmaster, P. S. (2012): Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. Mossy Fiber Sprouting in the Dentate Gyrus. 4th. Hg. v. Jeffrey L. Noebels, Massimo Avoli, Michael A. Rogawski, Richard W. Olsen und Antonio V. Delgado-Escueta. Bethesda (MD).
28. Burgess, N.; Maguire, E. A.; O'Keefe, J. (2002): The human hippocampus and spatial and episodic memory. In: *Neuron* 35 (4), S. 625–641.

## 7. Literaturverzeichnis

29. Caldeira, M. V.; Melo, C. V.; Pereira, D. B.; Carvalho, R.; Correia, S. S.; Backos, D. S. et al. (2007): Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (17), S. 12619–12628. DOI: 10.1074/jbc.M700607200.
30. Chafetz, R. S.; Nahm, W. K.; Noebels, J. L. (1995): Aberrant expression of neuropeptide Y in hippocampal mossy fibers in the absence of local cell injury following the onset of spike-wave synchronization. In: *Brain research. Molecular brain research* 31 (1-2), S. 111–121.
31. Chaldakov, G. N.; Fiore, M.; Stankulov, I. S.; Manni, L.; Hristova, M. G.; Antonelli, A. et al. (2004): Neurotrophin presence in human coronary atherosclerosis and metabolic syndrome. A role for NGF and BDNF in cardiovascular disease? In: *Progress in brain research* 146, S. 279–289. DOI: 10.1016/S0079-6123(03)46018-4.
32. Chaldakov, G. N.; Tonchev, A. B.; Aloe, L. (2009): NGF and BDNF. From nerves to adipose tissue, from neurokinines to metabokines. In: *Rivista di psichiatria* 44 (2), S. 79–87.
33. Cheng, B.; Mattson, M. P. (1994): NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. In: *Brain research* 640 (1-2), S. 56–67.
34. Cherubini, E.; Conti, F. (2001): Generating diversity at GABAergic synapses. In: *Trends in neurosciences* 24 (3), S. 155–162.
35. Choi, J. W.; Herr, D. R.; Noguchi, K.; Yung, Y. C.; Lee, C.-W.; Mutoh, T. et al. (2010): LPA receptors. Subtypes and biological actions. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 50, S. 157–186. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105753.
36. Chou, W.-H.; Wang, D.; McMahon, T.; Qi, Z.-H.; Song, M.; Zhang, C. et al. (2010): GABAA receptor trafficking is regulated by protein kinase C(epsilon) and the N-ethylmaleimide-sensitive factor. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (42), S. 13955–13965. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0270-10.2010.
37. Chun, J.; Hla, T.; Lynch, K. R.; Spiegel, S.; Moolenaar, W. H. (2010): International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. In: *Pharmacological reviews* 62 (4), S. 579–587. DOI: 10.1124/pr.110.003111.
38. Citri, A.; Malenka, R. C. (2008): Synaptic plasticity. Multiple forms, functions, and mechanisms. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 33 (1), S. 18–41. DOI: 10.1038/sj.npp.1301559.
39. Colmers, W. F.; Lukowiak, K.; Pittman, Q. J. (1987): Presynaptic action of neuropeptide Y in area CA1 of the rat hippocampal slice. In: *The Journal of physiology* 383, S. 285–299.
40. Conn, P. J.; Pin, J. P. (1997): Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 37, S. 205–237. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.205.
41. Cotman, C. W.; Berchtold, N. C. (2002): Exercise. A behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. In: *Trends in neurosciences* 25 (6), S. 295–301.

## 7. Literaturverzeichnis

42. Counts, S. E.; Mufson, E. J. (2005): The role of nerve growth factor receptors in cholinergic basal forebrain degeneration in prodromal Alzheimer disease. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 64 (4), S. 263–272.
43. Crawley, J. N.; Paylor, R. (1997): A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. In: *Hormones and behavior* 31 (3), S. 197–211. DOI: 10.1006/hbeh.1997.1382.
44. Crestani, F.; Lorez, M.; Baer, K.; Essrich, C.; Benke, D.; Laurent, J. P. et al. (1999): Decreased GABAA-receptor clustering results in enhanced anxiety and a bias for threat cues. In: *Nature neuroscience* 2 (9), S. 833–839. DOI: 10.1038/12207.
45. Crusio, W. E.; Schwegler, H.; Lipp, H. P. (1987): Radial-maze performance and structural variation of the hippocampus in mice. A correlation with mossy fibre distribution. In: *Brain research* 425 (1), S. 182–185.
46. Crusio, W. E.; Schwegler, H. (2005): Learning spatial orientation tasks in the radial-maze and structural variation in the hippocampus in inbred mice. In: *Behavioral and brain functions : BBF* 1 (1), S. 3. DOI: 10.1186/1744-9081-1-3.
47. Decressac, M.; Barker, R. A. (2012): Neuropeptide Y and its role in CNS disease and repair. In: *Experimental neurology* 238 (2), S. 265–272. DOI: 10.1016/j.expneurol.2012.09.004.
48. Deller, T.; Mundel, P.; Frotscher, M. (2000): Potential role of synaptopodin in spine motility by coupling actin to the spine apparatus. In: *Hippocampus* 10 (5), S. 569–581. DOI: 10.1002/1098-1063(2000)10:5<569::AID-HIPO7>3.0.CO;2-M.
49. Dingledine, R.; Borges, K.; Bowie, D.; Traynelis, S. F. (1999): The glutamate receptor ion channels. In: *Pharmacological reviews* 51 (1), S. 7–61.
50. Dwivedi, Y. (2009): Brain-derived neurotrophic factor. Role in depression and suicide. In: *Neuropsychiatric disease and treatment* 5, S. 433–449.
51. Eichholtz, T.; Jalink, K.; Fahrenfort, I.; Moolenaar, W. H. (1993): The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. In: *The Biochemical journal* 291 (Pt 3), S. 677–680.
52. Eriksson, P. S.; Perfilieva, E.; Björk-Eriksson, T.; Alborn, A. M.; Nordborg, C.; Peterson, D. A.; Gage, F. H. (1998): Neurogenesis in the adult human hippocampus. In: *Nature medicine* 4 (11), S. 1313–1317. DOI: 10.1038/3305.
53. Ernfors, P.; Ibáñez, C. F.; Ebendal, T.; Olson, L.; Persson, H. (1990): Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor. Developmental and topographical expression in the brain. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (14), S. 5454–5458.
54. Freund, T. F.; Gulyás, A. I. (1997): Inhibitory control of GABAergic interneurons in the hippocampus. In: *Canadian journal of physiology and pharmacology* 75 (5), S. 479–487.
55. Fukushima, N.; Weiner, J. A.; Kaushal, D.; Contos, J. J. A.; Rehen, S. K.; Kingsbury, M. A. et al. (2002): Lysophosphatidic acid influences the morphology and motility of young, postmitotic cortical neurons. In: *Molecular and cellular neurosciences* 20 (2), S. 271–282.

## 7. Literaturverzeichnis

56. Gerlai, R. T.; McNamara, A.; Williams, S.; Phillips, H. S. (2002): Hippocampal dysfunction and behavioral deficit in the water maze in mice. An unresolved issue? In: *Brain research bulletin* 57 (1), S. 3–9.
57. Gitler, D.; Xu, Y.; Kao, H.-T.; Lin, D.; Lim, S.; Feng, J. et al. (2004): Molecular determinants of synapsin targeting to presynaptic terminals. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (14), S. 3711–3720. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5225-03.2004.
58. Gluck, M. A.; Mercado, E.; Myers, C. E. (2008): Learning and memory. From brain to behavior. New York: Worth Publishers.
59. Gorbachevskaya, N.; Bashina, V.; Gratchev, V.; Iznak, A. (2001): Cerebrolysin therapy in Rett syndrome. Clinical and EEG mapping study. In: *Brain & development* 23 Suppl 1, S90-3.
60. Gottmann, K.; Mittmann, T.; Lessmann, V. (2009): BDNF signaling in the formation, maturation and plasticity of glutamatergic and GABAergic synapses. In: *Experimental brain research* 199 (3-4), S. 203–234. DOI: 10.1007/s00221-009-1994-z.
61. Götz, R.; Köster, R.; Winkler, C.; Raulf, F.; Lottspeich, F.; Scharf, M.; Thoenen, H. (1994): Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. In: *Nature* 372 (6503), S. 266–269. DOI: 10.1038/372266a0.
62. Gould, E.; Reeves, A. J.; Graziano, M. S.; Gross, C. G. (1999): Neurogenesis in the neocortex of adult primates. In: *Science (New York, N.Y.)* 286 (5439), S. 548–552.
63. Greber, S.; Schwarzer, C.; Sperk, G. (1994): Neuropeptide Y inhibits potassium-stimulated glutamate release through Y2 receptors in rat hippocampal slices in vitro. In: *British journal of pharmacology* 113 (3), S. 737–740.
64. Gruber, B.; Greber, S.; Rupp, E.; Sperk, G. (1994): Differential NPY mRNA expression in granule cells and interneurons of the rat dentate gyrus after kainic acid injection. In: *Hippocampus* 4 (4), S. 474–482. DOI: 10.1002/hipo.450040409.
65. Haas, D. A.; George, S. R. (1989): Neuropeptide Y-induced effects on hypothalamic corticotropin-releasing factor content and release are dependent on noradrenergic/adrenergic neurotransmission. In: *Brain research* 498 (2), S. 333–338. DOI: 10.1016/0006-8993(89)91112-8.
66. Haas, H. L.; Hermann, A.; Greene, R. W.; Chan-Palay, V. (1987): Action and location of neuropeptide tyrosine (Y) on hippocampal neurons of the rat in slice preparations. In: *The Journal of comparative neurology* 257 (2), S. 208–215. DOI: 10.1002/cne.902570207.
67. Hama, K.; Bando, K.; Kakehi, Y.; Aoki, J.; Arai, H. (2002): Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids. Possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors. In: *FEBS letters* 523 (1-3), S. 187–192.
68. Harrington, A. W.; Ginty, D. D. (2013): Long-distance retrograde neurotrophic factor signalling in neurons. In: *Nature reviews. Neuroscience* 14 (3), S. 177–187. DOI: 10.1038/nrn3253.
69. Hefti, F.; Schneider, L. S. (1991): Nerve growth factor and Alzheimer's disease. In: *Clinical neuropharmacology* 14 Suppl 1, S62-76.

## 7. Literaturverzeichnis

70. Heimrich, B.; Claus, H.; Schwegler, H.; Haas, H. L. (1989): Hippocampal mossy fiber distribution and long-term potentiation in two inbred mouse strains. In: *Brain research* 490 (2), S. 404–406.
71. Hempstead, B. L. (2006): Dissecting the diverse actions of pro- and mature neurotrophins. In: *Current Alzheimer research* 3 (1), S. 19–24.
72. Henneberger, C.; Jüttner, R.; Rothe, T.; Grantyn, R. (2002): Postsynaptic action of BDNF on GABAergic synaptic transmission in the superficial layers of the mouse superior colliculus. In: *Journal of neurophysiology* 88 (2), S. 595–603. DOI: 10.1152/jn.2002.88.2.595.
73. Himmelheber, A. M.; Sarter, M.; Bruno, J. P. (2000): Increases in cortical acetylcholine release during sustained attention performance in rats. In: *Brain research. Cognitive brain research* 9 (3), S. 313–325.
74. Hohn, A.; Leibrock, J.; Bailey, K.; Barde, Y. A. (1990): Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. In: *Nature* 344 (6264), S. 339–341. DOI: 10.1038/344339a0.
75. Houser, C. R.; Miyashiro, J. E.; Swartz, B. E.; Walsh, G. O.; Rich, J. R.; Delgado-Escueta, A. V. (1990): Altered patterns of dynorphin immunoreactivity suggest mossy fiber reorganization in human hippocampal epilepsy. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10 (1), S. 267–282.
76. Huang, E. J.; Reichardt, L. F. (2001): Neurotrophins. Roles in neuronal development and function. In: *Annual review of neuroscience* 24, S. 677–736. DOI: 10.1146/annurev.neuro.24.1.677.
77. Hulse, S. H.; Fowler, H.; Honig, W. K. (2018): Cognitive Processes in Animal Behavior. First edition. London: Taylor and Francis (Psychology Library Editions: Comparative Psychology).
78. Isgor, C.; Pare, C.; McDole, B.; Coombs, P.; Guthrie, K. (2015): Expansion of the dentate mossy fiber-CA3 projection in the brain-derived neurotrophic factor-enriched mouse hippocampus. In: *Neuroscience* 288, S. 10–23. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.12.036.
79. Jalink, K.; Eichholtz, T.; Postma, F. R.; van Corven, E. J.; Moolenaar, W. H. (1993): Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway. Similarity to thrombin action. In: *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 4 (4), S. 247–255.
80. Jasmin, L.; Rabkin, S. D.; Granato, A.; Boudah, A.; Ohara, P. T. (2003): Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex. In: *Nature* 424 (6946), S. 316–320. DOI: 10.1038/nature01808.
81. Jones, B. E. (2005): From waking to sleeping. Neuronal and chemical substrates. In: *Trends in pharmacological sciences* 26 (11), S. 578–586. DOI: 10.1016/j.tips.2005.09.009.
82. Kahle, W.; Frotscher, M. (2001): Nervensystem und Sinnesorgane. 7., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Taschenatlas der Anatomie für Studium und Praxis, in 3 Bänden / von Werner Kahle; Helmut Leonhardt; Werner Platzer ; Bd. 3).

## 7. Literaturverzeichnis

83. Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessell, T.; Siegelbaum, S. A.; Hudspeth, A. J.; Mack, S.(Hg.) (2013): Principles of neural science. Fifth edition. New York, Lisbon, London: McGraw-Hill Medical.
84. Kaplan, A. S.; Levitan, R. D.; Yilmaz, Z.; Davis, C.; Tharmalingam, S.; Kennedy, J. L. (2008): A DRD4/BDNF gene-gene interaction associated with maximum BMI in women with bulimia nervosa. In: *The International journal of eating disorders* 41 (1), S. 22–28. DOI: 10.1002/eat.20474.
85. Katz, B.; Miledi, R. (1967): A study of synaptic transmission in the absence of nerve impulses. In: *The Journal of physiology* 192 (2), S. 407–436.
86. Kingsbury, M. A.; Rehen, S. K.; Ye, X.; Chun, J. (2004): Genetics and cell biology of lysophosphatidic acid receptor-mediated signaling during cortical neurogenesis. In: *Journal of cellular biochemistry* 92 (5), S. 1004–1012. DOI: 10.1002/jcb.20061.
87. Kingsbury, M. A.; Rehen, S. K.; Contos, J. J. A.; Higgins, C. M.; Chun, J. (2003): Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. In: *Nature neuroscience* 6 (12), S. 1292–1299. DOI: 10.1038/nn1157.
88. Klapstein, G. J.; Colmers, W. F. (1997): Neuropeptide Y suppresses epileptiform activity in rat hippocampus in vitro. In: *Journal of neurophysiology* 78 (3), S. 1651–1661. DOI: 10.1152/jn.1997.78.3.1651.
89. Klein, R.; Lamballe, F.; Bryant, S.; Barbacid, M. (1992): The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for neurotrophin-4. In: *Neuron* 8 (5), S. 947–956.
90. Kondrashov, F. A.; Koonin, E. V. (2004): A common framework for understanding the origin of genetic dominance and evolutionary fates of gene duplications. In: *Trends in genetics : TIG* 20 (7), S. 287–290. DOI: 10.1016/j.tig.2004.05.001.
91. Kornack, D. R.; Rakic, P. (1999): Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (10), S. 5768–5773.
92. Kornack, D. R.; Rakic, P. (2001): Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. In: *Science (New York, N.Y.)* 294 (5549), S. 2127–2130. DOI: 10.1126/science.1065467.
93. Lamballe, F.; Klein, R.; Barbacid, M. (1991): trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. In: *Cell* 66 (5), S. 967–979.
94. Lambiase, A.; Bracci-Laudiero, L.; Bonini, S.; Starace, G.; D'Elia, M. M.; Carli, M. de; Aloe, L. (1997): Human CD4+ T cell clones produce and release nerve growth factor and express high-affinity nerve growth factor receptors. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 100 (3), S. 408–414.
95. Lebedev, I. V.; Pleskacheva, M. G.; Anokhin, K. V. (2012): C57BL/6 mice open field behaviour qualitatively depends on arena size. In: *Zhurnal vysshei nervnoi deiatelnosti imeni I P Pavlova* 62 (4), S. 485–496.
96. Lee, R.; Kermani, P.; Teng, K. K.; Hempstead, B. L. (2001): Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. In: *Science (New York, N.Y.)* 294 (5548), S. 1945–1948. DOI: 10.1126/science.1065057.
97. Lessmann, V. (1998): Neurotrophin-dependent modulation of glutamatergic synaptic transmission in the mammalian CNS. In: *General pharmacology* 31 (5), S. 667–674.

## 7. Literaturverzeichnis

98. 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): 4957.
99. Liu, X.; Huai, J.; Endle, H.; Schlüter, L.; Fan, W.; Li, Y. et al. (2016): PRG-1 Regulates Synaptic Plasticity via Intracellular PP2A/ $\beta$ 1-Integrin Signaling. In: *Developmental cell* 38 (3), S. 275–290. DOI: 10.1016/j.devcel.2016.06.019.
100. Lümmer, G.; Virchow, S.; Rümenapp, U.; Schmidt, M.; Wieland, T.; Otto, T. et al. (1997): Identification of G protein-coupled receptors potently stimulating migration of human transitional-cell carcinoma cells. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 356 (6), S. 769–776.
101. Maina, G.; Rosso, G.; Zanardini, R.; Bogetto, F.; Gennarelli, M.; Bocchio-Chiavetto, L. (2010): Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in drug-naïve obsessive-compulsive patients. A case-control study. In: *Journal of affective disorders* 122 (1-2), S. 174–178. DOI: 10.1016/j.jad.2009.07.009.
102. Maisonpierre, P. C.; Belluscio, L.; Friedman, B.; Alderson, R. F.; Wiegand, S. J.; Furth, M. E. et al. (1990): NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system. Parallel as well as reciprocal patterns of expression. In: *Neuron* 5 (4), S. 501–509.
103. Maisonpierre, P. C.; Belluscio, L.; Squinto, S.; Ip, N. Y.; Furth, M. E.; Lindsay, R. M.; Yancopoulos, G. D. (1990): Neurotrophin-3. A neurotrophic factor related to NGF and BDNF. In: *Science (New York, N.Y.)* 247 (4949 Pt 1), S. 1446–1451.
104. Mandel, A. L.; Ozdener, H.; Utermohlen, V. (2009): Identification of pro- and mature brain-derived neurotrophic factor in human saliva. In: *Archives of oral biology* 54 (7), S. 689–695. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2009.04.005.
105. Manni, L.; Nikolova, V.; Vyagova, D.; Chaldakov, G. N.; Aloe, L. (2005): Reduced plasma levels of NGF and BDNF in patients with acute coronary syndromes. In: *International journal of cardiology* 102 (1), S. 169–171. DOI: 10.1016/j.ijcard.2004.10.041.
106. Martínez, A.; Alcántara, S.; Borrell, V.; Del Río, J. A.; Blasi, J.; Otal, R. et al. (1998): TrkB and TrkC signaling are required for maturation and synaptogenesis of hippocampal connections. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18 (18), S. 7336–7350.
107. Mattson, M. P. (2008): Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1144, S. 97–112. DOI: 10.1196/annals.1418.005.
108. McAllister, A. K.; Lo, D. C.; Katz, L. C. (1995): Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. In: *Neuron* 15 (4), S. 791–803.
109. McDermott, M. I.; Sigal, Y. J.; Sciorra, V. A.; Morris, A. J. (2004): Is PRG-1 a new lipid phosphatase? In: *Nature neuroscience* 7 (8), 789; author reply 789-90. DOI: 10.1038/nn0804-789a.
110. McMahon, H. T.; Bolshakov, V. Y.; Janz, R.; Hammer, R. E.; Siegelbaum, S. A.; Südhof, T. C. (1996): Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (10), S. 4760–4764.

## 7. Literaturverzeichnis

111. Mercader, J. M.; Fernández-Aranda, F.; Gratacòs, M.; Ribasés, M.; Badía, A.; Villarejo, C. et al. (2007): Blood levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with several psychopathological symptoms in anorexia nervosa patients. In: *Neuropsychobiology* 56 (4), S. 185–190. DOI: 10.1159/000120623.
112. Meyer, D.; Bonhoeffer, T.; Scheuss, V. (2014): Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. In: *Neuron* 82 (2), S. 430–443. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.02.031.
113. Meyer zu Heringdorf, D.; Jakobs, K. H. (2007): Lysophospholipid receptors. Signalling, pharmacology and regulation by lysophospholipid metabolism. In: *Biochimica et biophysica acta* 1768 (4), S. 923–940. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.09.026.
114. Mizuno, M.; Yamada, K.; He, J.; Nakajima, A.; Nabeshima, T. (2003): Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. In: *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.) 10 (2), S. 108–115. DOI: 10.1101/lm.56003.
115. Mody, I. (2005): Aspects of the homeostatic plasticity of GABAA receptor-mediated inhibition. In: *The Journal of physiology* 562 (Pt 1), S. 37–46. DOI: 10.1113/jphysiol.2004.077362.
116. Morris, R. G. (1999): D.O. Hebb. *The Organization of Behavior*, Wiley: New York; 1949. In: *Brain research bulletin* 50 (5-6), S. 437.
117. Morris, R. G.; Anderson, E.; Lynch, G. S.; Baudry, M. (1986): Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. In: *Nature* 319 (6056), S. 774–776. DOI: 10.1038/319774a0.
118. Morris, R. G.; Garrud, P.; Rawlins, J. N.; O'Keefe, J. (1982): Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. In: *Nature* 297 (5868), S. 681–683.
119. Mundel, P.; Heid, H. W.; Mundel, T. M.; Krüger, M.; Reiser, J.; Kriz, W. (1997): Synaptopodin. An actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. In: *The Journal of cell biology* 139 (1), S. 193–204.
120. Nadel, L.; Hardt, O. (2011): Update on memory systems and processes. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 36 (1), S. 251–273. DOI: 10.1038/npp.2010.169.
121. Nakamaru, M. (2016): Evolution of costly explicit memory and cumulative culture. In: *Journal of theoretical biology* 399, S. 71–83. DOI: 10.1016/j.jtbi.2016.03.014.
122. Nandurkar, H. H.; Caldwell, K. K.; Whisstock, J. C.; Layton, M. J.; Gaudet, E. A.; Norris, F. A. et al. (2001): Characterization of an adapter subunit to a phosphatidylinositol (3)P 3-phosphatase. Identification of a myotubularin-related protein lacking catalytic activity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (17), S. 9499–9504. DOI: 10.1073/pnas.171306098.
123. Neidlinger, N. A.; Larkin, S. K.; Bhagat, A.; Victorino, G. P.; Kuypers, F. A. (2006): Hydrolysis of phosphatidylserine-exposing red blood cells by secretory phospholipase A2 generates lysophosphatidic acid and results in vascular dysfunction. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (2), S. 775–781. DOI: 10.1074/jbc.M505790200.
124. Nilsson, A. S.; Fainzilber, M.; Falck, P.; Ibáñez, C. F. (1998): Neurotrophin-7. A novel member of the neurotrophin family from the zebrafish. In: *FEBS letters* 424 (3), S. 285–290.

## 7. Literaturverzeichnis

125. Okudaira, S.; Yukiura, H.; Aoki, J. (2010): Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. In: *Biochimie* 92 (6), S. 698–706. DOI: 10.1016/j.biochi.2010.04.015.
126. Otal, R.; Martínez, A.; Soriano, E. (2005): Lack of TrkB and TrkC signaling alters the synaptogenesis and maturation of mossy fiber terminals in the hippocampus. In: *Cell and tissue research* 319 (3), S. 349–358. DOI: 10.1007/s00441-004-1020-5.
127. Papez, J. W. (1995): A proposed mechanism of emotion. 1937. In: *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 7 (1), S. 103–112. DOI: 10.1176/jnp.7.1.103.
128. Parikh, V.; Evans, D. R.; Khan, M. M.; Mahadik, S. P. (2003): Nerve growth factor in never-medicated first-episode psychotic and medicated chronic schizophrenic patients. Possible implications for treatment outcome. In: *Schizophrenia research* 60 (2-3), S. 117–123.
129. Patapoutian, A.; Reichardt, L. F. (2001): Trk receptors. Mediators of neurotrophin action. In: *Current opinion in neurobiology* 11 (3), S. 272–280.
130. Patterson, S. L.; Grover, L. M.; Schwartzkroin, P. A.; Bothwell, M. (1992): Neurotrophin expression in rat hippocampal slices. A stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. In: *Neuron* 9 (6), S. 1081–1088.
131. Paxinos, G.; Franklin, K. B. J. (2004): The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2. ed., [Nachdr.]. San Diego, Calif.: Acad. Press.
132. Pencea, V.; Bingaman, K. D.; Wiegand, S. J.; Luskin, M. B. (2001): Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (17), S. 6706–6717.
133. Petzold, Sandra: Plasticity-Related-Gene-1: Unterschiede im Verhalten und in der Morphologie der Amygdala im Mausmodell. Dissertation, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, 2017
134. 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. In: *Neuroscience letters* 612, S. 145–148. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.12.016.
135. Pierucci, D.; Cicconi, S.; Bonini, P.; Ferrelli, F.; Pastore, D.; Matteucci, C. et al. (2001): NGF-withdrawal induces apoptosis in pancreatic beta cells in vitro. In: *Diabetologia* 44 (10), S. 1281–1295. DOI: 10.1007/s001250100650.
136. Pritchett, K.; Mulder, G. B. (2003): T, radial arm, and Barnes mazes. In: *Contemporary topics in laboratory animal science* 42 (3), S. 53–55.
137. Ramos-Languren, L. E.; Escobar, M. L. (2013): Plasticity and metaplasticity of adult rat hippocampal mossy fibers induced by neurotrophin-3. In: *The European journal of neuroscience* 37 (8), S. 1248–1259. DOI: 10.1111/ejn.12141.
138. Rattiner, L. M.; Davis, M.; Ressler, K. J. (2005): Brain-derived neurotrophic factor in amygdala-dependent learning. In: *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 11 (4), S. 323–333. DOI: 10.1177/1073858404272255.

## 7. Literaturverzeichnis

139. Reichardt, L. F. (2006): Neurotrophin-regulated signalling pathways. In: *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 361 (1473), S. 1545–1564. DOI: 10.1098/rstb.2006.1894.
140. Ridley, R. M.; Bowes, P. M.; Baker, H. F.; Crow, T. J. (1984): An involvement of acetylcholine in object discrimination learning and memory in the marmoset. In: *Neuropsychologia* 22 (3), S. 253–263. DOI: 10.1016/0028-3932(84)90073-3.
141. Riikonen, R.; Vanhala, R. (1999): Levels of cerebrospinal fluid nerve-growth factor differ in infantile autism and Rett syndrome. In: *Developmental medicine and child neurology* 41 (3), S. 148–152.
142. Rizo, J.; Chen, X.; Araç, D. (2006): Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release. In: *Trends in cell biology* 16 (7), S. 339–350. DOI: 10.1016/j.tcb.2006.04.006.
143. Rizo, J.; Südhof, T. C. (2002): Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. In: *Nature reviews. Neuroscience* 3 (8), S. 641–653. DOI: 10.1038/nrn898.
144. Roberts, W. A.; Strang, C.; Macpherson, K. (2015): Memory systems interaction in the pigeon. Working and reference memory. In: *Journal of experimental psychology. Animal learning and cognition* 41 (2), S. 152–162. DOI: 10.1037/xan0000053.
145. Robitaille, R.; Adler, E. M.; Charlton, M. P. (1990): Strategic location of calcium channels at transmitter release sites of frog neuromuscular synapses. In: *Neuron* 5 (6), S. 773–779.
146. Rodrigues-Amorim, D.; Rivera-Baltanás, T.; Bessa, J.; Sousa, N.; Vallejo-Curto, M. de C.; Rodríguez-Jamardo, C. et al. (2018): The neurobiological hypothesis of neurotrophins in the pathophysiology of schizophrenia. A meta-analysis. In: *Journal of psychiatric research* 106, S. 43–53. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2018.09.007.
147. Rogan, M. T.; Stäubli, U. V.; LeDoux, J. E. (1997): Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. In: *Nature* 390 (6660), S. 604–607. DOI: 10.1038/37601.
148. Römer, B.; Krebs, J.; Overall, R. W.; Fabel, K.; Babu, H.; Overstreet-Wadiche, Linda et al. (2011): Adult hippocampal neurogenesis and plasticity in the infrapyramidal bundle of the mossy fiber projection. I. Co-regulation by activity. In: *Frontiers in neuroscience* 5, S. 107. DOI: 10.3389/fnins.2011.00107.
149. Rosenfeld, R. D.; Zeni, L.; Haniu, M.; Talvenheimo, J.; Radka, S. F.; Bennett, L. et al. (1995): Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum. In: *Protein expression and purification* 6 (4), S. 465–471.
150. Rosenthal, A.; Goeddel, D. V.; Nguyen, T.; Martin, E.; Burton, L. E.; Shih, A. et al. (1991): Primary structure and biological activity of human brain-derived neurotrophic factor. In: *Endocrinology* 129 (3), S. 1289–1294. DOI: 10.1210/endo-129-3-1289.
151. Sajdyk, T. J.; Shekhar, A.; Gehlert, D. R. (2004): Interactions between NPY and CRF in the amygdala to regulate emotionality. In: *Neuropeptides* 38 (4), S. 225–234. DOI: 10.1016/j.npep.2004.05.006.
152. Sato, K.; Malchinkhuu, E.; Muraki, T.; Ishikawa, K.; Hayashi, K.; Tosaka, M. et al. (2005): Identification of autotaxin as a neurite retraction-inducing factor of PC12 cells in cerebrospinal fluid and its possible sources. In: *Journal of neurochemistry* 92 (4), S. 904–914. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02933.x.

## 7. Literaturverzeichnis

153. Savaskan, N.E.; Bräuer, A. U.; Nitsch, R. (2004): Molecular cloning and expression regulation of PRG-3, a new member of the plasticity-related gene family. In: *The European journal of neuroscience* 19 (1), S. 212–220.
154. Schiavo, G.; Stenbeck, G.; Rothman, J. E.; Söllner, T. H. (1997): Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (3), S. 997–1001.
155. Schneider, P.; Petzold, S.; Sommer, A.; Nitsch, R.; Schwegler, H.; Vogt, J.; Roskoden, T. (2018): Altered synaptic phospholipid signaling in PRG-1 deficient mice induces exploratory behavior and motor hyperactivity resembling psychiatric disorders. In: *Behavioural brain research* 336, S. 1–7. DOI: 10.1016/j.bbr.2017.08.032.
156. Schumacher, K. A.; Classen, H. G.; Späth, M. (1979): Platelet aggregation evoked in vitro and in vivo by phosphatidic acids and lysoderivatives. Identity with substances in aged serum (DAS). In: *Thrombosis and haemostasis* 42 (2), S. 631–640.
157. Schwarzer, C.; Kofler, N.; Sperk, G. (1998): Up-regulation of neuropeptide Y-Y2 receptors in an animal model of temporal lobe epilepsy. In: *Molecular pharmacology* 53 (1), S. 6–13.
158. Schwarzer, C.; Williamson, J. M.; Lothman, E. W.; Vezzani, A.; Sperk, G. (1995): Somatostatin, neuropeptide Y, neurokinin B and cholecystokinin immunoreactivity in two chronic models of temporal lobe epilepsy. In: *Neuroscience* 69 (3), S. 831–845.
159. Schwegler, H.; Lipp, H. P. (1983): Hereditary covariations of neuronal circuitry and behavior. Correlations between the proportions of hippocampal synaptic fields in the regio inferior and two-way avoidance in mice and rats. In: *Behavioural brain research* 7 (1), S. 1–38.
160. Scoville, W. B.; Milner, B. (1957): Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 20 (1), S. 11–21.
161. Segal, M.; Vlachos, A.; Korkotian, E. (2010): The spine apparatus, synaptopodin, and dendritic spine plasticity. In: *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 16 (2), S. 125–131. DOI: 10.1177/1073858409355829.
162. Shallice, T.; Warrington, E. K. (1970): Independent functioning of verbal memory stores. A neuropsychological study. In: *The Quarterly journal of experimental psychology* 22 (2), S. 261–273. DOI: 10.1080/00335557043000203.
163. Shigemoto, R.; Kinoshita, A.; Wada, E.; Nomura, S.; Ohishi, H.; Takada, M. et al. (1997): Differential presynaptic localization of metabotropic glutamate receptor subtypes in the rat hippocampus. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (19), S. 7503–7522.
164. Shimazu, K.; Zhao, M.; Sakata, K.; Akbarian, S.; Bates, B.; Jaenisch, R.; Lu, B. (2006): NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. In: *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 13 (3), S. 307–315. DOI: 10.1101/lm.76006.
165. Shoji, H. (2016): Scaling law in free walking of mice in circular open fields of various diameters. In: *Journal of biological physics* 42 (2), S. 259–270. DOI: 10.1007/s10867-015-9406-z.

## 7. Literaturverzeichnis

166. Sigal, Y. J.; McDermott, M. I.; Morris, A. J. (2005): Integral membrane lipid phosphatases/phosphotransferases. Common structure and diverse functions. In: *The Biochemical journal* 387 (Pt 2), S. 281–293. DOI: 10.1042/BJ20041771.
167. Sigal, Y. J.; Quintero, O. A.; Cheney, R. E.; Morris, A. J. (2007): Cdc42 and ARP2/3-independent regulation of filopodia by an integral membrane lipid-phosphatase-related protein. In: *Journal of cell science* 120 (Pt 2), S. 340–352. DOI: 10.1242/jcs.03335.
168. Slack, S. E.; Pezet, S.; McMahan, S. B.; Thompson, S. W. N.; Malcangio, M. (2004): Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor subunit one phosphorylation via ERK and PKC in the rat spinal cord. In: *The European journal of neuroscience* 20 (7), S. 1769–1778. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03656.x.
169. Smiałowska, M.; Bijak, M.; Sopala, M.; Tokarski, K. (1996): Inhibitory effect of NPY on the picrotoxin-induced activity in the hippocampus. A behavioural and electrophysiological study. In: *Neuropeptides* 30 (1), S. 7–12.
170. Smyth, S. S.; Sciorra, V. A.; Sigal, Y. J.; Pamuklar, Z.; Wang, Z.; Xu, Y. et al. (2003): Lipid phosphate phosphatases regulate lysophosphatidic acid production and signaling in platelets. Studies using chemical inhibitors of lipid phosphate phosphatase activity. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (44), S. 43214–43223. DOI: 10.1074/jbc.M306709200.
171. Squire, L. R. (2009): The legacy of patient H.M. for neuroscience. In: *Neuron* 61 (1), S. 6–9. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.12.023.
172. Squire, L. R. (Hg.) (2013): *Fundamental neuroscience*. 4. ed. Amsterdam: Elsevier Acad. Press.
173. Stracke, M. L.; Krutzsch, H. C.; Unsworth, E. J.; Arestad, A.; Cioce, V.; Schiffmann, E.; Liotta, L. A. (1992): Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (4), S. 2524–2529.
174. Sugiura, T.; Nakane, S.; Kishimoto, S.; Waku, K.; Yoshioka, Y.; Tokumura, A. (2002): Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva. In: *Journal of lipid research* 43 (12), S. 2049–2055.
175. Swanson, C. J.; Bures, M.; Johnson, M. P.; Linden, A.-M.; Monn, J. A.; Schoepp, D. D. (2005): Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. In: *Nature reviews. Drug discovery* 4 (2), S. 131–144. DOI: 10.1038/nrd1630.
176. Takahashi, Y.; Tsunashima, K.; Sadamatsu, M.; Schwarzer, C.; Amano, S.; Ihara, N. et al. (2000): Altered hippocampal expression of neuropeptide Y, somatostatin, and glutamate decarboxylase in Ihara's epileptic rats and spontaneously epileptic rats. In: *Neuroscience letters* 287 (2), S. 105–108.
177. Tessarollo, L.; Tsoulfas, P.; Martin-Zanca, D.; Gilbert, D. J.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Parada, L. F. (1993): trkC, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues. In: *Development (Cambridge, England)* 118 (2), S. 463–475.
178. Thoenen, H. (1995): Neurotrophins and neuronal plasticity. In: *Science (New York, N.Y.)* 270 (5236), S. 593–598. DOI: 10.1126/science.270.5236.593.

## 7. Literaturverzeichnis

179. Tigyi, G.; Miledi, R. (1992): Lysophosphatidates bound to serum albumin activate membrane currents in *Xenopus* oocytes and neurite retraction in PC12 pheochromocytoma cells. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (30), S. 21360–21367.
180. Tirassa, P.; Manni, L.; Stenfors, C.; Lundeberg, T.; Aloe, L. (2000): RT-PCR ELISA method for the analysis of neurotrophin mRNA expression in brain and peripheral tissues. In: *Journal of biotechnology* 84 (3), S. 259–272.
181. Todd, A. E.; Orengo, C. A.; Thornton, J. M. (2002): Sequence and structural differences between enzyme and nonenzyme homologs. In: *Structure (London, England : 1993)* 10 (10), S. 1435–1451.
182. Tokumitsu, H.; Hatano, N.; Tsuchiya, M.; Yurimoto, S.; Fujimoto, T.; Ohara, N. et al. (2010): Identification and characterization of PRG-1 as a neuronal calmodulin-binding protein. In: *The Biochemical journal* 431 (1), S. 81–91. DOI: 10.1042/BJ20100637.
183. Tokumura, A.; Fukuzawa, K.; Isobe, J.; Tsukatani, H. (1981): Lysophosphatidic acid-induced aggregation of human and feline platelets. Structure-activity relationship. In: *Biochemical and biophysical research communications* 99 (2), S. 391–398.
184. Tokumura, A.; Miyake, M.; Nishioka, Y.; Yamano, S.; Aono, T.; Fukuzawa, K. (1999): Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients. In: *Biology of reproduction* 61 (1), S. 195–199.
185. Tokumura, A.; Majima, E.; Kariya, Y.; Tominaga, K.; Kogure, K.; Yasuda, K.; Fukuzawa, K. (2002): Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (42), S. 39436–39442. DOI: 10.1074/jbc.M205623200.
186. Traynelis, S. F.; Wollmuth, L. P.; McBain, C. J.; Menniti, F. S.; Vance, K. M.; Ogden, K. K. et al. (2010): Glutamate receptor ion channels. Structure, regulation, and function. In: *Pharmacological reviews* 62 (3), S. 405–496. DOI: 10.1124/pr.109.002451.
187. Trepel, M. (2006): Neuroanatomie. Struktur und Funktion ; mit 27 Tabellen. 3., neu bearb. Aufl., 2. Nachdr. München: Urban & Fischer.
188. Trimbuch, Thorsten. Untersuchung zur physiologischen Rolle von PRG-1 anhand der Generierung und Phänotypisierung von PRG 1 defizienten Mausmodellen. Dissertation, Freie Universität Berlin, 2009
189. Trimbuch, T.; Beed, P.; Vogt, J.; Schuchmann, S.; Maier, N.; Kintscher, M. et al. (2009): Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. In: *Cell* 138 (6), S. 1222–1235. DOI: 10.1016/j.cell.2009.06.050.
190. Tseng, P.-T.; Chen, Y.-W.; Tu, K.-Y.; Wang, H.-Y.; Chung, W.; Wu, C.-K. et al. (2016): State-dependent increase in the levels of neurotrophin-3 and neurotrophin-4/5 in patients with bipolar disorder. A meta-analysis. In: *Journal of psychiatric research* 79, S. 86–92. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2016.05.009.
191. Turek, F. W.; Losee-Olson, S. (1986): A benzodiazepine used in the treatment of insomnia phase-shifts the mammalian circadian clock. In: *Nature* 321 (6066), S. 167–168. DOI: 10.1038/321167a0.

## 7. Literaturverzeichnis

192. Tuszynski, M. H.; Yang, J. H.; Barba, D.; U, H.-S.; Bakay, R. A. E.; Pay, M. M. et al. (2015): Nerve Growth Factor Gene Therapy. Activation of Neuronal Responses in Alzheimer Disease. In: *JAMA neurology* 72 (10), S. 1139–1147. DOI: 10.1001/jamaneurol.2015.1807.
193. Unichenko, P.; Kirischuk, S.; Yang, J.-W.; Baumgart, J.; Roskodien, T.; Schneider, P. et al. (2016): Plasticity-Related Gene 1 Affects Mouse Barrel Cortex Function via Strengthening of Glutamatergic Thalamocortical Transmission. In: *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 26 (7), S. 3260–3272. DOI: 10.1093/cercor/bhw066.
194. Valtorta, F.; Pennuto, M.; Bonanomi, D.; Benfenati, F. (2004): Synaptophysin. Leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26 (4), S. 445–453. DOI: 10.1002/bies.20012.
195. van Corven, E. J.; Groenink, A.; Jalink, K.; Eichholtz, T.; Moolenaar, W. H. (1989): Lysophosphatidate-induced cell proliferation. Identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. In: *Cell* 59 (1), S. 45–54.
196. van Meeteren, L. A.; Moolenaar, W. H. (2007): Regulation and biological activities of the autotaxin-LPA axis. In: *Progress in lipid research* 46 (2), S. 145–160. DOI: 10.1016/j.plipres.2007.02.001.
197. Vargas, H. E.; Gama, C. S.; Andrezza, A. C.; Medeiros, D.; Stertz, L.; Fries, G. et al. (2008): Decreased serum neurotrophin 3 in chronically medicated schizophrenic males. In: *Neuroscience letters* 440 (3), S. 197–201. DOI: 10.1016/j.neulet.2008.04.027.
198. Vezzani, A.; Civenni, G.; Rizzi, M.; Monno, A.; Messali, S.; Samanin, R. (1994): Enhanced neuropeptide Y release in the hippocampus is associated with chronic seizure susceptibility in kainic acid treated rats. In: *Brain research* 660 (1), S. 138–143.
199. Villoslada, P.; Genain, C. P. (2004): Role of nerve growth factor and other trophic factors in brain inflammation. In: *Progress in brain research* 146, S. 403–414. DOI: 10.1016/S0079-6123(03)46025-1.
200. Vogt, J.; Yang, J.-W.; Mobascher, A.; Cheng, J.; Li, Y.; Liu, X. et al. (2016): Molecular cause and functional impact of altered synaptic lipid signaling due to a prg-1 gene SNP. In: *EMBO molecular medicine* 8 (1), S. 25–38. DOI: 10.15252/emmm.201505677.
201. Weiner, J. A.; Fukushima, N.; Contos, J. J.; Scherer, S. S.; Chun, J. (2001): Regulation of Schwann cell morphology and adhesion by receptor-mediated lysophosphatidic acid signaling. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (18), S. 7069–7078.
202. Wu, K.; Len, G.-W.; McAuliffe, G.; Ma, C.; Tai, J. P.; Xu, F.; Black, I. B. (2004): Brain-derived neurotrophic factor acutely enhances tyrosine phosphorylation of the AMPA receptor subunit GluR1 via NMDA receptor-dependent mechanisms. In: *Brain research. Molecular brain research* 130 (1-2), S. 178–186. DOI: 10.1016/j.molbrainres.2004.07.019.
203. Xiu, M. H.; Hui, L.; Dang, Y. F.; Hou, T. D.; Zhang, C. X.; Zheng, Y. L. et al. (2009): Decreased serum BDNF levels in chronic institutionalized schizophrenia on long-term treatment with typical and atypical antipsychotics. In: *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 33 (8), S. 1508–1512. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2009.08.011.

## 7. Literaturverzeichnis

204. Yamada, K.; Nabeshima, T. (2003): Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. In: *Journal of pharmacological sciences* 91 (4), S. 267–270.
205. Yamamoto, H.; Gurney, M. E. (1990): Human platelets contain brain-derived neurotrophic factor. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 10 (11), S. 3469–3478.
206. Yang, G.; Lai, C. S. W.; Cichon, J.; Ma, L.; Li, W.; Gan, W.-B. (2014): Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning. In: *Science (New York, N.Y.)* 344 (6188), S. 1173–1178. DOI: 10.1126/science.1249098.
207. Zajac, M. S.; Pang, T. Y. C.; Wong, N.; Weinrich, B.; Leang, L. S. K.; Craig, J. M. et al. (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. In: *Hippocampus* 20 (5), S. 621–636. DOI: 10.1002/hipo.20658.
208. Zeev, B. Ben; Bebbington, A.; Ho, G.; Leonard, H.; Klerk, N. de; Gak, E. et al. (2009): The common BDNF polymorphism may be a modifier of disease severity in Rett syndrome. In: *Neurology* 72 (14), S. 1242–1247. DOI: 10.1212/01.wnl.0000345664.72220.6a.
209. Zhang, Q. X.; Pilquill, C. S.; Dewald, J.; Berthiaume, L. G.; Brindley, D. N. (2000): Identification of structurally important domains of lipid phosphate phosphatase-1. Implications for its sites of action. In: *The Biochemical journal* 345 Pt 2, S. 181–184.
210. Zigova, T.; Pencea, V.; Wiegand, S. J.; Luskin, M. B. (1998): Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. In: *Molecular and cellular neurosciences* 11 (4), S. 234–245. DOI: 10.1006/mcne.1998.0684.
211. Zimmerberg, J.; Akimov, S. A.; Frolov, V. (2006): Synaptotagmin. Fusogenic role for calcium sensor? In: *Nature structural & molecular biology* 13 (4), S. 301–303. DOI: 10.1038/nsmb0406-301.
212. Zuccato, C.; Cattaneo, E. (2009): Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. In: *Nature reviews. Neurology* 5 (6), S. 311–322. DOI: 10.1038/nrneurol.2009.54.

## **8. Danksagung**

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Dipl. Biol. Thomas Roskoden. Er weckte bereits im vorklinischen Wahlfach mein Interesse für die Neuroanatomie und ermöglichte mir nach dem Physikum den Beginn dieser Dissertation. Dabei stand er mir durch seine fachliche Expertise mit wertvollen Ratschlägen, aber auch sehr viel Geduld immer zur Seite. Durch meinen Umzug machte die räumliche Entfernung den Abschluss dieser Dissertation nicht einfach, wodurch seine Unterstützung noch wertvoller wurde.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. rer. nat. Herbert Schwegler, der mich bereits in der Vorklinik begleitet hat und mich dadurch der Neuroanatomie nähergebracht hat. Gerade für mein Dissertationsthema und die Auswertung der Moosfaserareale hatte er gute Ratschläge, Erfahrungen und Ideen, die die Auswertungen meiner Ergebnisse deutlich erleichterten.

Ich danke dem Institut für Neuroanatomie, in dem ich meine Arbeiten durchführen konnte, insbesondere allen Mitarbeitern, die mich bei der Laborarbeit und der Verarbeitung der Tiere unterstützten. Ein besonderer Dank gilt hierbei Frau A. Kröber.

Außerdem danke ich der Arbeitsgruppe Nitsch und Vogt für die Bereitstellung der Tiere, sowie dem Zentralen Tierlabor für die Pflege und Unterbringung der Tiere.

Ich bedanke mich bei allen Verwandten, Freunden und Bekannten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dabei sind besonders hervorzuheben Jürgen Potzel, Maximilian Lippert und Christian Schröder.

Ich danke meinen Eltern Friedrich und Mechthild für ihre große Liebe und die Hilfe auf meinem gesamten Lebensweg. Ich bin sehr glücklich, Eure Tochter zu sein.

Zusätzlich danke ich meinen Schwestern Eva, Mia und Agnes, ihren Partnern und meinen Nichten Lea und Frieda sowie meinen Schwiegereltern für ihre Unterstützung in so vielen Bereichen meines Lebens.

Ein großes Dankeschön geht an meine große Liebe, meinen Lebenspartner Egmont. Es ist großartig, einen so wunderbaren, einzigartigen und liebenswerten Menschen als Unterstützung in allen Lebenslagen an der Seite zu haben.

## 9. Ehrenerklärung

### **9. Ehrenerklärung**

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

**„Veränderung im räumlichen Lernverhalten und der Morphologie des Hippocampus bei Plasticity Related Gene 1-defizienten Mäusen“**

im Institut für Anatomie/Neuroanatomie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. Dipl. Biol. Thomas Roskoden und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Herbert Schwegler

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 30.09.2019

Babette Sommer

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten

## 11. Anlagen

### 11.1. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1 PRG1 in der postsynaptischen Membran
- Abb. 2 Frontalschnitt durch den Hippocampus (Kahle und Frotscher)
- Abb. 3 Darstellung des verwendeten Acht-Arm-Radiallabyrinth
- Abb. 4 Horizontalschnitt durch den Hippocampus mit Darstellung der quantifizierten Moosfaserbereiche (IIP/SP)
- Abb. 5 Motility-Box – Relative Zeiten und Absolute Laufwege
- Abb. 6 Motility-Box – Relative Zeiten in den verschiedenen Bereichen
- Abb. 7 Radiallabyrinth – Anzahl der Working memory error
- Abb. 8 Radiallabyrinth – Anzahl der Working memory error im Vergleich Tag 1+2 sowie Tag 3-5
- Abb. 9 Radiallabyrinth – Anzahl der neu betretenen Arme
- Abb. 10 Radiallabyrinth – Anzahl der neu betretenen Arme im Vergleich Tag 1+2 sowie Tag 3-5
- Abb. 11 Radiallabyrinth – Aktivität als Diagramm
- Abb. 12 Radiallabyrinth – Aktivität im Vergleich Tag 1+2 sowie Tag 3-5
- Abb. 13 Immunhistochemische Färbungen – PARV-Neurone im Hippocampus
- Abb. 14 Immunhistochemische Färbungen – PARV-Neurone im medialen Septum (MS) und diagonalem Band von Broca (DB)
- Abb. 15 Immunhistochemische Färbungen – ChAT-Neurone im MS und DB
- Abb. 16 Immunhistochemische Färbungen – NPY-Neurone im Hippocampus
- Abb. 17 Bild meiner Schnitte (Horizontalschnitte) der mittels TIMM-Färbung dargestellten Moosfasern
- Abb. 18 TIMM-Färbung – Darstellung der Flächen der Moosfasern
- Abb. 19 ELISA – Quantifizierung der Wachstumsfaktoren – NGF im Hippocampus
- Abb. 20 ELISA – Quantifizierung der Wachstumsfaktoren – BDNF im Hippocampus
- Abb. 21 ELISA – Quantifizierung der Wachstumsfaktoren – BDNF im Hippocampus (Vergleich der WT gegen KO/HE)
- Abb. 22 ELISA – Quantifizierung der Wachstumsfaktoren – NT3 im Hippocampus
- Abb. 23 ELISA – Quantifizierung von CRF im Hippocampus
- Tab. 1 Werte der ANOVA für die Parameter in der Motility-Box

## **11.2. Protokolle**

### **11.2.1. NISSL – Färbung**

Für die NISSL-Färbung wurden 0,5 g Kresylechtviolett in 100 ml Acetatpuffer (pH=3,8-4,0) gelöst. Der Acetatpuffer wurde durch eine 1:5 Mischung von 2,72%igem Natriumacetat und 1,20%iger Essigsäure hergestellt. Nach Aufziehen der Schnitte auf Objektträger folgte eine Nachfixierung über 5 min in 4%iger Paraformaldehydlösung und einmaligen Spülen mit 0,1 M PB und destilliertem Wasser. Danach wurden die Objektträger mit den Schnitten 2 - 4 Minuten in der gepufferten Farblösung inkubiert und abschließend mit Acetatpuffer gespült. Danach spülten wir die Träger zur Differenzierung und Entwässerung zweimal in absolutem Alkohol und zweimal in Xylol. Die Schnitte wurden sofort aus dem Xylol mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

### **11.2.2. Immunhistochemie – Protokolle**

#### **11.2.2.1. PARV – Immunhistochemie**

Zur Entfernung der kryoprotektiven Lösung wurden die Schnitte dreimal für 10 Minuten mit 0,1 M PB gespült. Um die endogene Peroxidaseaktivität weitgehend zu reduzieren, wurden sie danach zehn Minuten in einer Mischung aus 500 µl Methanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) und 100 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) in 9,5 ml 0,1 M PB inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Spülen der Schnitte mit 0,1 M PB erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper [monoklonaler PARV-Antikörper aus der Maus, 1:5000, (SWant, Bellizona, Schweiz) in 0,1 M PB mit 1% NHS] für 48 Stunden im Kühlschrank bei 4 °C. Die Spülgänge wurden wiederholt und die Schnitte für 1,5 Stunden mit 4,4 µl sekundärem biotynilierten Antikörper [Bio anti-mouse (Biozol/Diagnostika, Echinger, Germany)] in 1ml PB inkubiert. Nach einem weiteren Spülgang (dreimal für 10 Minuten mit 0,1 M PB) erfolgte die Inkubation mit dem makromolekularen Komplex aus Avidin und Biotin mit Meerrettichperoxidase (Vectastain Elite ABC-Kit, Vector-Laboratories, Burlingame, CA, USA) für eine Stunde. Dreimaligen Waschen mit 0,1 M PB für jeweils 10 min folgte die Sichtbarmachung der Immunfärbung durch vierminütige Inkubation in einer Mischung aus 20 ml 0,1 M PB, 1 ml Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, 10 mg/1 ml; Endkonzentration 0,5%) mit 220 µl 0,3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,0075%). Abschließend wurde wiederum dreimal in 0,1 M PB für 10 Minuten gespült und die Schnitte auf Objektträger aufgezogen, über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet und am nächsten Tag entwässert (aufsteigende Alkoholreihe und Xylol) und mit Entellan eingedeckt.

### 11.2.2.2. ChAT – Immunhistochemie

Zur Entfernung der kryoprotektiven Lösung wurden die Schnitte dreimal für 10 Minuten mit 0,1 M PB gespült. Um die endogene Peroxidaseaktivität weitgehend zu reduzieren, wurden sie danach zehn Minuten in einer Mischung aus 500 µl Methanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) und 100 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) in 9,5 ml 0,1 M PB inkubiert. Nach erneutem Waschen der Schnitte wurden sie 30 Minuten in einer Blockierlösung für diesen polyklonale Antikörper inkubiert (0,1 M PB mit 10% Normalserum und 10% BSA). Danach erfolgt die Inkubation der Schnitte mit dem primären Antikörper [polyklonaler Antikörper aus dem Huhn (Novus Biologicals, Inc.; Littleton, USA), 1:250 verdünnt in 0,1 M PB, 1% NGS und 0,3% Triton] für 48 h bei 4 °C. Weiteren drei Waschgängen mit 0,1 M PB folgte die Inkubation für 1,5 Stunden mit 4,4 µl des sekundärem Antikörper (Bio anti-chicken (BiozolDiagnostika, Echinger, Deutschland) in 1 ml PB. Die Schnitte wurden weitere dreimal in PB gewaschen und eine einstündige Inkubation mit dem makromolekularen Komplex bestehend aus Avidin und Biotin mit Meerrettichperoxidase (Vectastain Elite ABC-Kit, Vector-Laboratories, Burlingame, CA, USA). Nach weiteren drei Spülgängen für jeweils 10 Minuten wurde die Immunfärbung durch 20-minütige Inkubation mit der unter 10.2.2.1. beschriebenen DAB-Mischung sichtbar gemacht und abschließend dreimal in 0,1 M PB für 10 Minuten gespült. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen, über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet, dann am nächsten Tag entwässert (aufsteigende Alkoholreihe und Xylol) und mit Entellan eingedeckt.

### 11.2.2.3. NPY – Immunhistochemie

Zur Entfernung der kryoprotektiven Lösung wurden die Schnitte dreimal für 10 Minuten mit 0,1 M PB gespült. Um die endogene Peroxidaseaktivität weitgehend zu reduzieren, wurden sie danach zehn Minuten in einer Mischung aus 500 µl Methanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) und 100 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) in 0,1 M PB inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Spülen der Schnitte mit 0,1 M PB erfolgte die Inkubation für 30 Minuten in einer Blockierlösung für diesen polyklonale Antikörper (9 ml 0,1 M PB, 10% NGS und 10% BSA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper [polyklonaler NPY-Antikörper aus dem Kaninchen (GeneTex, Irvine, USA), 1:400 in 0,1 M PB mit 10% NGS] bei 4 °C für 48 Stunden. Nach diesen beiden Tagen wurden die Schnitte wiederum dreimal jeweils zehn Minuten gespült und für 1,5 Stunden mit 4,4 µl des sekundärem biotinylierten Antikörper [Bio anti-rabbit (BiozolDiagnostika, Echinger, Germany)] in 1 ml PB inkubiert. Nach einem weiteren Spülgang (dreimal für 10 Minuten mit 0,1 M PB) erfolgte die Inkubation mit dem makromolekularen Komplex aus Avidin und Biotin mit Meerrettichperoxidase (Vectastain Elite ABC-Kit, Vector-

## 11. Anlagen

Laboratories, Burlingame, CA, USA) für eine Stunde. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1 M PB für jeweils 10 min folgte die Sichtbarmachung der Immunfärbung durch 5-minütige Inkubation mit der unter 10.2.2.1. verwendeten DAB-Mischung. Abschließend wurde dreimal in 0,1 M PB für 10 Minuten gespült, die Schnitte auf Objektträger aufgezogen, über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet, dann am nächsten Tag entwässert (aufsteigende Alkoholreihe und Xylol) und in Entellan eingedeckt.

### 11.2.3. Protokoll TIMM - Färbung

Die Gehirne der Tiere wurden wie in 3.4. beschrieben perfundiert. Zur Darstellung der zinkhaltigen Synapsen der Moosfasern wurden die Objektträger zunächst eine Stunde in Chromschwefelsäure gewaschen, um sie von Metall-Verunreinigungen zu befreien. Anschließend wurden sie in destilliertem Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden anschließend gelatinisiert und über Nacht bei 55 °C im Brutschrank getrocknet. Für die Gelatine- Lösung wurden 2,25g Blattgelatine in 225ml zweifach destilliertem Wasser aufgelöst und zusammen mit einigen Körnchen  $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$  bei 80°C aufgeköcht.

Zusätzlich wurden auch alle anderen Gefäße eine Minute in Chromschwefelsäure gewaschen und mit zweifach destilliertem Wasser abgespült, um sie von Verunreinigungen zu befreien.

Bezüglich der TIMM-Lösung wurde für eine Küvette (für maximal 19 Objektträger), 80ml zweifach destilliertes Wasser, 5,1g Citronensäure, 4,7g Natriumcitrat, 3,4g Hydrochinon als Reduktionsmittel für das Silbernitrat und 120ml 50%iges Gummi arabicum gemischt. Gummi arabicum ist notwendig, um die Reaktion zu verlangsamen, da es ansonsten zu einer unspezifischen Anfärbung kommt. Die Herstellung des Gummi arabicum erfolgte durch Zugabe von 500g Gummi arabicum Pulver in einem Liter destilliertes Wasser unter Zugabe von einigen Körnchen Thymol. Diese Mischung wurde 24 Stunden bei 70-80°C gerührt. Nach Entfernung der Kruste wurde es in einer Plastikflasche bei -20°C gefroren.

Unter abgedunkelten Verhältnissen wurden 0,17g Silbernitrat, das in 1-2 ml zweifach destilliertem Wasser gelöst wurde, unmittelbar vor der Reaktion in die TIMM- Lösung gegeben, gut geschüttelt und in die mit Objektträgern gefüllte Küvette gegeben. Bei 25-30°C erfolgte die Entwicklung des Silbers im abgedunkelten Brutschrank. Die Entwicklung sollte erst nach etwa 30 Minuten beginnen und unter ständiger Kontrolle maximal 60 Minuten dauern.

Danach wurden die Schnitte erneut für 10 Minuten mit zweifach destilliertem Wasser gewaschen und das Silber-Präzipitat für 5 Minuten in Natriumthiosulfat fixiert und erneut zweifach für 5 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%/95%/100%/100%) für jeweils 5 Minuten entwässert, zweimal für 5 Minuten in Xylol gewaschen und danach mit Entellan (Merck) eingedeckt.

#### **11.2.4. ELISA - Protokolle**

##### **11.2.4.1. NGF - ELISA**

Die Platte wurde über Nacht bei 4°C mit dem mitgelieferten polyklonalem NGF-Antikörper (1:1000) bedeckt. Nach Waschen mit dem TBST (Tris buffered saline with Tween 20) - Waschpuffer (20mM Tris HCl (pH 7.6), 150 mM 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20), erfolgte die Blockierung mit dem Block&Sample Puffer und anschließende Inkubation über eine Stunde. Nach erneutem Waschen wurden die Proben in dreifacher Ausführung aufgetragen und 6 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurde der monoklonale Anti-NGF Antikörper (1:4000) pipettiert. Es erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C. Nach erneutem Waschen wurde am nächsten Tag das lichtgeschützte Meerrettichperoxidase-Konjugat (Anti-Rat IgG, HRP Konjugat) (1:100) hinzu pipettiert. Nach 2,5 Stunden erfolgte eine erneute Waschung. Durch Hinzufügen der TMB-Lösung erkannte man die Farbentwicklung von blau zu gelb. Diese Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1N Salzsäure gestoppt. Die Absorption wurde zügig mit dem SUNRISE-Photometer (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 450nm gemessen.

Es wurde eine Standardkurve mit dem im Kit enthaltenem NGF nach Protokoll hergestellt.

##### **11.2.4.2. BDNF - ELISA**

Die Platte wurde über Nacht bei 4°C mit dem mitgelieferten monoklonalen BDNF-Antikörper (1:1000) bedeckt. Nach Waschen mit dem TBST-Waschpuffer (20mM Tris HCl (pH 7.6), 150 mM 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20), erfolgte die Blockierung mit dem Block&Sample Puffer und danach Inkubation über eine Stunde. Nach erneutem Waschen wurden die Proben in dreifacher Ausführung aufgetragen und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurde der polyklonale Anti-BDNF IgY Antikörper (1:500) aufgetragen. Dieser wurde 2 h inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das lichtgeschützte Meerrettichperoxidase-Konjugat (Anti-IgY HRP Konjugat) (1:200) hinzu pipettiert. Nach einer Stunde erfolgte eine erneute Waschung. Nach Hinzufügen der TMB-Lösung erkannte man die Farbentwicklung von blau zu gelb. Diese Reaktion wurde nach 10 Minuten mit 1 N Salzsäure gestoppt. Die Absorption wurde zügig mit dem SUNRISE-Photometer (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 450nm gemessen.

Es wurde eine Standardkurve mit dem im Kit erhaltenen BDNF nach Protokoll hergestellt.

#### **11.2.4.3. NT3 - ELISA**

Die Platte wurde über Nacht bei 4°C mit dem mitgeliefertem polyklonalem NT3-Antikörper (1:500) bedeckt. Nach Waschen mit dem TBST-Waschpuffer (20mM Tris HCl (pH 7.6), 150 mM 0.9% NaCl, 0.05% Tween 20), erfolgte die Blockierung mit dem Block&Sample Puffer und anschließende Inkubation über eine Stunde. Nach erneutem Waschen wurden die Proben in dreifacher Ausführung aufgetragen und 6 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der monoklonale Anti-NT3 Antikörper (1:4000) aufgetragen. Es erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C. Nach erneutem Waschen wurde das lichtgeschützte Meerrettichperoxidase-Konjugat (Anti-Mouse IgG, HRP Konjugat) (1:100) hinzu pipettiert. Nach 2,5 Stunden erfolgte eine erneute Waschung. Durch Hinzufügen von TMB-Lösung erkannte man die Farbentwicklung von blau zu gelb. Diese Reaktion wurde nach 15 Minuten mit 1 N Salzsäure gestoppt. Die Absorption wurde zügig mit dem SUNRISE-Photometer (Tecan, Männedorf, Schweiz) bei 450nm gemessen.

Es wurde eine Standardkurve mit dem im Kit erhaltenem NT3 nach Protokoll hergestellt.

#### **11.2.4.4. CRF - ELISA**

Die Platte wurde bereits mit den Antikörpern beschichtet geliefert. Sie wurde zunächst gewaschen. Die Proben sowie die Reagenzien wurden zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Danach wurden die Pufferlösung, die Proben und die Standardlösung in die Vertiefungen aufgetragen und bei Zimmertemperatur für vier Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die markierte Antikörperlösung hinzu pipettiert und für zwei weitere Stunden inkubiert. Es erfolgte erneut eine Waschung, danach wurde eine Streptavidin-Meerrettichperoxidase (SA-HRP)-Lösung für eine Stunde hinzugefügt und wiederum erneut gewaschen. Es erfolgte das Auftragen der TMB-Lösung. Diese wurde lichtgeschützt für 30 Minuten belassen. Die Absorption wurde nach Hinzufügen der Stopplösung bei 450 nm mit dem SUNRISE-Photometer gemessen.

### **11.3. Publikation und Posterpräsentation**

#### **11.3.1. Publikation**

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.

#### **11.3.2. Posterpräsentation**

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.