





## Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Heger, Runa Gesine:

Interaktion des postsynaptischen plasticity related gene 1 mit dem präsynaptischen Lysophosphat Säure-Rezeptor 2 im emotionalen Verhalten und der Morphologie der Maus: - 2020. - 90 S. - 45 Abb. - 1 Tab.

Kurzreferat:

Ein Mangel des plasticity related gene 1 (PRG1), ein membranständiges Protein der Postsynapse glutamaterger Neurone, führt zu einer Hyperexzitation durch den präsynaptisch lokalisierten lysophosphatidic acid receptor 2 (LPA2R) über den Botenstoff LPA. Defizite eines PRG1 Knockouts in Mäusen können durch einen zusätzlichen Knockout des LPA2R (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>) teilweise aufgehoben werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Wirkung eines PRG1 Knockouts über den LPA2R stattfinden muss. Das Rescue der glutamatergen Hyperexzitation kann durch einen Verhaltensversuch mit TMT Duftstoff und nachfolgender morphologischer Bestimmung der aktivierten Neurone belegt werden. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen in diesem Testverfahren zur Untersuchung des Furchtverhaltens keine Unterschiede zu ihren Wildtypen. Die Interaktion des PRGs1 und des LPA2Rs scheinen allerdings in der Angstverarbeitung gering ausgeprägt zu sein. Im Elevated Plus Maze, einem Verhaltensversuch zur Objektivierung des Angstverhaltens, zeigen sich weiterhin signifikante Unterschiede zu den Wildtypen, analog zu den Tieren mit einem alleinigen PRG1 Mangel. Die Interaktion zwischen PRG1 und LPA2R an glutamatergen Synapsen sorgt demnach für eine physiologische Verarbeitung sensorischer Reize, insbesondere Furcht auslösender Stimuli.

Schlüsselwörter:

PRG1, LPA2R, TMT, c-Fos, Glutamat

# 1 Inhaltsverzeichnis

2	Abkürzungsverzeichnis .....	6
3	Einleitung .....	9
3.1	Das olfaktorische System .....	9
3.1.1	Riechbahn.....	9
3.1.2	Grüneberg Ganglion .....	13
3.2	Angst und Furcht .....	14
3.2.1	Amygdala.....	14
3.2.2	Neuroanatomie der TMT-induzierten Furcht.....	16
3.3	Glutamaterges System .....	18
3.3.1	Plasticity related genes .....	19
3.3.2	Lysophosphatidic acid und seine Rezeptoren.....	23
3.3.3	Beeinflussung der Exzitation durch PRG1 und LPA2R.....	24
3.4	TMT .....	26
3.5	Immediate early gene c-Fos .....	27
3.6	Zielstellung .....	28
4	Material und Methoden .....	29
4.1	Versuchstiere .....	29
4.2	Verhaltensversuche.....	29
4.2.1	Elevated Plus-Maze .....	30
4.2.2	Soziale Interaktion .....	31
4.2.3	TMT-induziertes Furchtverhalten .....	32
4.3	Perfusion der Tiere und Präparation der Gehirne.....	34
4.4	Färbung.....	36
4.4.1	Nissl-Färbung.....	36
4.4.2	c-Fos Immunhistochemie .....	36
4.4.3	Quantifizierung.....	36
4.5	Statistik.....	37
5	Ergebnisse .....	38

5.1	Verhaltensversuche.....	38
5.1.1	Elevated Plus-Maze .....	38
5.1.2	Soziale Interaktion .....	40
5.1.3	Testung mit TMT.....	42
5.2	Morphologie.....	46
5.2.1	Bulbus olfactorius - OB .....	47
5.2.2	Septum .....	49
5.2.3	Tuberculum Olfaktorium - OT.....	51
5.2.4	Gyrus dentatus (DG) im Hippocampus .....	52
5.2.5	Piriformer Cortex - PIR.....	53
5.2.6	Dorsale Taenia Tecta - TTd.....	55
5.2.7	Amygdala.....	56
5.2.8	Mediodorsaler Thalamus - MD.....	58
5.3	Korrelation Verhalten - Morphologie .....	59
6	Diskussion.....	60
7	Zusammenfassung.....	74
8	Literaturverzeichnis .....	75
(1)	Adolphs, R. (2013): The biology of fear. In: Current biology : CB 23 (2), S. 93...75	75
9	Danksagung.....	83
10	Ehrenerklärung .....	84
11	Bildungsweg.....	85
12	Anhang.....	86
12.1	Tabellenverzeichnis.....	86
12.2	Abbildungsverzeichnis.....	86
12.3	Protokolle .....	89
12.3.1	Nisslfärbung.....	89
12.3.2	c-Fos Immunhistochemie.....	89



## 2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	adrenocorticotropic hormone
AK	Antikörper
ANOVA	analysis of variance
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AON	anterior olfactory nucleus
ASD	autism spectrum disorders
ATX	Autotaxin
BA	basale amygdala
BB	Broca Band
Beta-Gal	Beta-Galaktosidase
BLA	basolateral complex of the amygdala
BNST	bed nucleus of the stria terminalis
CA1	Cornu ammonis Area 1
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CeA	central nucleus of the amygdala
c-Fos	c-Fos Gen
c-Fos	c-Fos Protein
CoA	cortical amygdala
DAB	Diaminobenzidin
EAAT	excitatory amino acid transporters
EEG	Electroencephalogram
EPM	Elevated Plus-Maze
EPSP	excitatory postsynaptic potential
EPSC	excitatory postsynaptic current
GABA	gamma-aminobutyric acid
GG	Grüneberg Ganglion
Gi/o	guanine nucleotide-binding protein i/o
Gs	guanine nucleotide-binding protein s
Gq	guanine nucleotide-binding protein q
Gl	glomerular layer
Gln	glutamine
GRK G	protein-coupled receptor kinase

Glu	glutamate
HIP	Hippokampus
IEG	immediate early gene
IL	Interleukin
K+	Kalium
KO	knockout
LaA	lateral amygdala
LPA	lysophosphatidic acid
LPAR	lysophosphatidic acid receptor
LPC	lysophosphatidylcholine
LPP	lipid phosphate phosphatase
LPT	Lipid Phosphatase
MD	mediodorsal thalamus
MeA	medial amygdala
mEPSC	miniature excitatory postsynaptic current
mGluR1-8	metabotropic glutamate receptor 1-8
mi+gr+pl	mitral, granular and plexiform layers
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	medial septum
Na+	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NDB	nucleus of the diagonal band of Broca
NMDA	N-Methyl-D-aspartate
NMDAR	N-Methyl-D-aspartate receptor
NPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-2
NT-3	Neurotrophin-3
OB	Bulbus olfactorius
OR	odorant receptors
ORN	olfactory receptor neuron
OT	olfactory tubercle / Tuberculum olfactorium
PA	phosphatidate
PAP	Phosphotransferasen
PB	Phosphatpuffer
PGA	periaqueductal gray
PIR	piriform cortex
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C

PLA2	phospholipase A2
PLC	phospholipase C
PRG	plasticity related gene
PRG1	plasticity related gene 1
PSD	postsynaptic densities
RNA	ribonucleic acid
SEM	standard error of the mean
TAAR	trace amine-associated receptor
TMT	2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline
TTd	taenia tecta dorsal
vGluT	vesikuläre Transporter
WT	wildtype
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 3 Einleitung

Die synaptische Transmission ist ein grundlegender Vorgang im Nervensystem und damit Voraussetzung für eine normale Hirnfunktion. Daran sind diverse Prozesse und verschiedene Moleküle beteiligt. Störungen der Transmission manifestieren sich in einer Vielzahl neuropsychiatrischer Erkrankungen. Diese Arbeit untersucht indirekt an glutamatergen Synapsen den Einfluss des postsynaptischen plasticity related gene 1 (PRG1) und seines präsynaptisch lokalisierten lysophosphatidic acid receptors 2 (LPA2R) auf emotionales Verhalten und Morphologie. In vorhergegangenen Untersuchungen konnten an PRG1 Knockout Mäusen (PRG1<sup>-/-</sup>) Verhaltensveränderungen nachgewiesen werden. PRG1-defiziente Tiere weisen eine höhere motorische Aktivität mit stereotypen Verhaltensmustern und ein reduziertes Angstverhalten auf (Schneider 2016; Schneider et al. 2018). Im räumlichen Lernen zeigen die PRG1<sup>-/-</sup> Tiere eine defizitäre Leistung gegenüber ihren Wildtyp-Geschwistern (Unichenko et al 2016).

Die in dieser Arbeit untersuchten Doppelknockout Tiere (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>) werden auf diesem Hintergrund in angst- und furchtstimulierenden, insbesondere olfaktorisch induzierten Verhaltensversuchen sowie dazu analysierter morphologischer Veränderungen untersucht. Hierzu werden zunächst die anatomischen und physiologischen Grundlagen der Geruchsbahn mit den verarbeitenden Hirnstrukturen dargelegt. Dabei liegt ein Schwerpunkt auf dem glutamatergen System, dem PRG1 und dem LPA2 Rezeptor. Nach der Erläuterung der eingesetzten Verhaltensversuche und der morphologischen Methoden folgt die Darstellung der Ergebnisse mit anschließender Diskussion und einer Aussicht für mögliche Anwendungsbereiche dieser Arbeit.

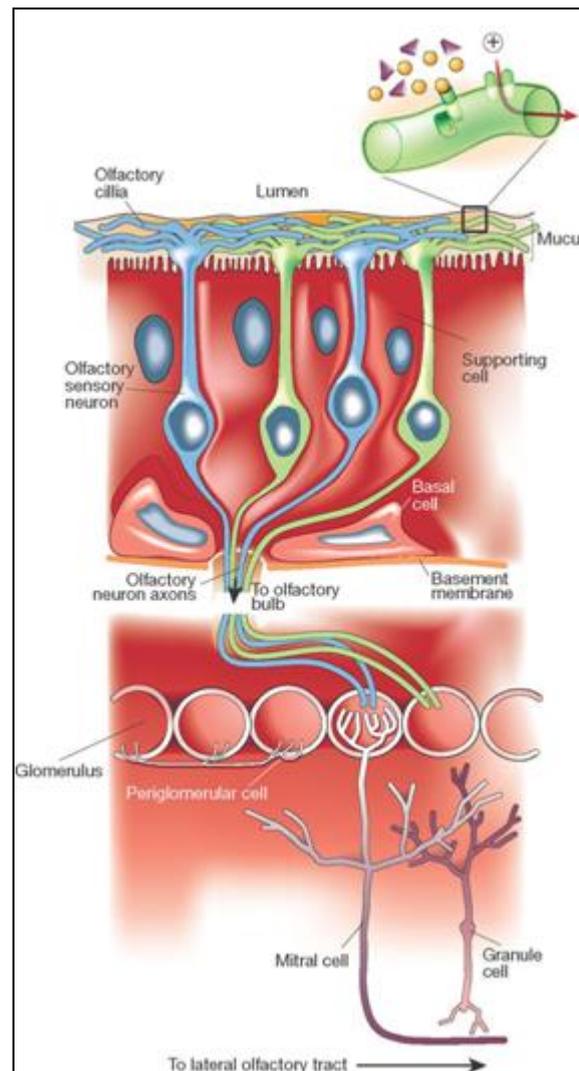
### 3.1 Das olfaktorische System

#### 3.1.1 Riechbahn

Der Geruch wird über das olfaktorische Epithel der Nase detektiert. Die primären Riechsinneszellen (ORN) exprimieren Rezeptoren, die die chemischen Signale zu elektrischen Aktionspotenzialen generieren (Schaible 2006). Die Geruchsrezeptoren (ORs) sind enorm divers: Der Mensch besitzt ca. 350 verschiedene Rezeptorarten, während Nagetiere 1200 bis 1500 unterschiedliche Rezeptoren allein zur Wahrnehmung von Gerüchen codieren (Liberles 2009). Die große Gruppe der ORs gehören zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Liberles 2009). Dabei handelt es sich um 7-Transmembran-Ionenkanäle.

Neben dieser klassischen Rezeptorgruppe besteht eine weitere G-Protein gekoppelte kleinere Untergruppe von Rezeptoren, die trace amine-associated Rezeptoren (TAAR) (Liberles und Buck 2006; Liberles 2009). Diese Untergruppe konnte im Riechepithel von Menschen, Fischen und Nagern identifiziert werden (Liberles und Buck 2006; Zhang et al. 2013). Die TAAR sind hoch spezifisch und sensitiv für geringste Konzentrationen aversiver Geruchsstoffe, die unconditioniertes Fluchtverhalten erzeugen (Dewan et al. 2013; Zhang et al. 2013). Sie registrieren die Gefahr über Amine, die im Urin und Kot der Fressfeinde enthalten sind. Ferrero et al. und Dewan et al. beschreiben die Affinität von 2-phenylethylamine zum TAAR4 und trimethylamine zum TAAR5 (Ferrero et al. 2011; Dewan et al. 2013). Die Identifikation von 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) wird, als der alarmierende Duftstoff des Fressfeindes Fuchs, allerdings primär über die große Gruppe der ORs generiert (Fortes-Marco et al. 2013). Trotz einer TAAR-Defizienz verhalten sich Nager bei der Exposition gegenüber TMT adäquat (Dewan et al. 2013).

Die ORs agieren weitestgehend oligospezifisch, ein bestimmter Geruchsstoff kann folglich von mehreren Rezeptorarten erkannt werden, wobei die einzelnen Rezeptoren nur einige wenige Geruchsstoffe erkennen (Firestein 2001; Kobayakawa et al. 2007). Die primären Sinneszellen bilden mit ihren Axonen die sogenannten Filae olfactoria, die durch die Lamina cribrosa ziehen und die Verbindung zum Bulbus olfactorius (OB) herstellen (Firestein 2001). Die Axone der ORNs ziehen in die glomeruläre Schicht des OB, wo alle Riechsinnneszellen mit dem gleichen OR auf ein einzelnes Glomerulus projizieren (Firestein 2001). In den fast 2000 runden ca. 80µm großen Neuropilstrukturen des OB der Nagetiere (Mombaerts et al. 1996; Firestein 2001), konvergieren die zahlreichen Axone der ORs auf nur 5-25 Dendriten der Mitral- und Tuftedzellen (Firestein 2001) (siehe **Abb. 1**). Die Mitralzellen übermitteln die Signale über Glutamat. Auch die beiden Interneuron-Populationen, die periglomerulären und granulären Zellen sind glutamaterg (Pimentel und Margrie 2008).



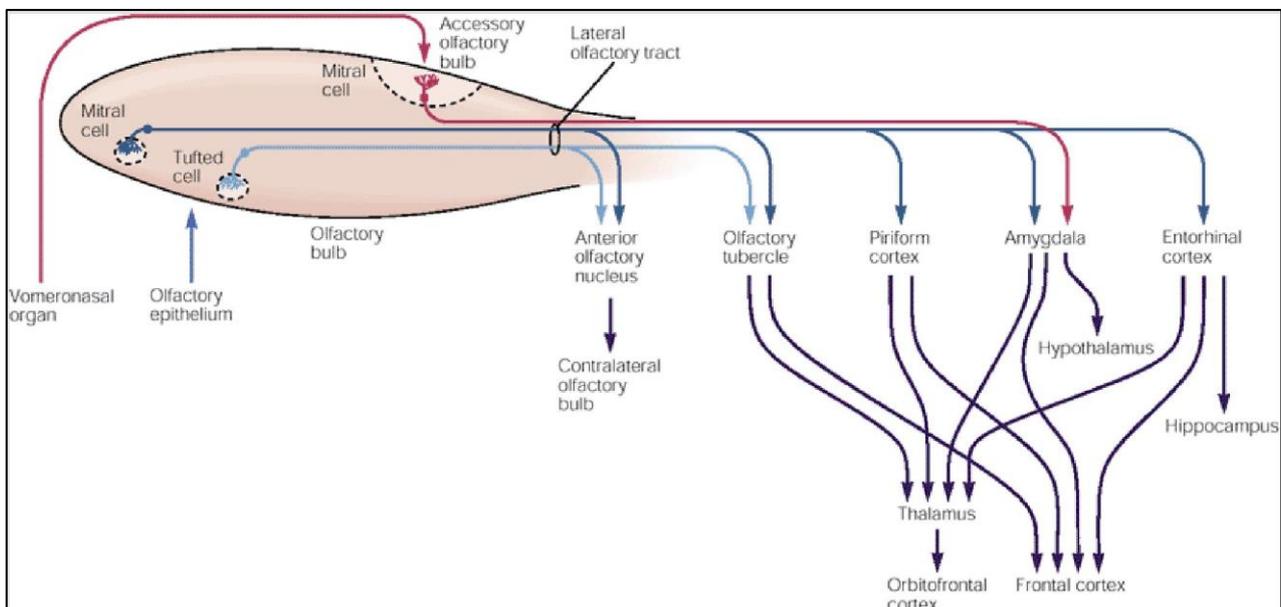
**Abb. 1** Projektion der primären olfaktorischen Sinneszellen zu den Mitralzellen in der glomerulären Schicht des Bulbus olfactorius. Die Axone der ORNs mit dem gleichen OR projizieren in die glomeruläre Schicht des OB auf einen einzelnen Glomerulus (Firestein 2001)

Die Axone der Mitral- und Tuftedzellen verlassend den OB, bilden zunächst den Tractus olfactorius und erreichen den olfaktorischen Cortex. Der olfaktorische Cortex lässt sich durch fünf Hirnregionen definieren: anteriorer olfaktorischer Nucleus (AON), Tuberculum olfactorium (OT), piriformer Cortex (PIR), kortikale Amygdala (CoA) und entorhinaler Cortex (Korsching 2002; Kandel 2013; Keshavarzi et al. 2015). Der Tractus olfactorius zweigt sich zuvor in die Stria olfactoria medialis und lateralis auf. Der laterale Teil enthält Axone der Mitralzellen, die mit allen fünf oben genannten Hirnregionen in Verbindung stehen, die Axone der Tuftedzellen, der lateralen Stria hingegen projizieren hauptsächlich zum OT und AON (Kandel 2013) (siehe **Abb. 2**).

Die neuronalen Verbindungen zum Neocortex, vom piriformen und entorhinalen Cortex über den Thalamus zum orbitofrontalen Cortex, sind verantwortlich für die bewusste Wahrnehmung

und Diskriminierung von Gerüchen. Der Pathway über die Amygdala und den Hypothalamus dagegen steuert die emotionalen, unkonditionierten Aspekte gegenüber exponierten Duftstoffen (Kandel 2013). Die Amygdala erhält zusätzlich Informationen von dem über Pheromone aktivierten akzessorischem Bulbus olfactorius (Firestein 2001).

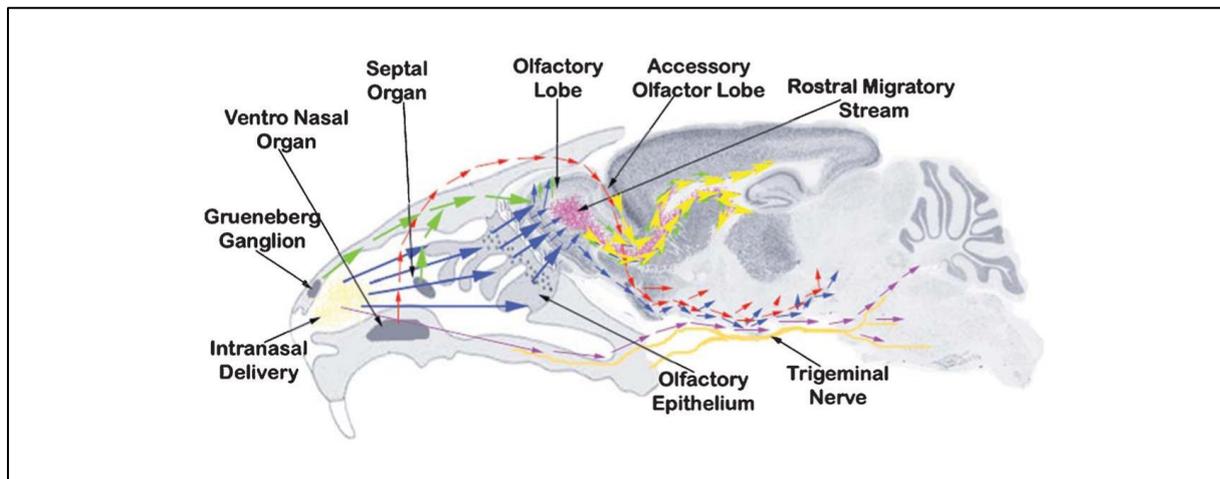
Die Projektionsziele der Stria olfactoria medialis liegen im OT und der Area septalis. Von dieser Region gelangen die Informationen über die Stria medullaris zur Habenula, den Nuclei habenulares, die unter anderem weiter zu vegetativen Hirnnervenkernen projizieren. Dieser Teil ist folglich nicht in die bewusste Geruchswahrnehmung integriert, wohl aber in geruchsassoziierte Reflexe (Schünke et al. 2015).



**Abb. 2** Mitralzellen projizieren zu allen fünf Regionen des olfaktorischen Cortex, während die Tuftedzellen lediglich eine Verbindung zum anterior olfaktorischer Nucleus und zum Tuberculum olfactorium aufweisen. Der Pathway zum Neocortex, in direkter Projektion zum piriformer und entorhinaler Cortex und über den Thalamus zum orbitofrontalen Cortex, dient der bewussten Wahrnehmung und Diskriminierung, die Verbindungen über die Amygdala und den Hypothalamus der emotionalen und unkonditionierten Verarbeitung von Gerüchen (Kandel 2013)

### 3.1.2 Grüneberg Ganglion

Die ORs im Riechepithel sind nicht die einzigen Rezeptoren, die eine TMT vermittelte Angstreaktion generieren. Bei Nagetieren ist zusätzlich das sogenannte Grüneberg Ganglion (GG) von Bedeutung (siehe **Abb. 3**).



**Abb. 3** Verlauf der sensorischen Neurone vom Grüneberg Ganglion und dem olfaktorischen Epithel zum Bulbus olfactorius (Xiao et al. 2013)

Das Grüneberg Ganglion (GG) bildet ein olfaktorisches Subsystem am Eingang der Nasenhöhlen von Nagetieren und wurde erstmals 1973 von Hans Grüneberg beschrieben (Grüneberg 1973; Storan und Key 2006). Die Ganglien liegen beidseits am distalen nasalen Septum und umfassen ca. 300-500 Zellen. Jede Zelle ist über ein eigenes Axon mit dem OB verbunden. Im Gegensatz zu andern olfaktorischen Systemen, ist das GG bereits bei Geburt vollständig ausgebildet und ohne jegliche Konditionierung funktionstüchtig (Storan und Key 2006; Brechbuhl et al. 2013).

Das Ganglion spielt eine wichtige Rolle in der Registrierung sowohl von Alarm-Pheromonen als auch Kairomonen und ist zusätzlich sensitiv für kalte Temperaturen (Brechbuhl et al. 2008). Die Rezeptoren des Ganglions sind sensibilisiert auf methylierte Thiazoline, also auf Strukturen die im TMT enthalten sind (Brechbuhl et al. 2013). Brechbühl et al. wiesen nach, dass eine Durchtrennung der Axone des GG zu einem verminderten Freezing-Verhalten bei einer TMT Exposition führt (Brechbuhl et al. 2008). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl die Rezeptoren des GG, als auch die ORs des olfaktorischen Epithels an der Transduktion TMT-induzierten Verhaltens beteiligt zu sein scheinen (Kobayakawa et al. 2007; Brechbuhl et al. 2013; Fortes-Marco et al. 2013).

## 3.2 Angst und Furcht

Für das weitere Verständnis meiner Arbeit soll in diesem Abschnitt auf die Begriffe Angst -*anxiety*- und Furcht -*fear*- näher eingegangen werden. Sie werden selbst in der wissenschaftlichen Literatur häufig ohne Differenzierung synonym verwendet.

Die Furcht ist eine Reaktion hervorgerufen durch einen konkreten und spezifischen Stimulus, wie bspw. durch einen nozizeptiven Reiz. Sie ist fokussiert auf einen externen, objektivierbaren Reiz (Steimer 2002; Craighead und Nemeroff 2004) und kann durch das Wiedererkennen eines Stressors (Konditionierung) aktiviert werden, der zuvor bereits Schmerz oder Stress ausgelöst hat. Dahingegen stellt die Angst eine innere Unruhe dar, eine generalisierte Antwort auf einen nicht eindeutig definierbaren Reiz oder auf einen inneren Konflikt (Pellow 1985; Steimer 2002; Tovote et al. 2015). Die Angst bezieht kognitive Aspekte mit ein und bleibt dabei unbestimmt. Angst kann ausgelöst werden durch das Gefühl der Unkontrollierbarkeit, fokussiert auf mögliche Stressoren, potenzielle negative Events oder die Zukunft. Wohingegen die Furcht durch eine präsente, imminente Gefahr ausgelöst wird (Steimer 2002). Beide Emotionen haben direkte Auswirkungen auf den Körper. Sie bereiten den Körper auf Alarmbereitschaft, Verteidigung oder die Flucht vor (Rosen und Schulkin 1998; Steimer 2002).

An der Angstverarbeitung sind verschiedene und miteinander interagierende kortikale sowie subkortikale Areale beteiligt (McDonald 1998; Tovote et al. 2015). Die Amygdala kann als die zentrale und übergeordnete Struktur der Verarbeitung von Gefahr bezeichnet werden (Fox et al. 2015). Während die konditionierte Furcht eindeutig über die Amygdala verarbeitet wird, ist die Einbeziehung dieser Struktur in die Angst getriggerte Reaktion weniger eindeutig (Davis 1998; Steimer 2002). Die Verschaltung der Angst ist diffuser und vielfältiger im Gegensatz zur Furchtreaktion (Davis 1998; Steimer 2002; Tovote et al. 2015). Treit et al. konnten bereits 1993 zeigen, dass eine Läsion der Amygdala im Rattengehirn zu einer Suppression der Furchtreaktion führte, nicht aber zu Beeinflussung der Angstreaktion im Elevated Plus-Maze (Treit et al. 1993).

### 3.2.1 Amygdala

Die Amygdala umfasst eine Hirnregion bestehend aus multiplen einzelnen Kernen und Regionen, die in der Gesamtheit mit ihren Afferenzen und Efferenzen ein wichtiges neuroanatomisches Korrelat für die Verarbeitung von Emotionen, Angst und Furcht bildet (McDonald 1998; Sah et al. 2003; Pessoa 2010; Fox et al. 2015). Es ist keine einzelne Struktur mit einer gerichteten Funktion, sondern vielfältig und wird in der Literatur unterschiedlich eingeteilt. Die Amygdala erhält ihre Afferenzen vor allem aus den Sinnessystemen (Zald und Pardo 1997) und weist Efferenzen zum Striatum, Hypothalamus, Hirnstamm, Nucleus accumbens,

Hippocampus, periaquäduktales Grau, orbitofrontalem Cortex, insularem Cortex und anteriorerem Cingulum auf (Davis 1998; Dong et al. 2001; Davis 2006; Pessoa 2010; Fox et al. 2015).

Funktionell und anatomisch lässt sich die Amygdala in verschiedene Bereiche einteilen. Anatomisch kann sie unterteilt werden in die folgenden Regionen: der mediale Kern der Amygdala (MeA) (Swanson und Petrovich 1998), der basolaterale Kern (BLA), der den basalen (BA) und den lateralen (LaA) Kern der Amygdala enthält (Pessoa 2010; Orsini und Maren 2012) und der zentrale Kern der Amygdala (CeA) (Swanson und Petrovich 1998; Davis 1998). Funktionell steht das olfaktorische System in enger Verbindung zum MeA (Blanchard et al. 2005); das frontotemporale System mit dem BLA und der zentrale Kern der Amygdala (CeA), der über Projektionen zum Hirnstamm und zum Hypothalamus verfügt, ist beteiligt an der Generierung auf Angst und Furcht bezogenen Verhaltens (Swanson und Petrovich 1998; Steimer 2002; Lanuza et al. 2004; Bernadette 2005; Adolphs 2013; Roth und Strüber 2014; Fox et al. 2015). Insbesondere der BLA mit 80% glutamaterger und 20% GABAerger Neuronen ist für die Verschaltung furchtgetriggerten Verhaltens essentiell (Tovote et al. 2015).

Des Weiteren lässt sich eine Unterscheidung bezüglich der Verarbeitung konditionierten und unkonditionierten Furcht- und Angstverhaltens festhalten. Konditioniertes Furchtverhalten, bspw. bewirkt durch elektrische Stromapplikationen (*foot shock*) mit simultanen Ton- oder Lichtstimuli, wird über BLA und CeA generiert. Das angeborene Furchtverhalten hingegen verläuft über MeA (Rosen et al. 2015), teilweise ebenfalls über BLA (Takahashi et al. 2007; Ehrlich et al. 2009).

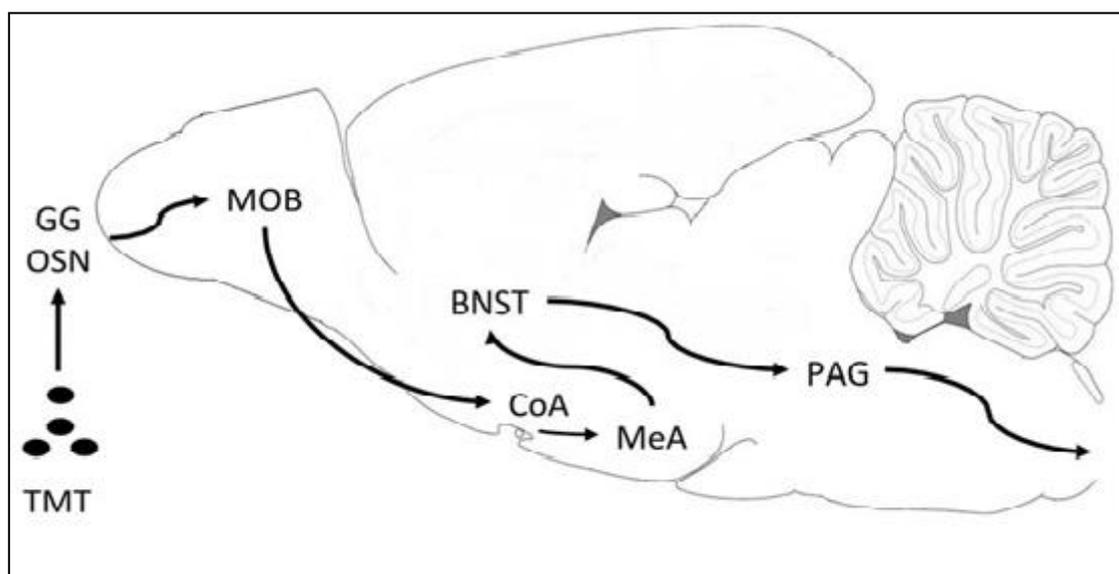
Eine weitere relevante Struktur in der Verarbeitung von Stressoren ist der bed nucleus of stria terminalis (BNST). Der BNST kann evolutionär betrachtet zu dem erweiterten Begriff der Amygdala gezählt werden, da der strukturelle Aufbau große Ähnlichkeiten aufweist (Fox et al. 2015). Die Funktion des BNST liegt neben einer Kontrolle des Nahrungs- und Sexualverhaltens in der Generierung einer Angstreaktion (Davis 1998; Steimer 2002; Bailey und Crawley 2009; Adolphs 2013).

Zu den weiteren Hirnregionen, die an der Angst- und Furchtverarbeitung beteiligt sind, gehören der Hippocampus, der unter anderem die kontextabhängige Koordination der Reaktion auf Angst oder Furcht übernimmt (Lang et al. 2009; Knight et al. 2009), die Inselregion, die unter Einbeziehung der Sensorik Reaktionen generiert (Knight et al. 2009), der präfrontale Cortex und das anteriore Cingulum für die Verarbeitung der emotionalen Reize (Davidson 2002).

### 3.2.2 Neuroanatomie der TMT-induzierten Furcht

Ein Schwerpunkt meiner Untersuchungen liegt auf der TMT-induzierten Furchtreaktion von Mäusen. Im Folgenden wird die Verarbeitung dieses olfaktorischen Stressors dargelegt. Die genauen Schaltkreise, ausgehend von der Amygdala, sind allerdings noch nicht endgültig erfasst (Rosen et al. 2015) (siehe **Abb. 4**).

Wie oben bereits beschrieben, wird TMT sowohl von den ORs als auch vom GG registriert und von den primären Sinneszellen glutamaterg auf die Mitral- und Tuftedzellen des OB verschaltet. Die Projektion zur kortikalen Amygdala erfolgt unter einer topographischen Zuordnung der verschiedenartigen Glomeruli (Matsumoto et al. 2010; Root et al. 2014). Durch eine Inhibition dieser zur kortikalen Amygdala projizierenden Mitralzellen weisen Nager unter TMT-Exposition signifikant weniger TMT-induziertes Freezing auf (Root et al. 2014). Damit sind in der kortikalen Amygdala Neurone an der angeborenen Duft-induzierten Freezing Reaktion beteiligt (Miyamichi et al. 2011; Root et al. 2014).



**Abb. 4** Vereinfachtes Schema des Schaltkreises TMT-induzierten Freezing-Verhaltens (Rosen et al. 2015b)

Die TMT aktivierten Neurone der kortikalen Amygdala projizieren zum MeA (Day et al. 2004; Blanchard et al. 2005; Brennan und Zufall 2006). Mit Hilfe von c-Fos, einem immediate early gene und Marker für die neuronale genetische Aktivität, kann die Aktivierung der Neurone in der MeA in Folge einer TMT-Exposition gezeigt werden (Day et al. 2004). Eine Inhibition der MeA dagegen führt zu einer signifikanten Reduktion TMT-induzierten Freezings (Müller und

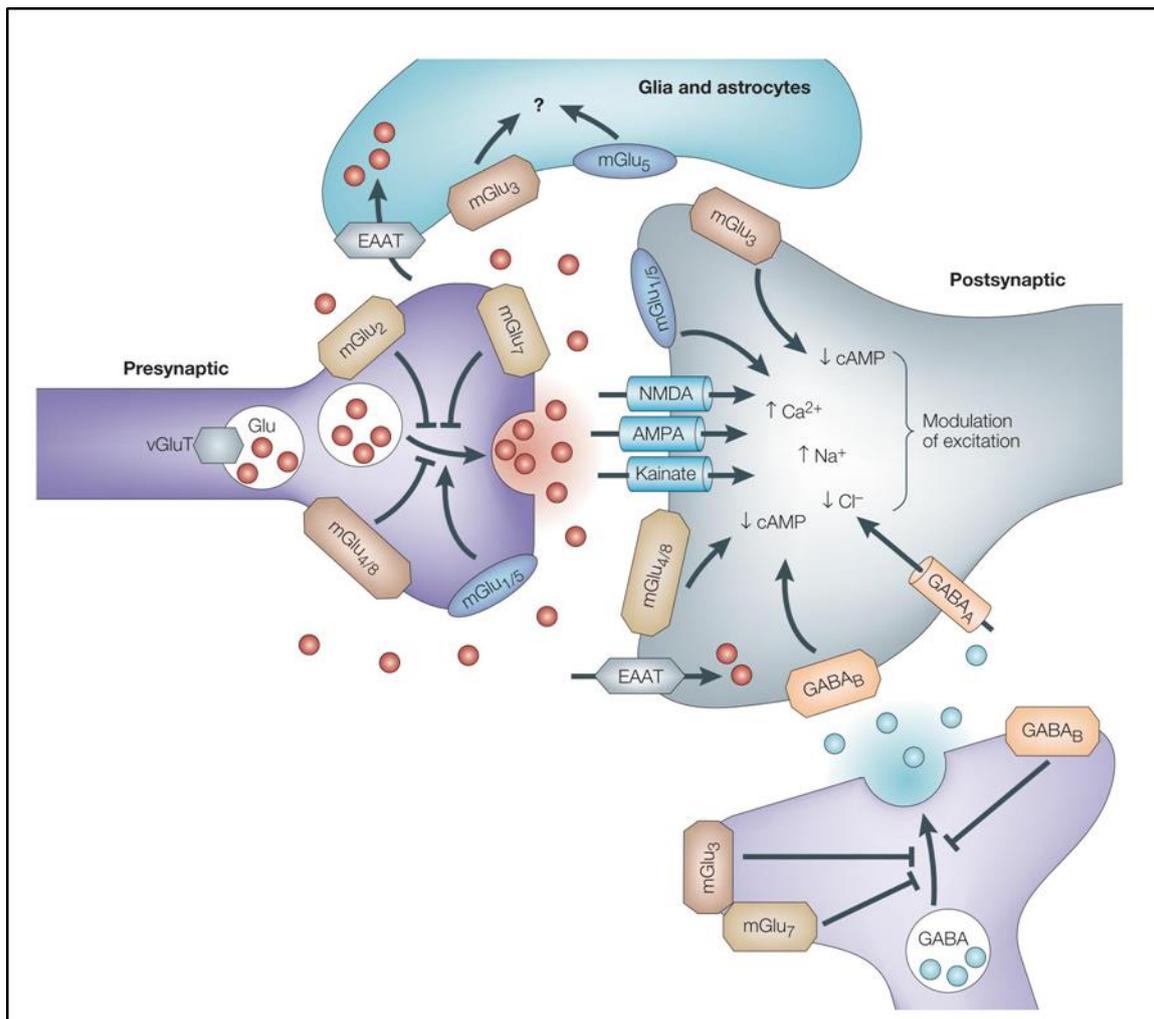
Fendt 2006). Da das TMT-induzierte Freezing eine unconditionierte Reaktion ist und über den kortikalen und medialen Teil der Amygdala generiert wird, scheinen die BLA und CeA für dieses Verhalten keine entscheidende Funktion in dem TMT-induzierten Schaltkreis darzustellen (Rosen et al. 2015). Die beiden Kerne zeigen lediglich eine Modifikation des TMT-induzierten Verhaltens. Durch eine Läsion des BLA wird eine minimale Reduktion des TMT-induzierten Freezings hervorgerufen (Wallace und Rosen 2001; Fendt et al. 2003; Müller und Fendt 2006).

Des Weiteren sind der BNST, das laterale Septum und der mediale Hypothalamus an der Generierung TMT-induzierten Freezings beteiligt, alle drei Areale sind zentral für die Angst- und Furchtverarbeitung (Lanuza et al. 2004; Blanchard et al. 2005; Takahashi et al. 2005; Fendt und Endres 2008; Rosen et al. 2015).

Ausgehend von der medialen Amygdala werden die Informationen teils direkt zu den Kernen des Mittelhirns und des Hirnstamms weitergeleitet (Ledoux et al. 1988; Fendt et al. 1994; Müller und Fendt 2006). Insbesondere das periduktale Grau (PAG) im Bereich des Mittelhirns stellt eine wichtige Struktur als Verbindung zum motorischen spinalen System dar und ist essenziell in der Generierung des Freezing-Verhaltens (Ledoux et al. 1988). Ein experimenteller PAG-Block führt unter Stimulation der Amygdala zu signifikant reduzierter Abwehrreaktion (Ledoux et al. 1988). Alternativ besteht die Verbindung der MeA über den BNST bevor es das Mittel- oder Stammhirn erreicht (Kiyokawa et al. 2005; Müller und Fendt 2006). Auch eine Inaktivierung des BNST führte unter TMT-Exposition zu einer signifikanten Reduktion des Freezings (Wallace und Rosen 2000; Fendt et al. 2003). Neben den schon erwähnten Hirnregionen sind durch TMT-Exposition folgende Regionen aktivierbar und können durch den Nachweis von c-Fos dargestellt werden: Nucleus accumbens, Locus coeruleus, Nucleus paraventricularis hypothalami, Area praeoptica, Nucleus parabrachialis und Nucleus tractus solitarius. Diese sind somit als ein Teil der Verarbeitung des TMT-Stressors einzuordnen (Day et al. 2004; Fendt et al. 2005; Kiyokawa et al. 2005; Endres und Fendt 2009; Janitzky et al. 2009).

### 3.3 Glutamaterges System

Glutamat ist ein häufiger exzitatorischer Neurotransmitter des Zentralen Nervensystems (ZNS) (Conn 2003; Kandel 2013). Durch Freisetzung in den synaptischen Spalt entfaltet Glutamat seine exzitatorische Wirkung. Eine Wiederaufnahme des Transmitters erfolgt über Neurone und Gliazellen, besonders den Astrozyten, wo es dann zu Glutamin umgewandelt wird und dieses in die glutamatergen Neurone zurückdiffundiert. Mithilfe der Glutaminase wird es wieder zu Glutamat hydrolysiert und steht als Transmitter erneut zur Verfügung.



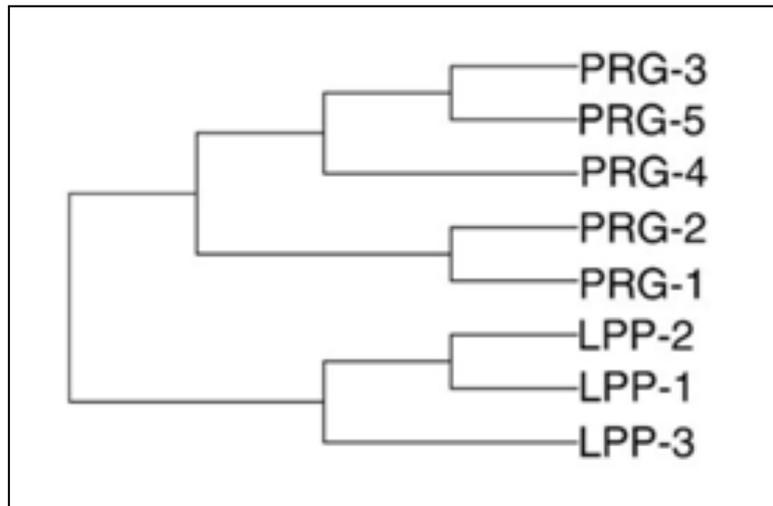
**Abb. 5** Schematische Darstellung des Aufbaus einer glutamatergen Synapse mit inotropen Glutamat-Rezeptoren (N-methyl-D-Aspartat (NMDA), Kainate,  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)), metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR), vesikulären Transportern (vGluT1 und vGluT2), Glutamat-Wiederaufnahmetransportern (excitatory amino-acid transporters, EAAT1–5) und dem inhibitorischen Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) (Swanson et al. 2005)

Die glutamataffinen Rezeptoren lassen sich in zwei Untergruppen untergliedern, die ionotropen (NMDA und non-NMDA-Rezeptoren) und metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR). Von den mGluR sind 8 Typen mit noch weiteren Subtypen (mGluR1 - mGluR8) bekannt (Shigemoto et al. 1997; Conn 2003), die alle G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind (Pin und Acher 2002). Diese lassen sich anhand der Lokalisation und der nachfolgenden Signalwege wiederum in drei Hauptgruppen einteilen (Conn 2003; Swanson et al. 2005). Die Gruppe I mit mGluR 1 und 5 ist vorrangig an der Postsynapse lokalisiert und führt unter anderem über das G-Protein gekoppelte Protein  $G_q$  zur Calciumfreisetzung und schließlich zur Exzitation (Shigemoto et al. 1997; Sorensen und Conn 2003; Swanson et al. 2005). Vermehrt an der Präsynapse lokalisiert sind die Rezeptoren der Gruppen II (mGluR2 und 3) und III (mGluR4,6,7 und 8) (Shigemoto et al. 1997). Sie bewirken  $G_i$ -gekoppelt zum Beispiel über eine Reduktion der Konzentration des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP) eine Inhibition des exzitatorischen Potentials (siehe **Abb. 5**) (Shigemoto et al. 1997; Galvez und Pin 2003; Swanson et al. 2005).

Die Funktion des glutamatergen Systems zur Regulierung der neuronalen Exzitation spielt in den limbischen Strukturen eine bedeutende Rolle auch in der Angst- und Furchtverarbeitung (Bernadette 2005). Glutamat stellt in der Riechbahn an mehreren Synapsen einen wichtigen Neurotransmitter zur Verarbeitung und Reaktion auf olfaktorische Stressoren dar. Der in dieser Arbeit verwendete olfaktorische Stressor TMT ist in der Riechbahn an vielen Synapsen durch Glutamat vermittelt. Eine Transduktion mittels Glutamat erfolgt am Nervus olfactorius auf den OB (Dong et al. 2009) zu den Mitral-, Körner- und Periglomerulären-Zellen (Dong et al. 2007; Pimentel und Margrie 2008) und in den weiteren Projektionen zur Amygdala und weiteren limbischen Strukturen (Bernadette 2005; Jones et al. 2008; Rosen et al. 2015).

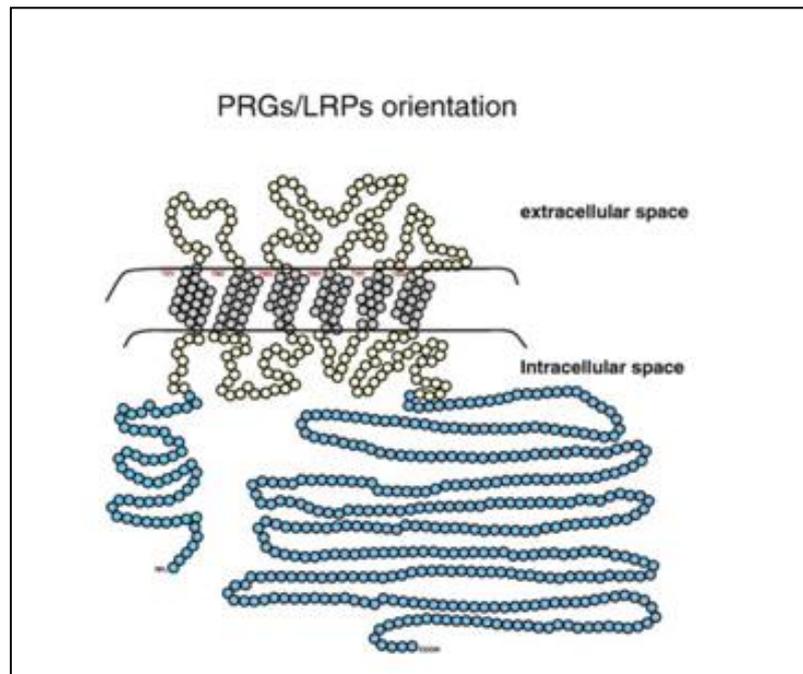
### 3.3.1 Plasticity related genes

Die Plasticity Related Genes (PRG) sind eine relativ junge Genfamilie, die 2003 erstmals von Bräuer et al. beschrieben wurden (Bräuer et al. 2003). Sie werden als eine Untergruppe der Lipid Phosphatasen/Phosphotransferasen (PAP/LPT) (Sigal et al. 2005; Trimbuch et al. 2009) klassifiziert. Die integralen Membranproteine sind vergleichbar mit den Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP), von denen bisher drei unterschiedliche benannt werden können (siehe **Abb. 6**) (Bräuer et al. 2003).



**Abb. 6** Familie der Lipid Phosphatasen/ Phosphotransferasen mit den Untergruppen Lipid Phosphat Phosphatasen 1 bis 3 (LPP) und den Plasticity Related Genes 1 bis 5 (PRG) (Bräuer und Nitsch 2008)

Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP) bestehen aus sechs Untereinheiten, die in der Membran verankert sind und drei extrazellulären Einheiten, die mittels enzymatischer Aktivität bioaktive Lipide abbauen können. Über die Konzentration der Lipide werden Signalkaskaden an der Synapse beeinflusst (Sigal et al. 2005). Das Plasticity Related Gene 1 (PRG1) wurde als ein weiteres Molekül dieser Familie erstmals 2003 entdeckt und beschrieben (Bräuer et al. 2003). Vier weitere Subtypen sind bisher bekannt (PRG 2 bis 5), die sich durch die Anzahl an Aminosäuren voneinander unterscheiden. Im Gegensatz zu den LPP 1 - 3 sind die PRG spezifisch in Wirbeltieren exprimiert, insbesondere im neuronalen Gewebe (Bräuer und Nitsch 2008). Weiter spezifizierend ist eine PRG1 Expression auf den Dendriten (*postsynaptic densities* (PSD)) glutamaterger Neurone limitiert (Trimbuch et al. 2009).



**Abb. 7** Aufbau des humanen PRG1 mit drei extrazellulären und sechs Transmembran-Untereinheiten, sowie blau markierten intrazellulären Regionen, die den C- und N-Terminus darstellen (Bräuer und Nitsch 2008a)

PRG1 weist mit seinem sehr ähnlichen Aufbau zu LPP mit den drei extrazellulären Einheiten eine modulierende Funktion der glutamatergen Transmission auf (**Abb. 7**) (Trimbuch et al. 2009). PRG1 reguliert den Level des bioaktiven Lipid Lysophosphatidic acid (LPA) (Trimbuch et al. 2009; Petzold et al. 2015). Trimbuch et al. konnten 2009 zeigen, dass es durch ein Inhibition von PRG1 zu einer signifikant reduzierten Aufnahme von LPA kommt (Trimbuch et al. 2009). Die Modellierung der LPA Konzentration könnte durch die enzymatische Aktivität der extrazellulären Einheiten des LPP durch Dephosphorylierung erreicht werden (Zhang et al. 2000; Bräuer et al. 2003; Brindley 2004; Bräuer und Nitsch 2008). In Vivo scheint die enzymatische Aktivität jedoch keine Rolle zu spielen in der Modifikation der glutamatergen Synapsen, sondern diese eher durch eine sensorähnliche Aktivität zu modulieren (Trimbuch et al. 2009). Der Weg auf dem PRG1 diese Veränderungen bewirkt ist letztlich noch unklar. Vermittelt werden die Effekte über LPA-Rezeptoren.

PRG1 spielt auch eine Rolle in der Entwicklung des Gehirns. Die Expression seiner mRNA konnte ab dem 19. embryonalen Tag bei Mäusen detektiert werden, insbesondere in der Anlage des Hippocampus (Bräuer und Nitsch 2008). Bräuer et al. legten dar, dass das PRG1 Protein entwicklungsabhängig exprimiert wird und das axonale Wachstum beeinflusst (Bräuer et al. 2003). Auch bei regenerativen Prozessen konnte eine vermehrte Expression von PRG1 an den betroffenen, neu auswachsenden Axonen nachgewiesen werden (Bräuer et al. 2003). Eine Deletion des PRG1 führte in Mäusen zu einer herabgesetzten Schwelle für epileptische

Anfälle, insbesondere in der juvenilen Phase. Passend konnte eine Augmentation der exzitatorischen postsynaptischen Potenziale (EPSP) quantifiziert und durch Elektroenzephalogramme (EEG) juvenile Anfälle dargestellt werden (Trimbuch et al. 2009). Auch adulte PRG1 defiziente Mäuse zeigen morphologische Veränderungen im Hippocampus. Hier finden sich neben einer Sklerose und einer astrozytären Gliose ein Moosfasersprouting im Str. moleculare des Gyrus dentatus (Trimbuch et al. 2009). In der Amygdala konnte für heterozygote PRG1 defiziente Mäuse eine erhöhte Anzahl von immunpositiven NPY-Neurone quantifiziert werden (Petzold 2016).

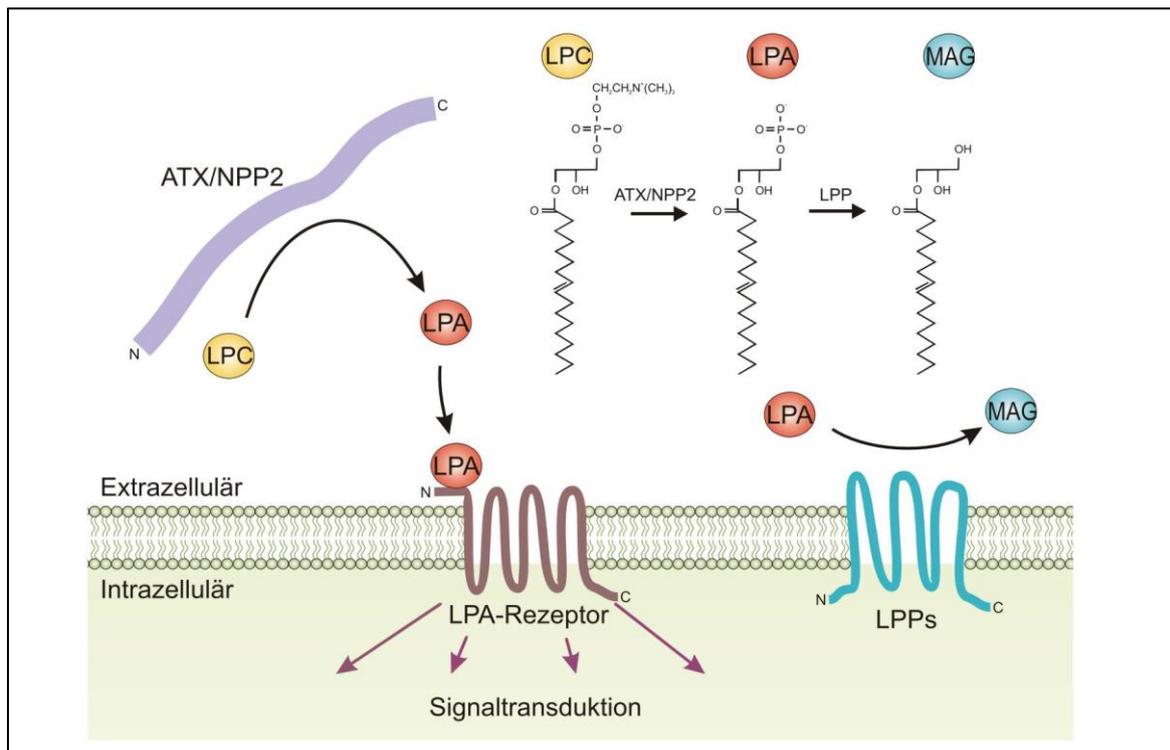
PRG1 defiziente Mäuse weisen einen gesteigerten Bewegungsdrang mit sich wiederholenden stereotypen Bewegungen bei gleichzeitig reduzierter Verarbeitung sensorischer Informationen auf (Schneider et al. 2018). Bereits in der Haltung wurde bei den PRG1 defizienten Mäusen eine erhöhte motorische Aktivität im homecage beobachtet. Es wurde eine erhöhte Laufbereitschaft und repetitives Verhalten, wie wiederholtes Springen in den Ecken (Jumping) festgestellt. In der Untersuchung im Beam balance/walking, welches die sensorische und feinmotorische Verarbeitung testet, ließ sich ein signifikantes Defizit der sensorischen Verarbeitung und der Feinmotorik im Unterschied zu den Wildtypen beobachten. In der Konfrontation mit dem TMT Duftstoff zeigten die PRG1 defizienten Tiere ein deutlich vermindertes Freezing Verhalten und kaum Furcht vor dem TMT-Duftstoff. Die Mäuse liefen teilweise über das mit TMT getränkte Filterpapier, ohne eine Reaktion darauf zu zeigen. Durch das signifikant verminderte Freezing-Verhalten der PRG1 defizienten Tiere wird deutlich, dass sie zwar mit einem Furchtverhalten reagieren, dies aber signifikant reduziert ist im Vergleich zu den Wildtypen (Schneider 2016). Zuzüglich der gestörten Furchtreaktion scheint sich eine Art Ersatzhandlung in Form von stereotypen Mustern wie Jumping und Grooming (Putzverhalten) zu entwickeln.

Diese Ergebnisse in den Verhaltensuntersuchungen korrelieren mit den Ergebnissen der morphologischen Untersuchung. Die TMT-induzierte Reaktion wurde von Schneider mittels gesteigerter c-FOS Aktivität morphologisch nachgewiesen. In den Regionen OB, OT und mediodorsalem Thalamus (MD) konnten signifikante Unterschiede ausgemacht werden, folglich im Bereich der Geruchsbahn. Schneider folgerte aus den Ergebnissen, dass es durch ein PRG1 Defizit zu einem LPA Überschuss im synaptischen Spalt komme und damit zu einer überschießenden Reaktion an glutamatergen Synapsen (Schneider 2016).

### 3.3.2 Lysophosphatidic acid und seine Rezeptoren

Lysophosphatidic acid (LPA) ist ein extrazelluläres Signal-Molekül (Hooks et al. 2001). Es aktiviert durch eine Bindung an LPA-Rezeptoren G-Protein gekoppelt verschiedene Signalkaskaden (Choi et al. 2010).

Der Level an LPA im synaptischen Spalt wird durch mehrere Mechanismen reguliert. Durch Autotaxin (ATX), einer ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-2 = lysophospholipase D wird extrazellulär aus dem Grundbaustein Lysophosphatidylcholin (LPC) LPA gebildet (**Abb. 8**) (van Meeteren und Moolenaar 2007; Ohuchi et al. 2008; Thalman et al. 2019). Eine weitere Konzentrations-Steigerung ist durch die Phospholipase A2 (PLA2) möglich, die durch entzündliche Reaktionen getriggert wird (Fourcade et al. 1995). Ein regulierender Abbau erfolgt, indem es zu Mono-Acyl-Glycerol (MAG) über die Membranproteine LPP dephosphoryliert wird (van Meeteren und Moolenaar 2007).



**Abb. 8** Darstellung der Regulierungsmöglichkeiten der Lysophosphatidic acid (LPA) Konzentration im synaptischen Spalt zum einen durch Autotaxin (ATX), einer ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-2 (NPP2), die den Grundbaustein Lysophosphatidylcholin (LPC) zu LPA umwandelt und durch den Abbau des LPA zu Mono-Acyl-Glycerol (MAG) über das Membranproteine Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP) (Trimbuch 2009)

Für LPA sind momentan sechs verschiedene Rezeptortypen (LPA1-6R) bekannt (Fukushima und Chun 2001; Ohuchi et al. 2008; Choi et al. 2010). Dabei zeigen LPA3-6R keinen

neuronalen Bezug. Sie sind unter anderem in Prozesse der malignen Tumorentstehung in Harnblase und Uterus, der Thrombozytenfunktion sowie regulierend an der Blutgefäßbildung beteiligt (Choi et al. 2010). Die neuronalen LPA-Rezeptoren 1 und 2 sind in der Präsynapse lokalisiert (Trimbuch et al. 2009). Die LPA1R und LPA2R spielen eine wichtige Rolle in dem Entwicklungsprozess des ZNS und in der Myelinisierung durch Schwannzellen (van Meeteren und Moolenaar 2007; Chun et al. 2010). LPA2R hat neben der synaptischen Funktion und neuronalen Genese zusätzlich eine Mitbeteiligung an dem Pathomechanismus des Asthma bronchiale und der Karzinom-Entstehung (Chun et al. 2010). LPA2R wird des Weiteren in der Niere, dem Uterus und Hoden, Magen, Milz und Thymus exprimiert (Choi et al. 2010).

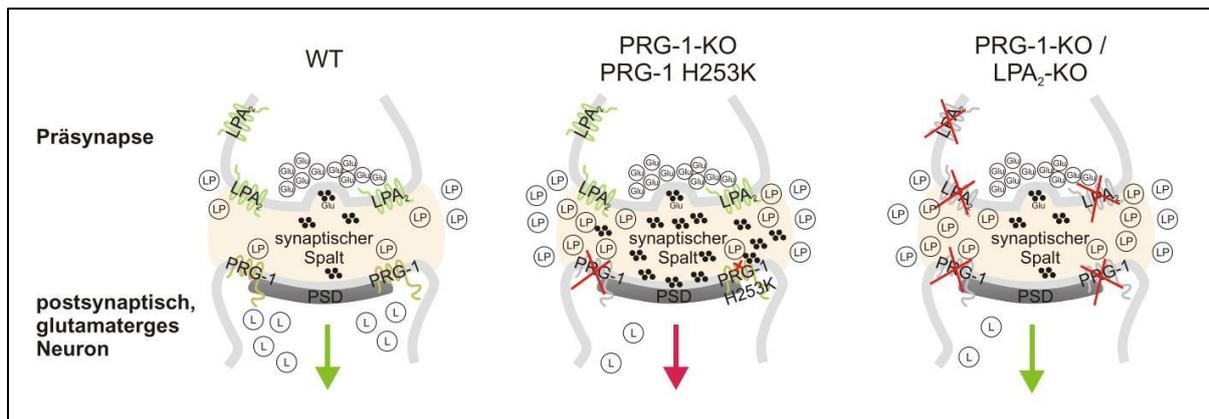
LPA-Rezeptoren können an unterschiedliche G-Proteine ( $G_q$ ,  $G_i$ ,  $G_s$  und  $G_{12/13}$ ) gekoppelt sein, wodurch sich die Vielfalt an aktivierten Signalkaskaden ergibt (Mills und Moolenaar 2003). LPA2R kann mit  $G_q$ ,  $G_i$  und  $G_{12/13}$  gekoppelt sein. Über die  $G_q$  Aktivierung kommt es zur  $Ca^{2+}$  Mobilisierung und Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (van Corven et al. 1989; Choi und Chun 2013).

Eine Deletion des LPA2R in der Präsynapse glutamaterger Verbindungen führt bei einer Exposition mit LPA nicht zu einer Zunahme der Exzitation, sodass eine kontrollierende Funktion des bioaktiven Lipids in der glutamatergen Transmission über LPA2R angenommen werden kann (Trimbuch et al. 2009).

### 3.3.3 Beeinflussung der Exzitation durch PRG1 und LPA2R

Es besteht über LPA ein Zusammenspiel zwischen PRG1 und LPA2R an der glutamatergen Synapse mit Auswirkung auf die Exzitation (siehe **Abb. 9**).

Durch die Interaktion von PRG1 an der Postsynapse mit LPA im synaptische Spalt wird die Signaltransduktion mittels LPA am LPA2R an der Präsynapse beeinflusst und somit die Exzitation modifiziert (Trimbuch et al. 2009; Petzold et al. 2015; Liu et al. 2016).



**Abb. 9** Schematische Darstellung der Exzitations-Modellierung durch Plasticity Related Gene-1 (PRG1) an der glutamatergen Postsynapse (PSD) mittels Beeinflussung der Lipidphosphat (LP)-Konzentration im synaptischen Spalt. Die linke Synapse stellt die physiologische Situation dar. Die mittlere einen PRG1 Knockout, wodurch die regulatorische Funktion aufgehoben wird und es zur erhöhten EPSP Antwort kommt und die rechte Synapse ein PRG1 und ein LPA2 Rezeptor (LPA2R) Doppelknockout, wodurch die präsynaptisch LPA2R vermittelte Signaltransduktion zusätzlich ausgeschaltet wird und somit der PRG1 Knockout keine Beeinflussung der Transmission mehr zeigt (Trimbuch et al. 2009)

Wie oben beschrieben kommt es durch einen Knockout von PRG1 zur Übererregbarkeit mit einem auffälligen senso-motorischen Phänotyp. Dieser zeigt eine exzitatorische Hyperaktivität verbunden mit einer Neigung zu konvulsiven Anfällen in juvenilem Alter und bei adulten Tieren eine gesteigerte motorische Aktivität bei gestörter Sensorik und Feinmotorik. Weiter findet sich ein geringeres Angst- und Furchtverhalten (Trimbuch et al. 2009; Unichenko et al. 2016; Schneider et al. 2018). Durch einen PRG1 Knockout kommt es zur Anreicherung von LPA im synaptischen Spalt und einer erhöhten Bindungswahrscheinlichkeit an den LPA2R, wodurch eine präsynaptische Glutamatfreisetzung getriggert wird. Dahingegen konnten bei rein LPA2R defizienten Mäusen keine phänotypischen oder morphologischen Veränderungen beobachtet werden (Contos et al. 2002).

Werden nun beide Knockouts kombiniert (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>) wird die Wirkung von PRG1 teilweise aufgehoben. Dies konnte für die exzitatorische Hyperaktivität und Anfallsneigung juveniler Mäuse gezeigt werden (Trimbuch et al. 2009).

Dieses Zusammenspiel von PRG1 und LPA2R über das bioaktive Lipid LPA wurde bereits durch ein Doppelknockout beider Moleküle untersucht. Der pathologische Phänotyp der PRG1 defizienten Maus konnte durch eine Kombination mit den phänotypisch unauffälligen LPA2R

defizienten Mäusen aufgehoben werden (Contos et al. 2002). Diese Doppelknockout Tiere entwickelten sich normal und zeigten keine konvulsiven Anfälle mehr. In elektrophysiologischen Untersuchungen zeigten die Messungen signifikant niedrigere exzitatorischen postsynaptischen Strom in den Doppelknockout Tieren im Vergleich zu den Wildtypen (Trimbuch et al. 2009).

### 3.4 TMT

Die Abkürzung TMT steht für 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, ein synthetisch hergestelltes Molekül, das mit dem Stressor des Fuchskot-Duftstoffes identisch ist. Dadurch liegt ein natürlicher Stressor vor (Figueiredo et al. 2003; Janitzky et al. 2009), wie er im natürlichen Habitat vorzufinden ist, kann aber synthetisch hergestellt und somit der Voraussetzung der Reproduzierbarkeit experimentellen Arbeitens gerecht werden.

TMT ist ein Sulfur enthaltendes Molekül. Sulfur ist ein Element, das die angstinduzierende Wirkung im Urin und Kot von Fuchs und Katze ausmacht. Es ist ein Verdauungsmetabolit fleischfressender Tiere (Brechbuhl et al. 2013). Ursprünglich wurde der Duftstoff bereits in den 1980er Jahren von Vernet-Maury aus Fuchskot isoliert (Vernet-Maury et al. 1984) und immer wieder für Verhaltensversuche verwendet, sodass eine relativ große Datenbasis bezüglich dieses Modelles vorliegt (Rosen et al. 2015).

Der Duftstoff hat auf die gesamte Familie der Nagetiere eine das Verhalten beeinflussende Wirkung (Morrow et al. 2000). Er löst eine angeborene Reaktion hervor, auch wenn die Tiere nie zuvor in Kontakt mit einem Fuchs gekommen sind (Morrow et al. 2000; Janitzky et al. 2009). Der Duftstoff TMT ist somit ein natürlich vorkommender Stressfaktor, welcher sich auf Geruchs-naive Labormäuse anwenden lässt. Durch die Verwendung eines Duftstoffes, wird eine Furchtreaktion über das olfaktorische System ausgelöst, ohne z.B. einen Schmerzreiz, wie er bei einer Stromstoßapplikation hervorgerufen wird. Es wird durch die Stimulierung einer einzelnen sensorischen Qualität eine Reaktion hervorgerufen und die Vernetzung zwischen Ursache und Wirkung auf ein Minimum reduziert (Rosen et al. 2015). Der TMT-Versuch ist mit anderen Furchtmodellen vergleichbar, dabei sehr gut reproduzierbar und zeigt keine nozizeptive Wirkung (Ayers et al. 2013; Rosen et al. 2015), generiert aber ein gleiches Level an furcht-induziertem Verhalten (Morrow et al. 2000; Wallace und Rosen 2001).

Furcht ist ein funktionales Verhalten, eine Reaktion auf eine gefährliche Situation (Rosen und Schulkin 1998). Exponiert man Nagetiere dem TMT-Duftstoff wird dieses Verhalten hervorgerufen (Day et al. 2004; Janitzky et al. 2009). Es ist ein angeborenes, nicht konditioniertes

Verhalten. Auch wenn die Tiere über Generationen nicht mit diesem Duftstoff in Berührung gekommen sind, zeigen sie ein furchtspezifisches Verhalten (Janitzky et al. 2009). Das furchtspezifische Verhalten zeigt sich in einem spezifischen Verhaltensmuster, dem sogenannten Freezing (Day et al. 2004; Takahashi et al. 2005; Buron et al. 2007; Fendt und Endres 2008; Endres und Fendt 2009). Die Tiere verharren in einer starren Position mit einer möglichst verkleinerten Oberfläche, um dem feindlichen Tier nicht aufzufallen. TMT induziert dieses Verhalten (Wallace und Rosen 2000; Day et al. 2004) und reduziert zugleich das nicht defensive Verhalten wie Grooming, Running oder Rearing (Janitzky et al. 2009).

### 3.5 Immediate early gene c-Fos

Die Exposition mit TMT führt auch zu einer Aktivierung von c-Fos in den Hirnregionen, die an der Verarbeitung des Reizes beteiligt sind und stellt somit ein morphologisches Korrelat für die Aktivierung von Neuronen in Folge der TMT-Exposition dar (Sallaz und Jourdan 1996; Funk und Amir 2000; Janitzky et al. 2009). Das Molekül c-Fos ist ein induzierbarer Transkriptionsfaktor, der als Marker für neuronale Aktivität fungieren kann (Bullitt 1990; Herrera und Robertson 1996; Janitzky et al. 2009). Unmittelbar nach der elektrischen Aktivierung einer Nervenzelle kommt es zu einer deutlichen Induktion der Expression von c-Fos mRNA innerhalb weniger Minuten, die Höchstkonzentration der mRNA wird nach ca. 30-45 Minuten erreicht (Müller et al. 1984; Sheng und Greenberg 1990). Die Halbwertszeit der c-Fos mRNA beträgt lediglich 15 Minuten, sodass eine genaue zeitliche Abstimmung in diesem Verfahren notwendig ist (Müller et al. 1984). Zur Darstellung aktivierter Nervenzellen eignet sich die mRNA und das Protein von c-Fos (Dragunow und Faull 1989). Der Vorteil des Proteins ist die deutlich längere Halbwertszeit. Die Menge des c-Fos geht erst nach ca. 24 h auf ihren Ausgangswert zurück (Dragunow und Faull 1989).

Es gab bereits mehrere Studien, die mittels induzierter c-Fos mRNA die Aktivität des olfaktorischen System darstellen (Sallaz und Jourdan 1996; Funk und Amir 2000). Auch bei der Exposition mit TMT konnte eine Aktivierung des c-Fos generiert werden (Day et al. 2004; Janitzky et al. 2009). Ein TMT-vermittelter Anstieg von c-Fos konnte im Bulbus olfactorius, Nucleus accumbens, lateralem Septum, BNST, Amygdala, Locus coeruleus, paraventriculäre hypothalamische Kerne, praeoptische Kerngebiete, Kerne des Solitary Tract und parabrachialen Kern dargestellt werden (Day et al. 2004; Fendt et al. 2005; Janitzky et al. 2009). Der Nachweis von c-Fos stellt somit morphologisch die Aktivierung von Neuronen infolge der TMT-Exposition dar (Sallaz und Jourdan 1996; Funk und Amir 2000; Janitzky et al. 2009). Zur Quantifizierung des c-Fos Proteins diente in dieser Arbeit die Avidin-Biotin-Methode (siehe 12.3.2). Um eine ausreichende und aussagekräftige c-Fos Antwort zu erhalten wurden in der vorliegenden Arbeit

die Versuchstiere exakt 120 min nach der TMT-Exposition anästhesiert und perfundiert (Dragunow und Faull 1989; Vosatka et al. 1989).

### 3.6 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit ist es, die schon beschriebenen Änderungen im Angst- und Furchtverhalten und der c-Fos Induktion bei PRG1 defizienten Tieren durch einen gleichzeitigen Knockout von PRG1 und des Rezeptors LPA2R neu zu analysieren. Erwartet wird ein Rescue der bei PRG1 defizienten Tieren beobachteten Veränderungen. Dies beruht auf der Hypothese, dass das postsynaptische PRG1 die präsynaptische Glutamatfreisetzung modulieren kann. Diese Modulationsfähigkeit wirkt sich, wie oben detailliert beschrieben, über das bioaktive Lipid LPA im synaptischen Spalt aus, welches am LPA2R an der Präsynapse unter anderem eine  $Ca^{2+}$  Ausschüttung und eine nachfolgende Glutamatfreisetzung in den synaptischen Spalt induziert. Ein einfacher Knockout von PRG1 führt zu einer Übererregbarkeit an glutamatergen Synapsen und Verhaltensauffälligkeiten, die mit einem morphologischen Korrelat einhergehen. PRG1 defiziente Mäuse neigen in der frühen Entwicklung zu konvulsiven Anfällen, zeigen einen motorisch auffälligen Phänotyp und reagieren mit reduziertem Freezing Verhalten auf den Stressor TMT (Trimbuch et al. 2009; Schneider 2016). Diese Übererregbarkeit durch eine Anreicherung von LPA im synaptischen Spalt soll mittels eines weiteren Knockouts des LPA2R an der Präsynapse aufgehoben werden (Trimbuch et al. 2009). Es wurde bereits bei diesen Doppelknockout Tieren ( $PRG1^{-/-}LPA2R^{-/-}$ ) elektrophysiologisch eine Normalisierung der EPSCs im Vergleich zu den Wildtypen nachgewiesen sowie eine Verringerung von konvulsiven Anfällen beobachtet (Trimbuch et al. 2009). In dieser Arbeit soll nun mittels einer Aktivierung des glutamatergen Systems ein Rescue im Verhalten und in der Morphologie der  $PRG1^{-/-}LPA2R^{-/-}$  Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtypen untersucht werden.

Zur Untersuchung des Verhaltens wurden drei Tests ausgewählt, die unterschiedliche Stressoren für Angst und Furcht benutzen. Ein Modell zum Ermitteln des Angstverhaltens ist das Elevated Plus-Maze. Ergänzend wird die Angst mittels des Modells der sozialen Interaktion analysiert. Das Furchtverhalten wird mit der Exposition des Duftstoffs TMT untersucht, verbunden mit der Quantifizierung der Neurone welche c-Fos aktiviert haben.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere werden uns von der Arbeitsgruppe Nitsch und Vogt aus Mainz (Institut für Mikroskopische Anatomie und Neurobiologie der Universität Mainz) bereitgestellt. Hier findet auch die Genotypisierung der Mäuse statt.

Die Beschreibung der Erzeugung des PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Doppel-Knockout Modells erfolgt durch Trimbuch et al. (2009). Für die Verhaltensversuche und die morphologische Auswertung werden ausschließlich weibliche Mäuse verwendet. Für Verhaltensuntersuchungen mit TMT-Exposition ist bekannt, dass weibliche Mäuse signifikant empfindlicher auf TMT reagieren und somit für diese Untersuchungen sehr gut geeignet sind (Takahashi et al. 2005; Buron et al. 2007). Dabei gibt es keinen Einfluss des Östrogenzyklus (Buron et al. 2007).

Die Doppel-Knockout Mäuse (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>) werden mit ihren Wildtypen (PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>) verglichen. Die Anzahl der untersuchten Tiere sind jeweils bei den Verhaltensmodellen einzeln aufgeführt. Zur Berücksichtigung der exogenen Faktoren, die Einfluss auf Tierversuche haben können, werden die Tiere in durchsichtigen Standard-Käfigen (Makrolon Typ 2) gehalten mit einem Hell- Dunkelregime über je 12 Stunden und freiem Zugang zu Futter und Wasser ad libitum. Alle Verhaltensuntersuchungen finden während des Tages zur gleichen Uhrzeit, im Hell-Intervall statt. Die Reihenfolge der Tiere wurde in Abhängigkeit von Alter und Gewicht per Zufall ausgelost. Zur individuellen Erkennung der einzelnen Tiere wird eine Lochmarkierung der Ohren verwendet (Hedrich und Bullock 2004). Alle Verhaltensbeobachtungen finden zwischen 10:00 und 15:00 Uhr im Tages-Intervall statt.

Eine Genehmigung zur Durchführung der Experimente liegt vor (Aktenzeichen: Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt 42502-2-1114).

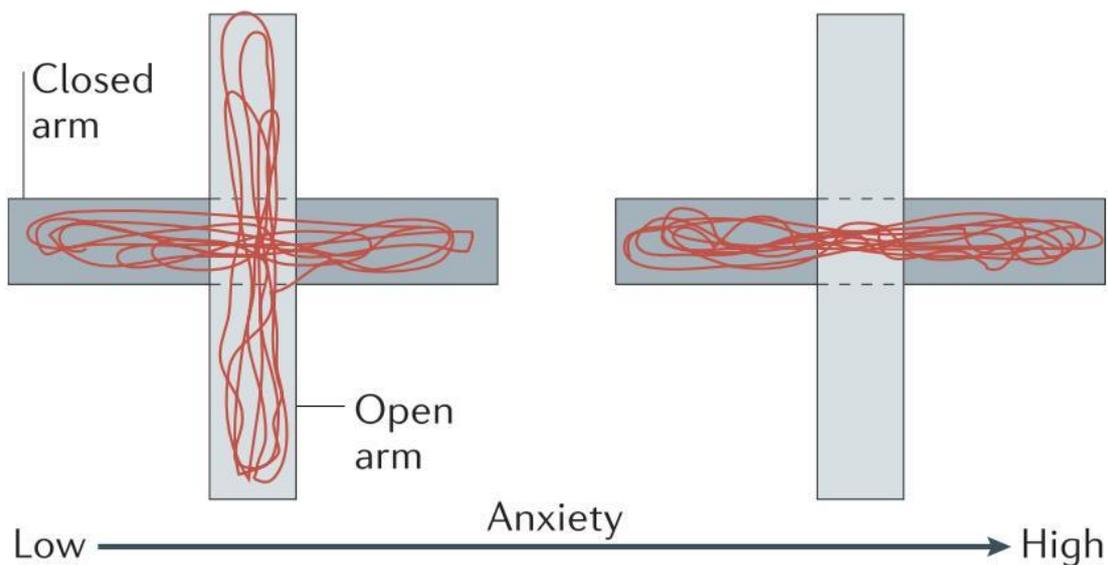
### 4.2 Verhaltensversuche

Es werden drei unterschiedliche Verhaltensversuche ausgewählt, die auf unterschiedliche Weise das emotionale Verhalten der Tiere untersuchen. Wie in der Einleitung erwähnt, sollte unter den Begriffen Angst und Furcht differenziert werden. Es müssen die Furcht, Reaktion auf einen speziellen Stimulus, und die Angst, ein Verhalten auf einen nicht klar definierten Reiz, getrennt betrachtet werden. Die drei Verhaltensversuche sollen auf beide Formen der Angst eingehen. Die Angst, die durch das Elevated Plus-Maze (EPM) in Form der Höhenangst (Pellow 1985; Lister 1987; Espejo 1997) und durch die soziale Interaktion (Bailey und Crawley

2009) objektiviert wird und einer TMT-Exposition, die den Aspekt der Furcht quantifizieren kann.

#### 4.2.1 Elevated Plus-Maze

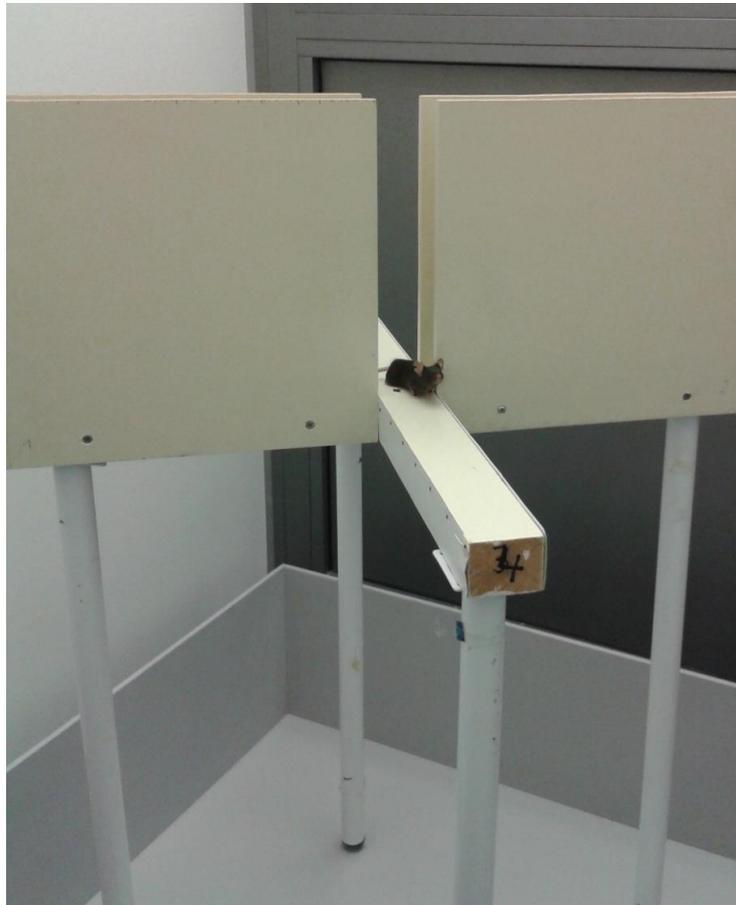
Das Elevated Plus-Maze (EPM) ist ein Tiermodell, an dem Angstverhalten von Nagetieren objektiviert werden kann (Pellow 1985; Lister 1987; Espejo 1997). Die Tiere verbringen signifikant mehr Zeit auf den geschlossenen Armen des Modells, als auf den offenen. Diese Aufenthaltswahrscheinlichkeiten sind das Korrelat für die Angst in dem EPM (siehe **Abb. 10**) (Pellow 1985). Auch in einem der ersten Versuche mit angstauslösenden Substanzen, wie z.B. Koffein, konnte eine deutlich erhöhte Aufenthaltszeit auf den offenen Armen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne verabreichte Substanz gezeigt werden (Lister 1987).



**Abb. 10** Schematische Abbildung zur Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit in den offenen oder geschlossenen Armen in Bezug auf das Maß an Angst (Tovote et al. 2015)

Das EPM besteht aus zwei je sich gegenüberliegenden offenen und geschlossenen Armen (jeweils 5 x 30cm) mit 40cm hohen Wänden an den geschlossenen Armen und einem Zentrum (5 x 5cm) (siehe **Abb. 11**). Das aus weiß gestrichenem Holz bestehende Labyrinth steht auf Tischbeinen 75cm über dem Boden. Die Mäuse werden zu Beginn mit der Nase immer zur gleichen Richtung zeigend (offener Arm) in das Zentrum gesetzt und ab dann für 10 min mit einer Videokamera ohne weitere Einflüsse von außen aufgenommen. Die Videos werden mit einem hauseigenen entwickelten Programm (DOS-BS, C. Kurtz) ausgewertet, wobei die

Anzahl und die Zeit auf den verschiedenen Armen und dem Zentrum dokumentiert werden. Nach jedem Versuchstier wird das maze gründlich gereinigt. Es werden insgesamt 20 Tiere, 10 von jeder Gruppe (PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> und PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>) getestet.



**Abb. 11** Elevated Plus-Maze mit einer Maus im Zentrum

#### 4.2.2 Soziale Interaktion

Auch das Tiermodell der sozialen Interaktion ist eine Darstellung des natürlichen, angeborenen Angstverhaltens von Nagetieren (Bailey und Crawley 2009). Die Tiere werden paarweise in eine offene, schattenfrei und gleichmäßig mit Neonlicht (250lx) beleuchtete Plastikbox (B/T/H: 85 x 85 x 30cm) in sich zwei gegenüberliegende Ecken gesetzt. Es werden pseudo-randomisiert immer zwei Mäuse zusammengesetzt, die nie zuvor Kontakt zueinander hatten, aber den gleichen Genotyp aufweisen (PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> oder PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>). Dabei wird jedes Tier nur einmal in diesem Test untersucht. Über einen Zeitraum von 10 min werden die Tiere beobachtet, das Verhalten aufgezeichnet (Panasonic CCTV Camera; Mod. WV-BL200/6 und Panasonic SD430 Videorekorder) und automatisch mit Hilfe einer Software (Videomot 2; TSE, Homburg, Germany) die Anzahl und Dauer der Kontakte ausgewertet. Es werden insgesamt 16 Tierpaare getestet (PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> n=7 Paare; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> n=9 Paare).

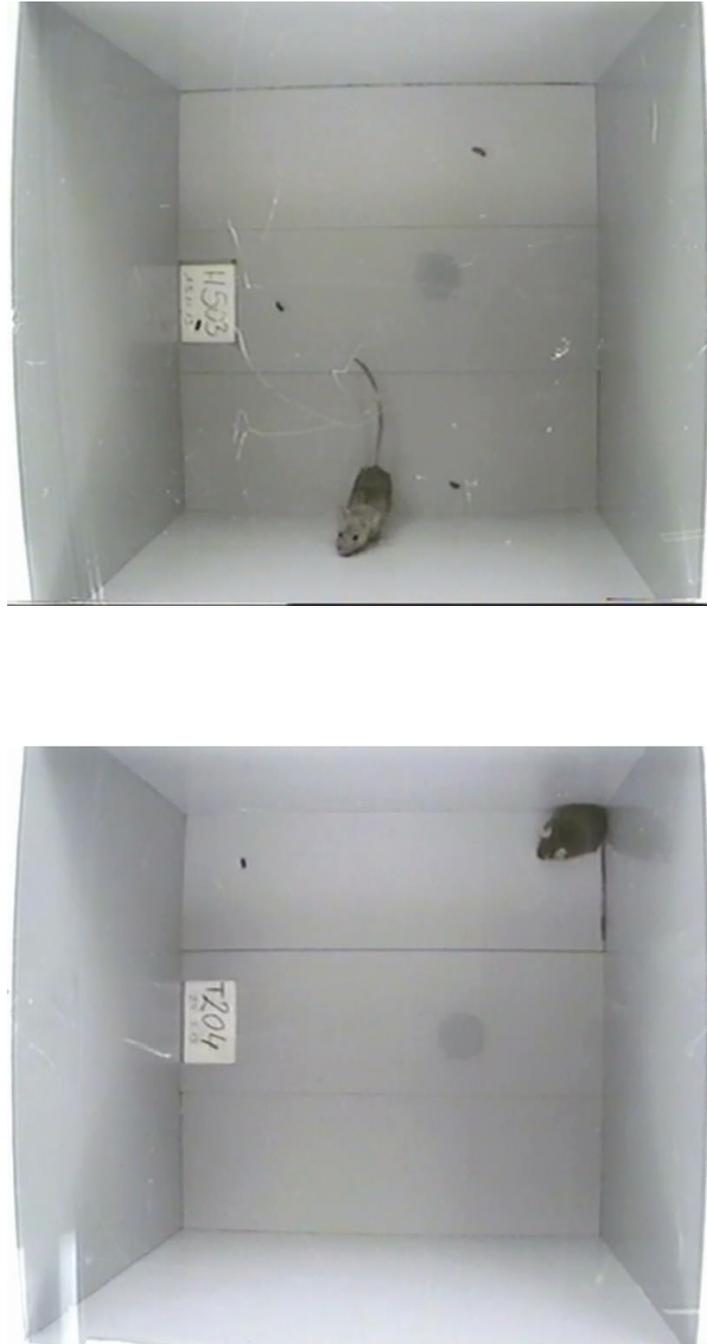
### 4.2.3 TMT-induziertes Furchtverhalten

Die angeborene Furcht vor einem spezifischen Stimulus (Rosen et al. 2015) kann mithilfe einer TMT-Exposition der Nagetiere hervorgerufen werden, wodurch das olfaktorische System sowie die Furchtverarbeitung untersucht werden können.

Der Versuchsaufbau ist im Detail beschrieben bei Janitzky et al. (Janitzky et al. 2009). Hier eine kurze Darstellung des Ablaufs:

Der Versuch findet an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zur gleichen Uhrzeit, jeweils während der Hell-Phase des Tag-Nacht-Rhythmus der Versuchstiere statt. Die Untersuchungsbox (B/T/H: 45 x 45 x 45cm) befindet sich unter einer Abzugshaube mit einer gleichmäßigen Ausleuchtung. Im Boden der Box ist eine Schiebekonstruktion eingebaut mit einer Vertiefung (B/T: 3 x 5cm), in die ein Filterpapier außerhalb der Box passgenau mit einer Pinzette gelegt und mit Hilfe des Schiebers zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns in die Box geschoben werden kann. Das Papier wird zuvor, ohne jeglichen Hautkontakt, mit einem geruchsneutralen Bleistift mit der Tiernummer und dem Datum beschriftet sowie H für Habituation (siehe **Abb. 12**) oder T für Test/Exposition (siehe **Abb. 13**). Auf der Box befindet sich eine Plexiglas-Scheibe und oberhalb der Konstruktion eine Videokamera (Sony Cam 2100, Color CCD Camera DSP Digital CCD Camera) zur Aufzeichnung der 15minütigen Versuche.

Die Tiere befinden sich vor dem Versuch außerhalb des Untersuchungsraumes und werden erst kurz vor Beginn hereingebracht, sodass keine Beeinträchtigung des Verhaltens unter den Tieren stattfinden kann. Am ersten Tag (Habituation) sollen sich die Tiere zunächst nur über 15 min an die Box gewöhnen, auf das Filterpapier werden 35µl destilliertes Wasser pipettiert. Die Untersuchungsbox wird nach jedem Tier mit einem Desinfektionsmittel gereinigt (Incidin, Firma Ecolab). Am darauffolgenden Tag (Exposition) werden die Tiere unter den gleichen Voraussetzungen TMT ausgesetzt. Es werden 35µl des Duftstoffes (Fendt und Endres 2008) auf das Papier gegeben und das Versuchstier in die Box gesetzt. Dabei wird der Kopf in die entgegengesetzte Richtung zum Filterpapier gehalten und dann der Schieber mit dem Filterpapier mit TMT in die Box geschoben. Ab diesem Zeitpunkt beginnt die Aufzeichnung des Verhaltens über 15 min mit anschließender Auswertung.



**Abb. 13** TMT-Box mit einem Versuchstier während der Exposition (T204) mit TMT zum Zeitpunkt einer „Freezing“ Reaktion

Das Videomaterial wird mittels eines selbst geschriebenen Programms (DOS-BS, C. Kurtz) ausgewertet. Dabei werden zehn vorher definierte Verhalten manuell ausgewertet. Die Verhaltensmuster sind in der untenstehenden Tabelle (**Tab. 1**) aufgezeigt. Insgesamt werden 20 Tiere getestet, jeweils 10 PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> und PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tiere.

Verhalten	Definition	Zeit [s]	Anzahl
-----------	------------	----------	--------

Running	Laufen oder Rennen ohne Unterbrechung	✓	✓
Sniffing	Schnüffeln: es wird so lang als Schnüffeln interpretiert, solange die vibrierende Bewegung der Schnauze beobachtbar ist	✓	✓
Inactivity	Sitzen des Versuchstieres ohne Schnüffelbewegung, aber zum Beispiel Bewegung des Kopfes, Wendung der Blickrichtung	✓	✓
Freezing	Angststarre des Tieres; eingezogener Kopf; körpernaher, angelegter Schwanz; bewegungsloses Verharren in einer Position mindestens 2 Sekunden ( <b>Abb. 13</b> )	✓	✓
Rearing	Sich Aufstellen in der Box ohne Berührung der Wand	✓	✓
Leaning	Hochlehnen an der Wand ( <b>Abb. 12</b> )	✓	✓
Grooming	Putzverhalten	✓	✓
Jumping	Springen	✓	✓
TMT-Fear	Laufrichtung zum Filterpapier hin, Schnüffelbewegung und darauffolgender abrupter Richtungswechsel		✓
Rampage	Herausziehen des Filterpapiers aus der Vertiefung		✓

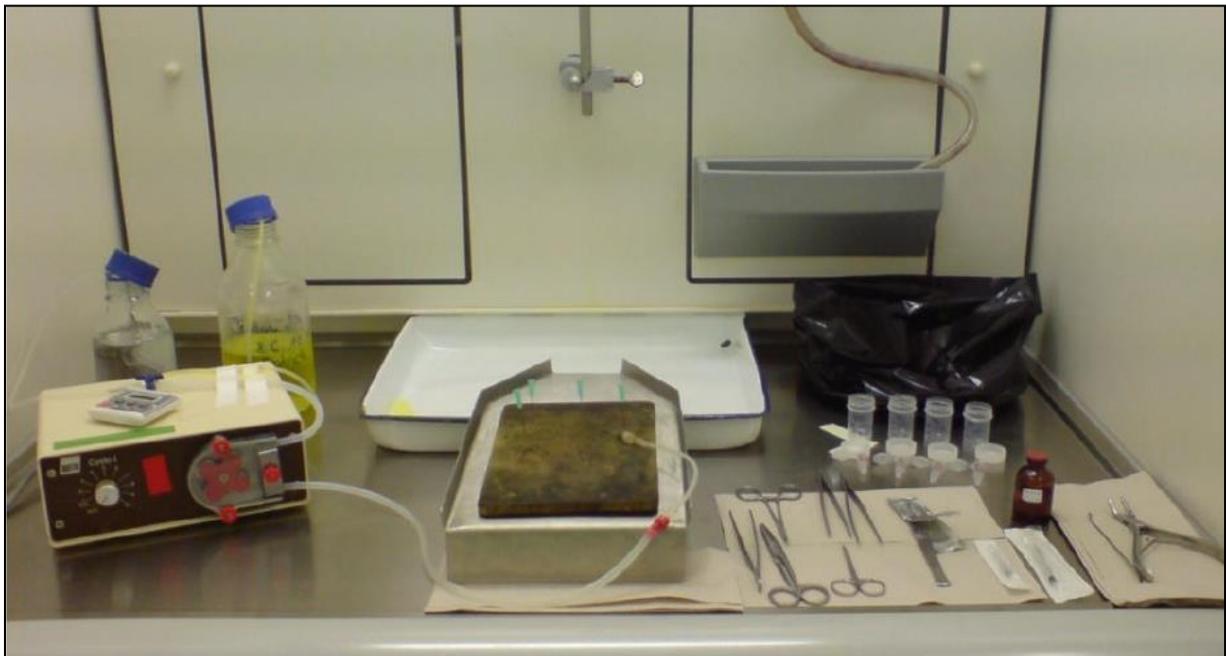
**Tab. 1** Auflistung und Beschreibung des untersuchten Verhaltens im TMT-Versuch

### 4.3 Perfusion der Tiere und Präparation der Gehirne

Das Präparationsverfahren ist wie in der Dissertation von Schneider beschrieben (Schneider 2016). Die verwendeten Geräte und Instrument sind in **Abb. 14** abgebildet.

Exakt 120 min nach dem Ende der TMT-Exposition werden die Tiere mit 0,15ml 6% Nembutal (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) intraperitoneal tief narkotisiert. Nach dem Erlöschen aller Schmerzreaktionen werden die Tiere auf einer Unterlage an allen vier Extremitäten fixiert. Das Herz der Tiere wird zur Perfusion freipräpariert. Durch einen Zugang durch den Bauchraum wird zunächst das Zwerchfell durchtrennt und der knöcherne Thorax durch laterale Durchtrennung der Rippen nach kranial geklappt, sodass eine freie Sicht auf das Herz entsteht. Das Perikard wird durchtrennt und die Perfusionsnadel in den linken Ventrikel eingeführt. Das Gefäßsystem wird über diese Nadel zunächst mit ca. 20ml 0,9% NaCl für

zwei Minuten gespült. Zur Austrittsmöglichkeit der Flüssigkeiten aus dem Gefäßsystem wird das rechte Atrium eingeschnitten. Anschließend erfolgt die Fixierung über eine 12minütige Spülung mit einer Lösung (ca. 100-120ml), die sich aus 4%igem Paraformaldehyd, 15% gesättigter Pikrinsäurelösung in 0,1molarem Phosphatpuffer mit pH7,4 (Pumpe Cyclo 1, Roth, Karlsruhe, Deutschland) zusammensetzt. Nach der Perfusion erfolgt die Präparation des kompletten Gehirns aus der Schädelkalotte. Es erfolgt eine Nachfixierung der Gehirne für 2-4h in der oben genannten Fixierlösung. Über Nacht erfolgt eine Aufbewahrung des Präparats in 20%iger Saccharoselösung in 0,1molarer Phosphatpufferbasis, bevor es am nächsten Tag eingefroren und bei -80°C aufbewahrt wird.



**Abb. 14** Präparationsareal: Pumpe, NaCl-Lösung, Fixationslösung, Präparierunterlage, Präparierbesteck (Scheren, Pinzetten, Skalpelle), Probenbehälter, Abfallbehälter (von links nach rechts) (Schneider 2016)

Die Gehirne werden zur weiteren Bearbeitung am Kryostaten (CM 3050 S, Leica, Wetzlar, Deutschland) bei ca. -20°C geschnitten. Das Gehirn wird über den Hirnstamm mittels Tissue Freeze (Jung, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) fixiert und beginnend vom OB frontale Schnitte mit einer Dicke von 40µm bis zu den ersten Anschnitten des Kleinhirns angefertigt. Zur Markierung dient eine Einkerbung der linken Hemisphäre. Es werden insgesamt vier Serien angefertigt. Damit haben die Schnitte in jeder Serie einen Abstand von 160µm. Die erste Serie ist für die nachfolgende Nissl Färbung vorgesehen und die zweite für die c-Fos Immunhistochemie. Die gefrorenen Schnitte werden in 0,1M Phosphatpuffer mit pH 7,4 bei Raumtemperatur aufgefangen und für die Nissl-Färbung sofort sortiert und auf Objektträger aufgezogen.

## 4.4 Färbung

### 4.4.1 Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung wird an aufgezogenen Schnitten durchgeführt als anatomische Übersicht. Diese Schnitte dienen als anatomische Orientierung während der Auswertung der c-Fos immunohistochemisch gefärbten Schnitte. Im Anhang ist das Protokoll unter **13.3.1** aufgelistet.

### 4.4.2 c-Fos Immunhistochemie

Die durch c-Fos quantifizierbare Aktivität der Neurone wird immunhistochemisch dargestellt. Das ausführliche Protokoll ist unter **13.3.2** aufgelistet.

Folgende Antikörper und Detektionssystem wurden verwendet:

- primärer Antikörper (AK): polyklonaler rabbit AK gegen c-Fos (Abcam, Cambridge, United Kingdom), Verdünnung 1:5000
- sekundärer AK: biotinylierter, anti-rabbit AK (Vector Lab, Burlingame, USA) Verdünnung 1:227
- Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (Vector Lab, Burlingame, USA)
- Diaminobenzidin (Sigma, St. Louis, USA) 1:20

### 4.4.3 Quantifizierung

Die Quantifizierung der c-Fos positiven Zellen orientierte sich in der Auswertung an der Arbeit von Schneider, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen PRG1<sup>+/+</sup> vs PRG1<sup>-/-</sup> und PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> vs PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Mäusen zu ermöglichen (Schneider 2016).

Die Objektträger mit den aufgezogenen Hirnschnitten werden verblindet, sodass während des Auswertens der Färbung keine Zuordnung zu den Genotypen stattfinden kann. Die Schnitte werden unter einem Mikroskop (Axio Imager.z2, Zeiss, Jena, Deutschland) und mittels einer Software (Axio Vision 4.8, Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet. Zur Orientierung dient die jeweilige NISSL-Serie passend zu jedem mit c-Fos immungefärbten Schnitt. Als Atlas wird dazu der von Allen, Reference Atlas von Wiley für Mäusegehirne (Dong 2008) verwendet. Die Anzahl der Schnitte pro Region und die exakte Lokalisation dieser wird zuvor anhand des Atlas festgelegt. Die Anzahl pro Region beträgt mindestens sechs und maximal acht Schnitte. Die Schnitte werden in verschiedenen Vergrößerungsstufen fotografiert (Kamera: Aurox Cam MRm, Zeiss, Jena, Deutschland). Mittels einer Software können die c-Fos immungefärbten Neurone auf dem Foto markiert und parallel dazu im Mikroskop, die zu untersuchenden

Neurone, genauer eingeschätzt werden. Gezählt und markiert werden die c-Fos positiven Zellen der linken Hirnhemisphäre.

## 4.5 Statistik

Zur Auswertung wird eine einfache ANOVA mit dem Genotyp als Faktor durchgeführt. Dazu kommen post-hoc Tests zur Anwendung, entweder der student's t-Test oder der Welch-Test und der Kuskal-Wallis Test für die parameterfreien statistischen Tests. Ab einem Wert  $p \leq 0,05$  werden Unterschiede als signifikant eingeschätzt. Eine Tendenz kann ab  $p \leq 0,1$  angenommen werden. In den Abbildungen werden Signifikanzen  $p \leq 0,05$  mit einem (\*),  $p \leq 0,01$  mit zwei (\*\*) und  $p \leq 0,001$  mit drei (\*\*\*) Sternen gekennzeichnet.

Die Bestimmung der Gleichheit der Varianzen erfolgte mit dem Levene-Test.

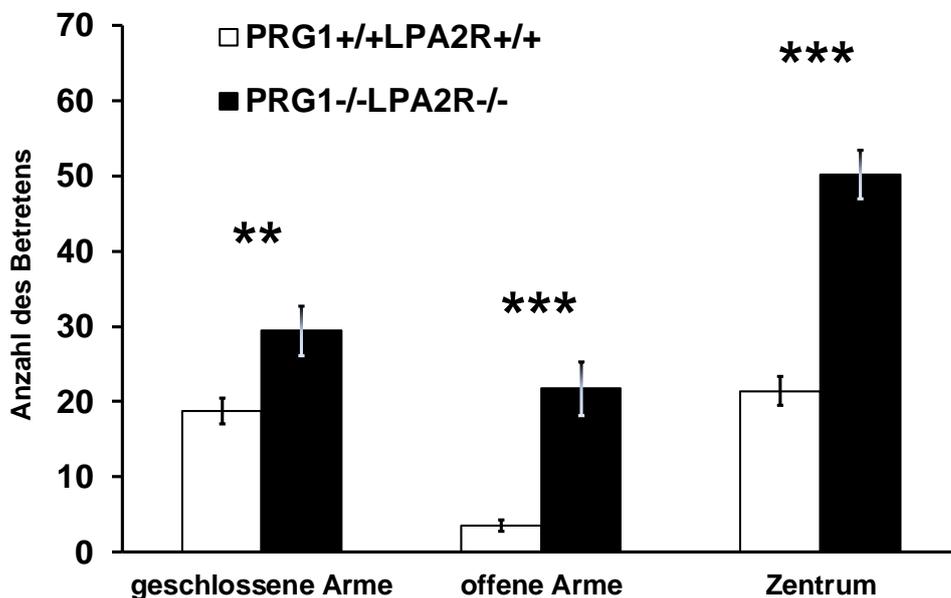
## 5 Ergebnisse

Unabhängig von den durchgeführten Verhaltenstests können während der Käfighaltung keinerlei Unterschied zwischen den Doppelknockout Tieren und ihren Wildtypen beobachtet werden. Es zeigt sich eine normale Aktivität und Interaktion der Tiere, kein Jumping in den Ecken des Käfigs, kein aggressives Randalieren und keine Auffälligkeiten im Fressverhalten. Im Folgenden sind die Ergebnisse im Detail beschrieben.

### 5.1 Verhaltensversuche

#### 5.1.1 Elevated Plus-Maze

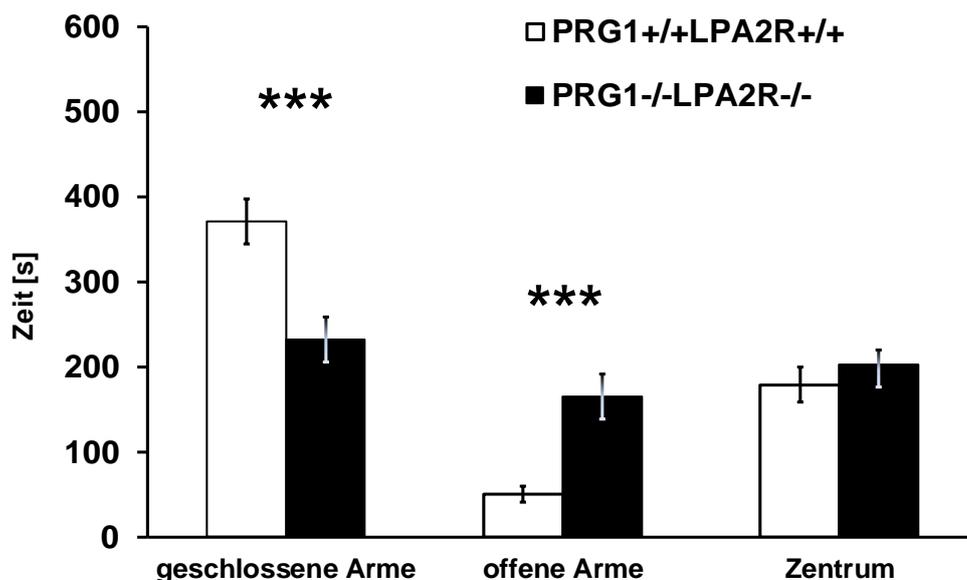
Eine ANOVA mit dem Faktor Genotyp ergibt einen signifikanten Genotypeneffekt in allen untersuchten Parametern (Anzahl des Betretens der Arme, Gesamtverweildauer auf den Armen in [s] und Zeit pro Armaufenthalt in [s]) im EPM.



**Abb. 15** Elevated Plus-Maze: Vergleich der Anzahl des Betretens der offenen und geschlossenen Arme sowie des Zentrums. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> zeigen eine signifikant höhere Frequenz im Betreten aller Bereiche im Vergleich zu den PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>, offene Arme ( $p=0,001$ ), geschlossene Arme ( $p=0,01$ ), Zentrum ( $p=0,000$ ); (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>  $n=10$ ; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>  $n=10$ ; \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  T-test, ANOVA, einfaktoriell)

Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> halten sich signifikant häufiger auf den offenen (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 22±3,6; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 4±0,7; F(1,19)=24,997; p=0,001) und auf den geschlossenen Armen (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 29±3,3; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 19±1,7; F(1,19)=8,253; p=0,01) sowie im Zentrum (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 50±3,3; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 21±2; F(1,19)=57,072; p=0,000) auf (**Abb. 15**), was auf eine gesteigerte Aktivität durch eine höhere Frequenz der Armwechsel im Gegensatz zu den Wildtypen hinweist.

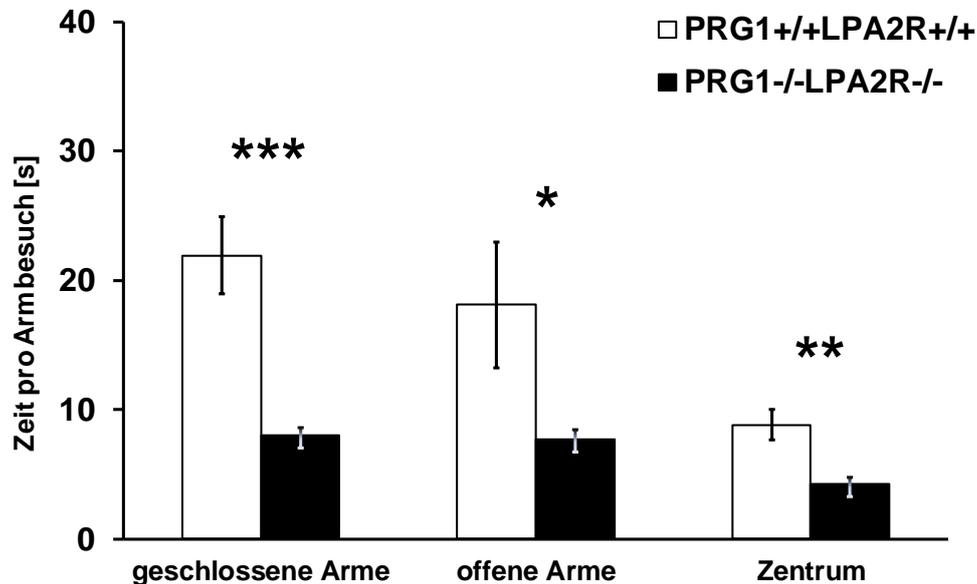
Die Gesamtzeiten auf den beiden Armtypen ergeben ebenfalls signifikante Unterschiede (**Abb. 16**). Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> verbringen im Schnitt mehr als drei Mal so viel Zeit auf den offenen Armen (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 165±27s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 50±9,2s; F(1,19)=16,179; p=0,001) und deutlich weniger auf den geschlossenen (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 232±25,7s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 371±26,4s; F(1,19)=14,112; p=0,001). Im Zentrum zeigt sich kein Unterschied der Verweildauer (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 203±16,8s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 179±20,6s; F(1,19)=0,803; p=0,4).



**Abb. 16** Elevated Plus-Maze: Vergleich der gesamten Verweildauer in [s] auf den offenen und geschlossenen Armen sowie im Zentrum. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> verbringen deutlich längere Zeiten auf den offenen Armen ( $p=0,002$ ), weniger auf den geschlossenen ( $p=0,001$ ) und vergleichbar viel Zeit im Zentrum ( $p=0,381$ ) (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>  $n=10$ ; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>  $n=10$ ; \*\*\*  $p<0,001$  T-test, ANOVA, einfaktoriell)

Im Hinblick auf die Verweildauer pro Armbesuch zeigen sich ebenfalls signifikante Unterschiede, PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> verbringen auf allen Bereichen pro Betreten signifikant mehr Zeit (**Abb. 17**; geschlossene Arme: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 8±0,6s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 22±3s; F(1,19)=20,607; p=0,000, offenen Arme: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 8±0,7s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 18±4,9s;

$F(1,19)=4,436$ ;  $p<0,05$ , Zentrum:  $PRG1^{-/-}LPA2R^{-/-}$   $4\pm0,5s$ ;  $PRG1^{+/+}LPA2R^{+/+}$   $9\pm1,2s$ ;  $F(1,19)=12,229$ ;  $p<0,01$ ). Dies zeigt erneut eine erhöhte Aktivität der  $PRG1^{-/-}LPA2R^{-/-}$  im Vergleich zu ihren Wildtypen.

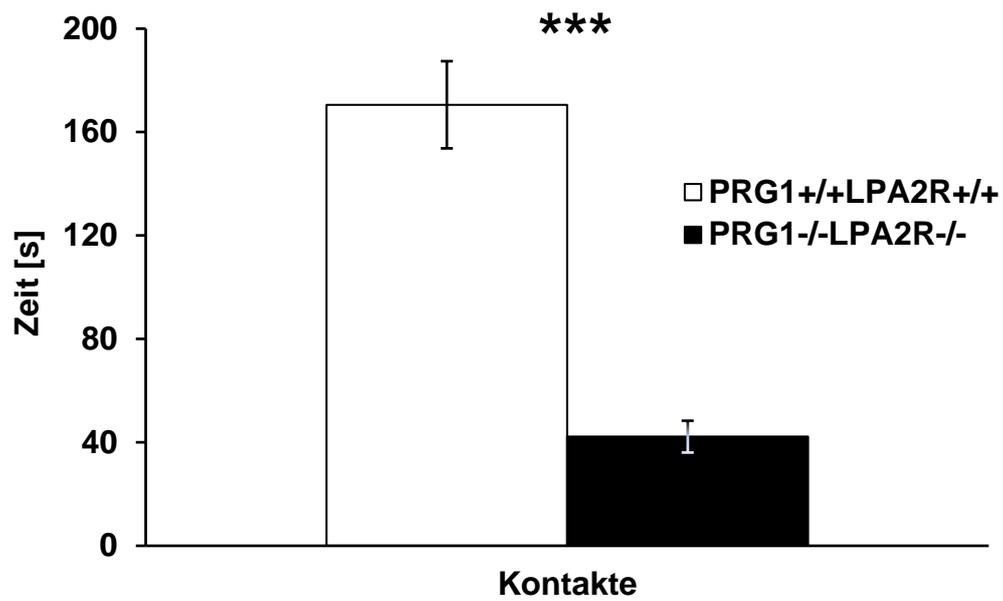


**Abb. 17** Elevated Plus-Maze: Vergleich der Verweildauer pro Armbe such in [s] auf den offenen und geschlossenen Armen sowie im Zentrum. Die  $PRG1^{-/-}LPA2R^{-/-}$  verbringen pro Betreten der offenen ( $p<0,05$ ) und der geschlossenen Arme ( $p=0,000$ ) sowie des Zentrums ( $p<0,01$ ) signifikant weniger Zeit ( $PRG1^{-/-}LPA2R^{-/-}$   $n=10$ ;  $PRG1^{+/+}LPA2R^{+/+}$   $n=10$ ; \*  $p<0,05$  \*\*  $p<0,01$  \*\*\*  $p<0,001$  T-test, ANOVA, einfaktor iell)

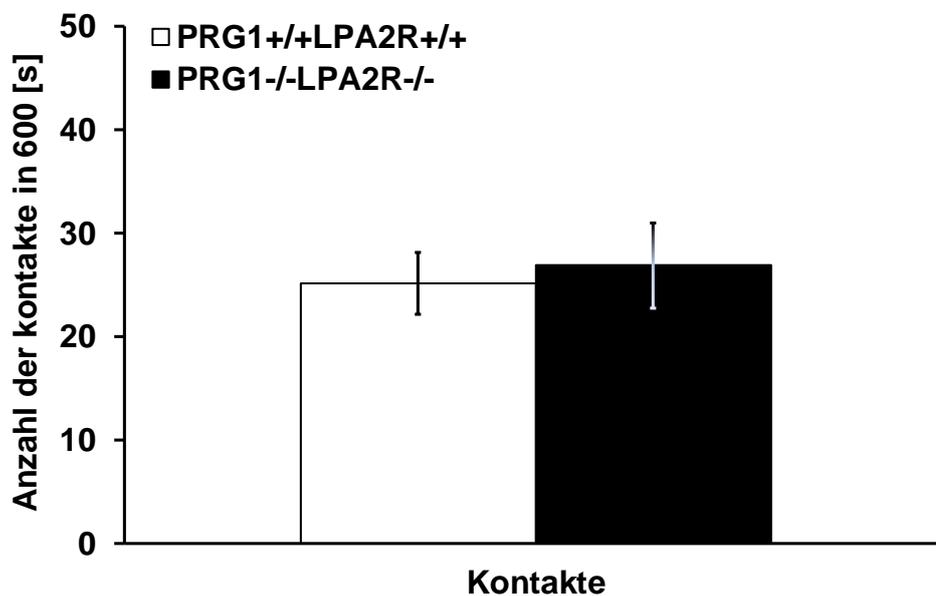
### 5.1.2 Soziale Interaktion

In Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur (File und Seth 2003) erfolgt die Auswertung nicht je Tier, sondern je Paar, da die beiden interagierenden Tiere nicht unabhängig voneinander ausgewertet werden können. Es wurden 9  $PRG1^{-/-}LPA2R^{-/-}$ -Paare ( $n=18$ ) und 7  $PRG1^{+/+}LPA2R^{+/+}$ -Paare ( $n=14$ ) getestet.

In der sozialen Interaktion ergeben sich signifikante Unterschiede in der Gesamtdauer der Kontakte in [s]. Die  $PRG1^{-/-}LPA2R^{-/-}$  Tieren sind signifikant kürzer miteinander in Kontakt (**Abb. 18**;  $PRG1^{-/-}LPA2R^{-/-}$   $42\pm6,1s$ ;  $PRG1^{+/+}LPA2R^{+/+}$   $171\pm16,8s$ ;  $p<0,0001$ ), während sich die Anzahl der Kontakte verglichen zu den Wildtypen nicht unterschiedlich zeigt (**Abb. 19**;  $PRG1^{-/-}LPA2R^{-/-}$   $27\pm4,1$ ;  $PRG1^{+/+}LPA2R^{+/+}$   $25\pm3,0$ ;  $p=0,38$ ). Die Zeit pro Kontakt ergibt ebenfalls eine signifikant kürzere Dauer bei den  $PRG1^{-/-}LPA2R^{-/-}$  Tieren ( $PRG1^{-/-}LPA2R^{-/-}$   $0,9\pm0,13$ ;  $PRG1^{+/+}LPA2R^{+/+}$   $1,6\pm0,36s$ ;  $p<0,05$ ).



**Abb. 18** Soziale Interaktion: Dauer des Kontakts in [s]. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> zeigen einen signifikant kürzeren Kontakt im Vergleich zu den Wildtypen ( $p < 0,0001$ ); (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>  $n=10$ ; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>  $n=10$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  T-test)



**Abb. 19** Soziale Interaktion: Anzahl der Kontakte innerhalb einer Zeitspanne von 600 [s]. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Wildtypen ( $p=0,38$ ) (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>  $n=10$ ; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>  $n=10$ ; T-test)

### 5.1.3 Testung mit TMT

#### 5.1.3.1 Habituation

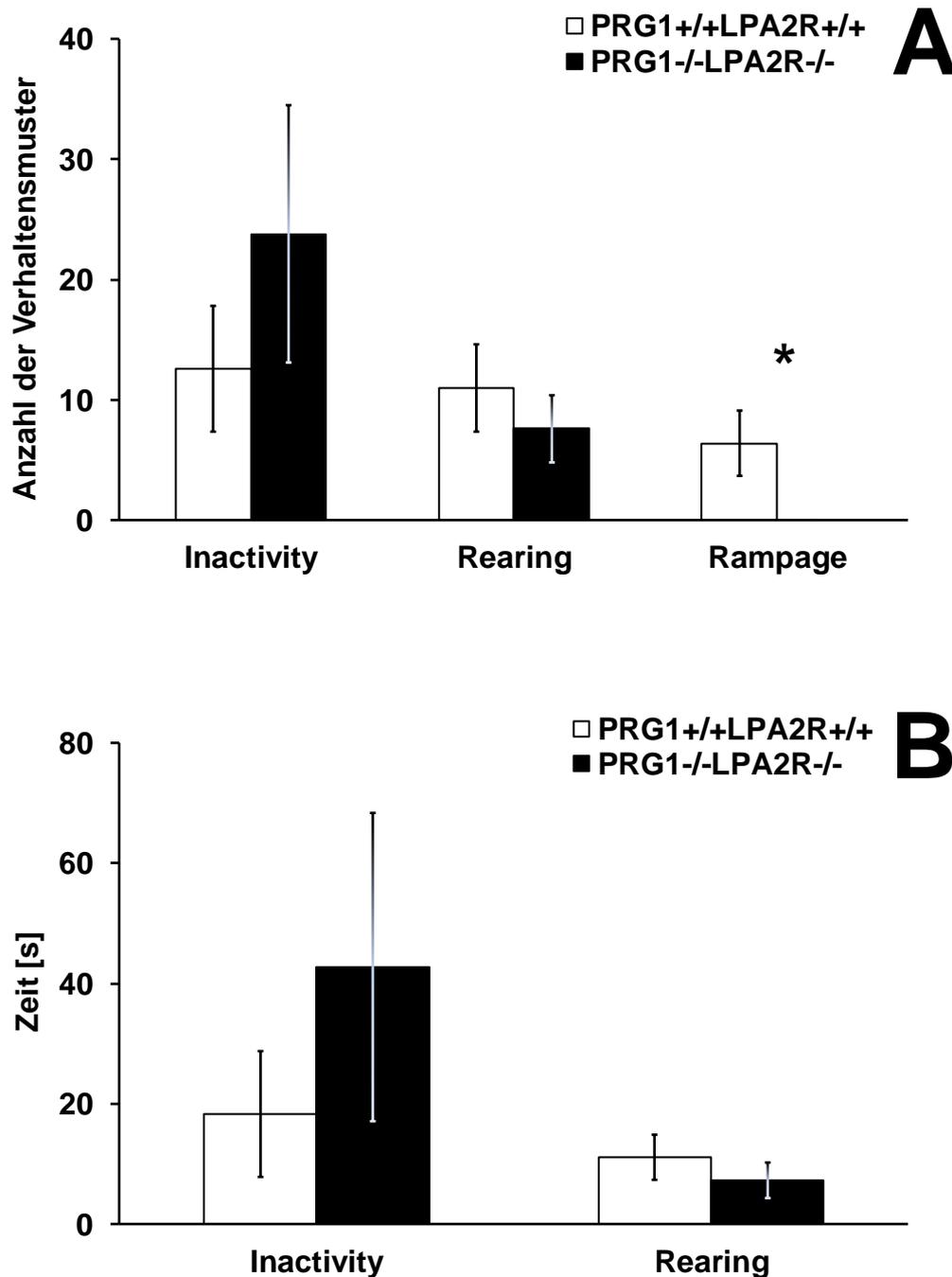
In der Habituation, die ohne den Duftstoff TMT durchgeführt wird, ergeben sich mit der Ausnahme des Verhaltensmuster Rampage keine signifikanten Unterschiede im Verhalten der Doppelknockout Mäuse gegenüber ihren Wildtyp-Geschwistern.

Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 24,6g±0,8g; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 24,5g±0,5g; F(1,19)=2,743; p=0,94) und ihr Alter sind gleich (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 125,5d±5,7d; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 125d±5,3d; F(1,19)=0,118; p=0,95).

Das Verhaltensmuster **Inactivity** ergibt keine Unterschiede sowohl in der Zeit (**Abb. 20B**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 42,7±25,6s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 18,3±10,48s; F(1,19)=3,210; p=0,37) als auch in der Anzahl dieses Verhaltensmusters (**Abb. 20A**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 23,8±10,7; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 12,6±5,2; (F1,19)=3,678; p=0,334). Dem Muster der Inactivity sehr ähnlich ist das **Grooming**, welches in Zeit (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 72,3±14,2s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 91,9±18,2s; F(1,19)=0,323; p=0,38) und Anzahl (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 13±2,07; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 13,3±1,97; F(1,19)=0,01; p=0,913) ebenfalls keine Unterschiede ergibt, ebenso wie das **Sniffing** (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 371,1±35,1s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 426±25,9s; p=0,2; (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 140,8±10,4; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 142±10,37; p=0,928). Die weiteren Muster wie **Rearing** und **Leaning** zeigen sich in beiden Gruppen sowohl in der Dauer (**Abb. 20B**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 7,3±3s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 11,1±3,8s; F(1,19)=3,422; p=0,42; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 121,4±20,7s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 89,5±9,2s; F(1,19)=3,396; p=0,16) als auch in der Anzahl ohne Unterschiede (**Abb. 20A**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 7,6±2,8; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 11±3,6; (F1,19)=2,206; p=0,442; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 79,8±14,18; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 48,4±5,38; (F1,19)=0,34; p=0,052). Der aktivere Parameter **Running** wird von beiden Mäusegruppen ähnlich lang und häufig gezeigt (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 278,7±32,5s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 247±16,6s; F(1,19)=2,756; p=0,37; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 153,7±19,7; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 129,2±11,21; F(1,19)=3,8; p=0,274).

Das **Freezing** Verhalten wird während der Habituation nur vereinzelt beobachtet (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 3,3±2,9s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 0,4±0,3s; F(1,19)=4,553; p=0,32). Auch das auffällige **Jumping** der PRG1<sup>-/-</sup> Mäuse während der Habituation zeigt sich bei den Doppelknockout Tieren sehr selten (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 3,2±0,11s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 0,1±0,1s; F(1,19)=1,735; p=0,1).

Der einzige signifikante Unterschied liegt im „**Rampage**“-Verhalten (**Abb. 20A**: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 0±0; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 6,4±2,7; F(1,19)=28,676; p=0,02). Die Wildtypen interagierten häufiger und länger mit dem Filterpapier und trugen es durch die Box.



**Abb. 20** A,B Habituation: A Anzahl und B Zeit [s] der Verhaltensmuster während der Habituation. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede für das Verhalten Inactivity (Anzahl:  $p=0,334$ ; Zeit:  $p=0,37$ ) und Rearing (Anzahl:  $p=0,442$ ; Zeit:  $p=0,42$ ). Der einzige Unterschied in der Habituation zeigt sich in der Anzahl des Rampage-Verhaltens ( $p=0,02$ ), die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> weisen dieses Verhalten gar nicht auf (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>  $n=10$ ; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>  $n=10$ ; \*  $p<0,05$  T-test)

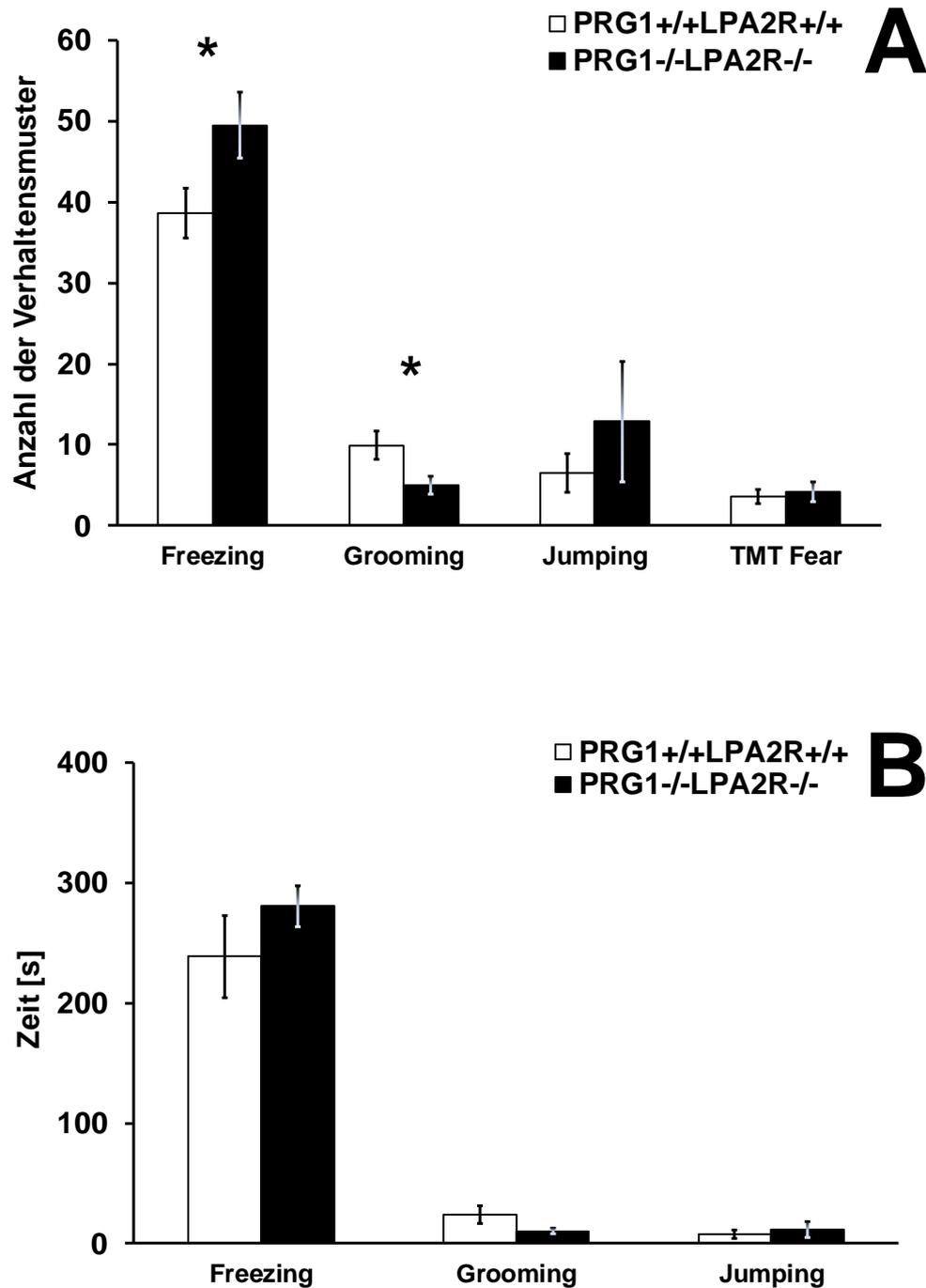
### 5.1.3.2 Exposition

In der Exposition mit TMT lässt sich bei den Doppelknockout Mäusen ein vergleichbares Furchtverhalten beobachten wie bei ihren Wildtypen. In Bezug auf die Dauer des jeweiligen Verhaltens ergeben sich keinerlei signifikante Unterschiede. In der Häufigkeit des Verhaltens finden sich im Freezing und Grooming Unterschiede.

Das Gewicht der Mäuse vor der Exposition (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 24,9±0,8g; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 24,7±0,5g; F(1,19)=1,366; p=0,88) zeigen keinen Unterschiede zwischen den Gruppen.

Ein wichtiger signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen lag in der Anzahl des **Freezings**. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> zeigen im Schnitt n=50 Freezing-Verhalten während der Exposition, wohingegen der Wildtyp einen Mittelwert von n=39 aufweist (**Abb. 21A**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 49,5±4,1; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 38,6±3,1; F(1,19)=0,167; p=0,038). Die Gesamtzeit des Freezings unterscheidet sich allerdings nicht (**Abb. 21B**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 280,5±17,2s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 238,6±34,2s; F(1,19)=2,376; p=0,26). Eine ähnliche Konstellation ergibt sich für das **Grooming**. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> zeigen hier allerdings signifikant weniger häufig ein Grooming im Vergleich mit ihren Wildtypen (**Abb. 21A**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 5,0±1,1; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 9,9±1,8; F(1,19)=2,537; p=0,023). Kein Unterschied ist wieder in der Gesamtzeit des Groomings zu beobachten (**Abb. 21B**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 10,4±2,1s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 24±7,2s; F(1,19)=7,883; p=0,071).

Das stereotypische **Jumping**-Verhalten zeigen die Tiere sowohl in der Anzahl (**Abb. 21A**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 12,9±7,5; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 6,5±2,4; F(1,19)=9,528; p=0,4), als auch in der Zeit (**Abb. 21B**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 11,5±6,5s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 8±3,4s; F(1,19)=5,319; p=0,4) ohne signifikanten Unterschied, ebenso wie das **TMT-Fear Verhalten** keine Differenz aufweist (**Abb. 21A**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 4,2±1,22; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 3,6±0,82; F(1,19)=2,045; p=0,67).



**Abb. 21** Exposition: **A** Anzahl und **B** Zeit [s] der Verhaltensmuster Freezing, Grooming, Jumping und TMT Fear während der Exposition. A Freezing und Grooming zeigen sich in der Anzahl signifikant mit  $p=0,038$  und  $p=0,023$ , bei nicht signifikanten Jumping ( $p=0,4$ ) und TMT-Fear ( $p=0,67$ ). B In Bezug auf die Zeit zeigen sich keine Signifikanzen beim Freezing ( $p=0,26$ ), Grooming ( $p=0,071$ ) und Jumping ( $p=0,4$ ); (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> n=10; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> n=10; \*  $p<0,05$  T-test)

Für die weiteren Verhaltensmuster ergeben sich keine Unterschiede. So zeigen sich in der **Dauer** des **Runnings** (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 147±16,1s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 152,2±17,8s; F(1,19)=0,745; p=0,82), der **Inactivity** (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 93,8±15,8s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 77,6±7,9s; F(1,19)=6,518; p=0,35), des **Rearings** (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 3±5,2s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 11,2±5,15s; F(1,19)=6,023; p=0,13), des **Leanings** (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 64,4±7,2s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 70±9,12s; F(1,19)=0,466; p=0,62) oder des **Sniffings** (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 285±16,9s; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 285,2±16s; F(1,19)=0,010; p=0,98) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Auch in der **Anzahl** dieser Parameter ergeben sich keine Unterschiede: **Running** (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 74,1±7,95; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 77,60±10,56; F(1,18)=0,51; p=0,783), **Inactivity** (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 44,4±7,43; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 37,4±3,16; F(1,18)=10,327; p=0,373), **Rearing** (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 2,3±1,36; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 9,5±4,04; F(1,18)=6,846; p=0,103), **Leaning** (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 32,4±3,31; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 36,4±6,19; F(1,18)=1,983; p=0,585), **Sniffing** (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 137,6±7,01; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 128±4,89; F(1,18)=1,185; p=0,252).

Das „Rampage“-Verhalten wird während der Exposition in beiden Gruppen nicht beobachtet.

## 5.2 Morphologie

Die im folgenden Abschnitt zusammengestellten Bilder, sollen eine Übersicht über die Regionen der Geruchsbahn geben. Dabei wird der jeweils erste und letzte Schnitt der zu untersuchenden Region an Hand eines Beispiels eines Wildtypen dargestellt. Bezüglich der signifikanten Regionen werden zum Vergleich der Maustypen zusätzlich Detailbilder der markierten Neurone eingefügt. Hierzu wird je eine Maus der Wildtyp- und eine der Doppelknockout-Gruppe ausgewählt, die in ihrer Gruppe am nächsten an den Mittelwerten der mit c-Fos angefärbten Zellen liegen.

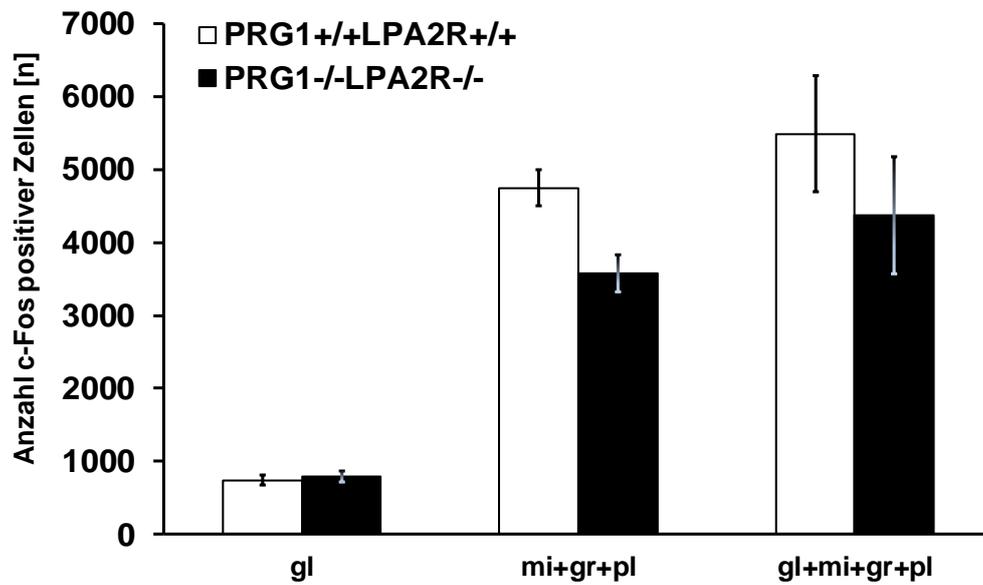
Mittels Immunhistochemie wird der Effekt des TMTs während der Exposition in acht Regionen der Geruchsbahn untersucht: Bulbus olfactorius, Septum, Tuberculum olfactorium, Hippokampus (HIP), piriformer Cortex, Dorsale Tenia Tecta (TTd), Amygdala und mediodorsaler Thalamus. Im Folgenden werden die verschiedenen Regionen mit der Anzahl der Neurone, bei welchen das c-Fos Protein markiert wird, dargestellt. Für die Immunhistochemie werden die Gehirne von n=6 PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> und n=6 PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> untersucht.

Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass bei den PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> Mäusen gegenüber den PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Mäusen immer eine größere Anzahl an c-Fos immunpositiven Zellen beobachtet werden kann, sowohl im Hinblick auf die signifikant unterschiedlichen Regionen, als

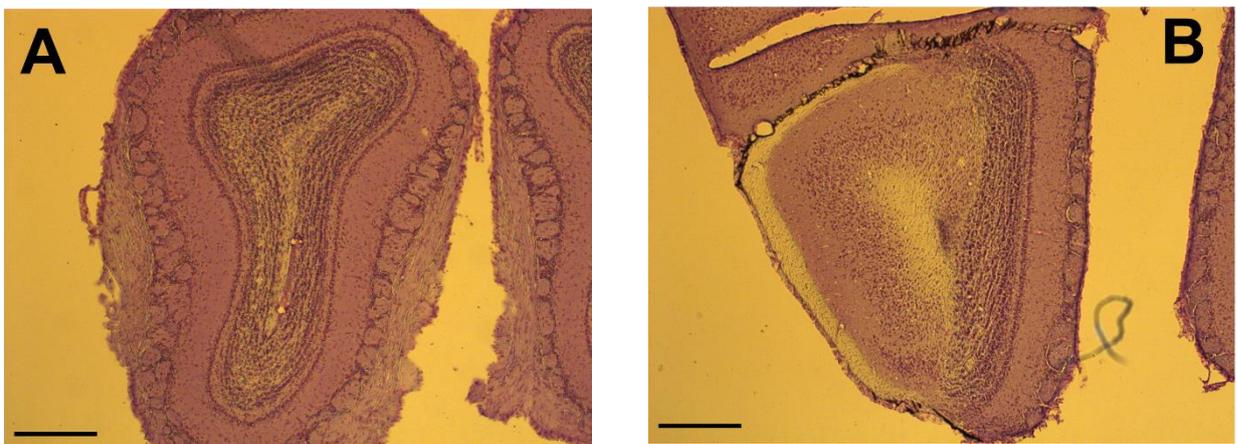
auch in den ausgewerteten Hirnbereichen, die statistisch keine Hinweise auf einen Zellzahlunterschied ergeben.

### 5.2.1 Bulbus olfactorius - OB

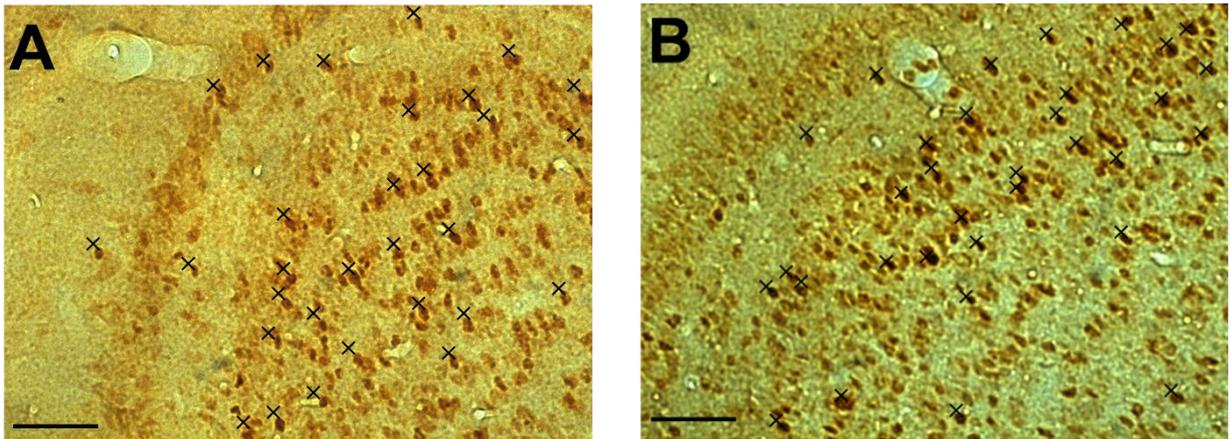
Der OB als erste Struktur innerhalb der Geruchsbahn zeigt die dichteste Anzahl c-Fos markierter Neuronen (siehe **Abb. 24**). Es können im Schnitt bei den Doppelknockout Mäusen 4375 immunpositive Zellen im Bulbus gezählt werden und bei den Wildtypen 5490. Den höchsten Einzelwert zeigt eine Wildtypmaus mit 6272 Neuronen im OB. Insgesamt können aber keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl c-Fos immunpositiver Neurone im OB aufgezeigt werden. Weder im gesamten OB (**Abb. 22**; OB=gl+mi+gr+pl: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 4373±799; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 5490±363; F(1,12)=0,954; p=0,194), noch in der separaten Auswertung der verschiedenen Schichten des OB (**Abb. 22**; OB gl: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 796±75; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 742±97; F(1,12)=2,045; p=0,638; **Abb. 23**; OB mi+gr+pl: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 3578±249; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 4748±274; F(1,12)=0,231; p=0,383) finden sich signifikante Unterschiede.



**Abb. 22** Bulbus olfactorius: Anzahl der c-Fos immunpositiver Neurone [n]. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, aufgliedert nach den Schichten des OB: gl ( $p=0,638$ ); mi+gr+pl ( $p=0,383$ ) und gl+mi+gr+pl ( $p=0,194$ ); (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> n=10; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> n=10; T-test)



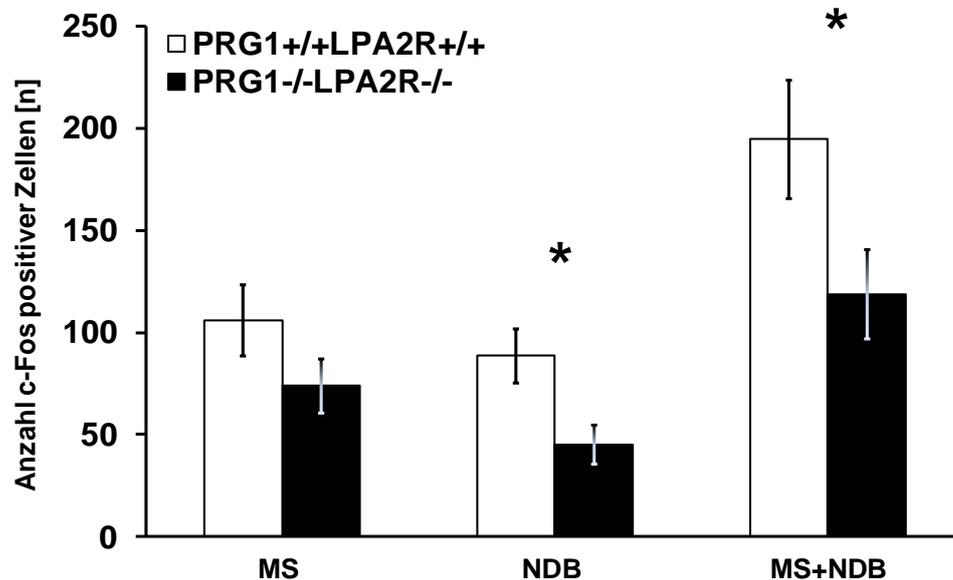
**Abb. 23** Bulbus olfactorius: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 10 bis 26, Bregma 4,445mm A bis 2,745mm B (Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>); (Maßstab: 2mm)



**Abb. 24** Bulbus olfactorius mit Teilausschnitt der mi, gr und pl Schicht: 40-fache Vergrößerung, coronar level 15, Bregma 4,445mm; A Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>; B Maus 89: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>; (Maßstab: 50µm)

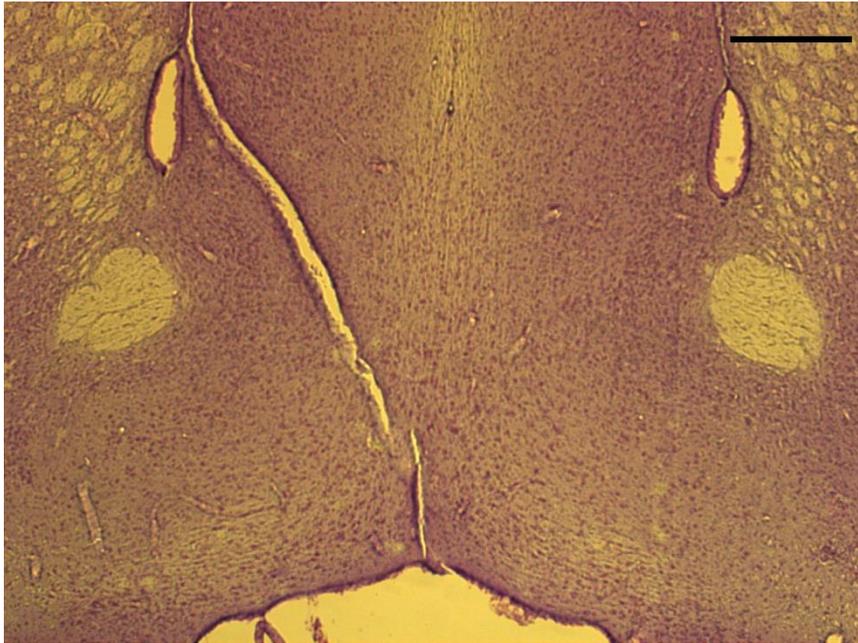
### 5.2.2 Septum

In der Septum-Region, mediales Septum (MS) und dorsales Band Broca (DB), lassen sich signifikante Unterschiede in der Anzahl c-Fos immunpositiver Neurone festhalten (**Abb. 25**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 149±29; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 119±22; F(1,11)=0,225; p=0,044); (**Abb. 26, 27**).

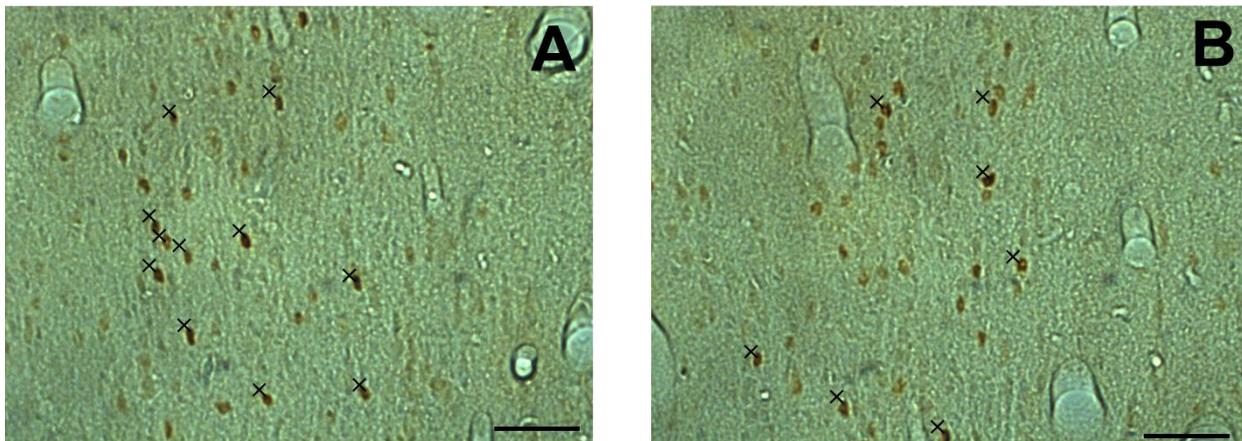


**Abb. 25** Septum: Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone [n]. Die PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> zeigen eine signifikant höhere Anzahl (p=0,044), wobei sich der DB als ausschlaggebende Region für die Signifikanz zeigt (p=0,015), das MS hingegen ergibt keine Signifikanz (p=0,143); (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> n=10; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> n=10; \* p<0,05 T-test)

In der Separation der Region in MS und DB ergibt sich nur ein Unterschied zwischen den Gruppen im DB (**Abb. 25**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 89±13; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 45±10; F(1,11)=0,425; p=0,015), im MS zeigen sich keine Signifikanzen (**Abb. 25**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 106±17; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 74±13; F(1,11)=0,2; p=0,143). Die Wildtypen zeigen in beiden Abschnitten mehr immunpositive Zellen als die Doppelknockout Mäuse, wobei nur der Bereich DB signifikant ist.



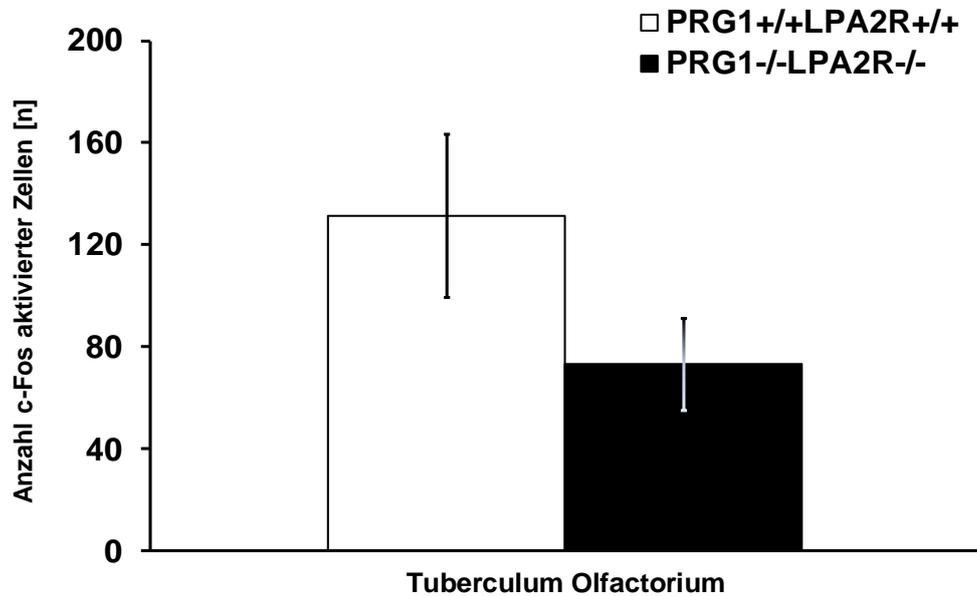
**Abb. 26** Septum: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 44, Bregma 1,045mm (Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>); (Maßstab: 2mm)



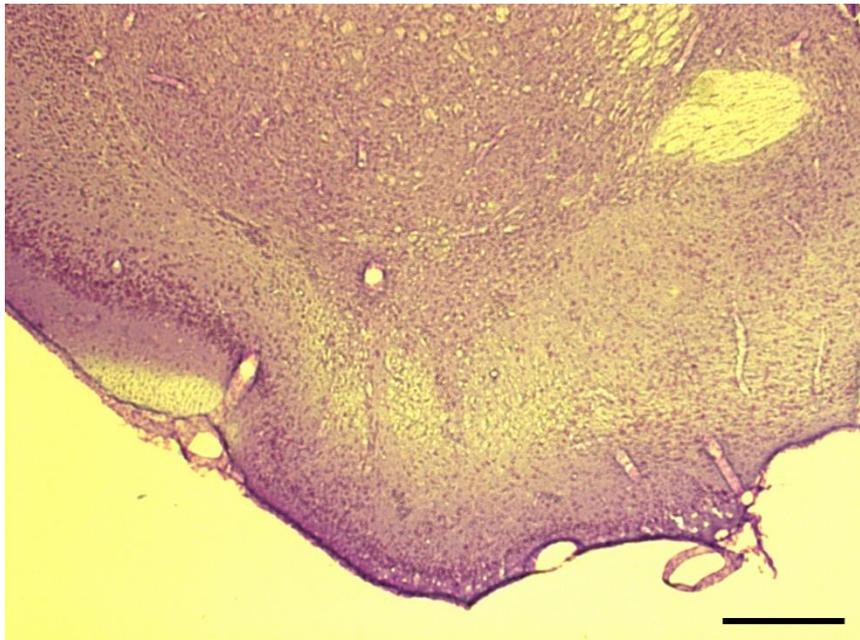
**Abb. 27** Septum: 40-fache Vergrößerung, coronar level 44, Bregma 1,045mm; A Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>; B Maus 89: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>; (Maßstab: 50µm)

### 5.2.3 Tuberculum Olfactorium - OT

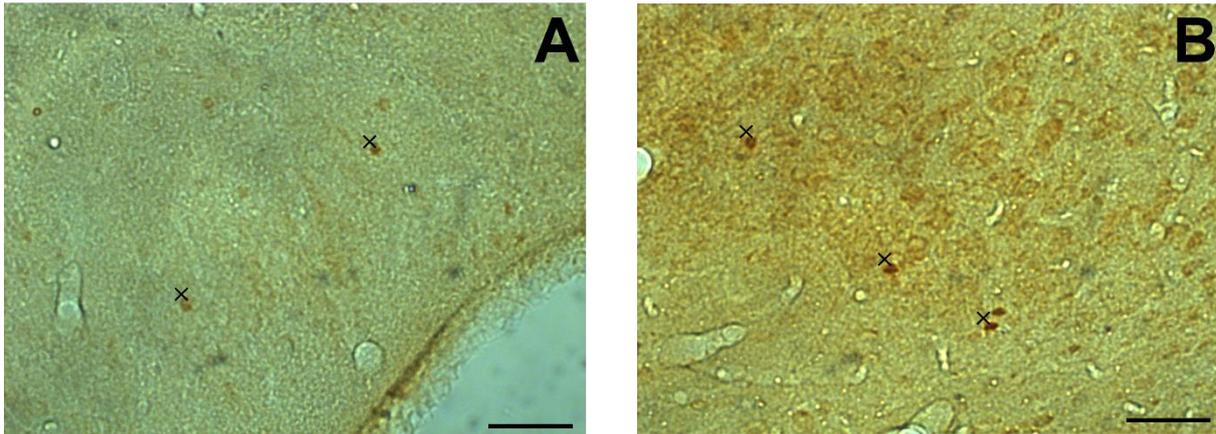
Das OT als Abschnitt der Geruchsbahn weist ebenfalls c-Fos immunpositive Neurone auf, jedoch keine signifikanten Unterschied in der Anzahl der Neurone (siehe **Abb. 29, 30**); (**Abb. 28**; OT: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 131±32; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 73±18; F(1,11)=0,246; p=0,113).



**Abb. 28** Tuberculum Olfactorium: Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone [n]. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,113$ ), (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> n=10; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> n=10; T-test)



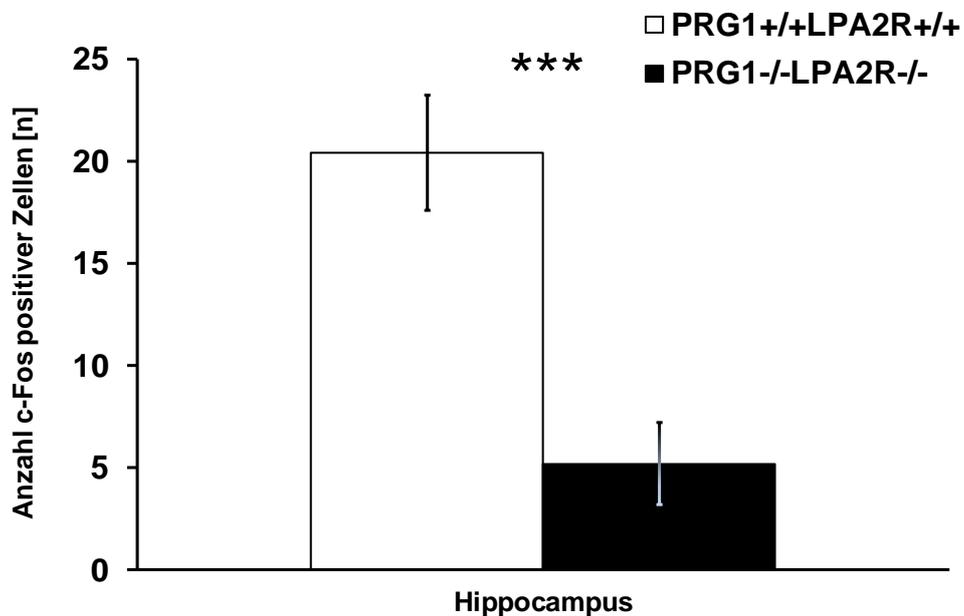
**Abb. 29** Tuberculum Olfactorium: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 35, Bregma 1,946mm (Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>); (Maßstab: 2mm)



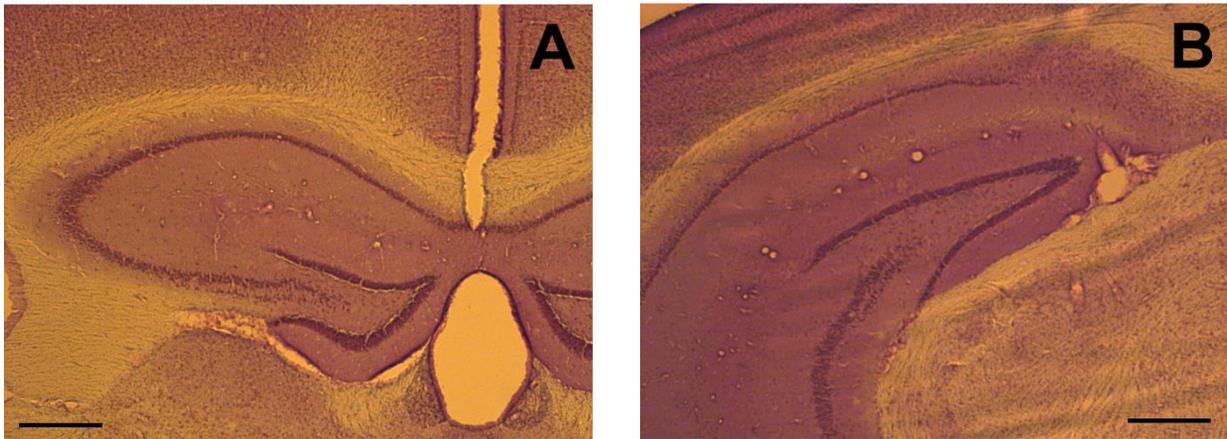
**Abb. 30** Tuberculum Olfactorium: 40-fache Vergrößerung, coronar level 41, Bregma 1,315mm; A Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>; B Maus 89: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>; (Maßstab: 50µm)

#### 5.2.4 Gyrus dentatus (DG) im Hippocampus

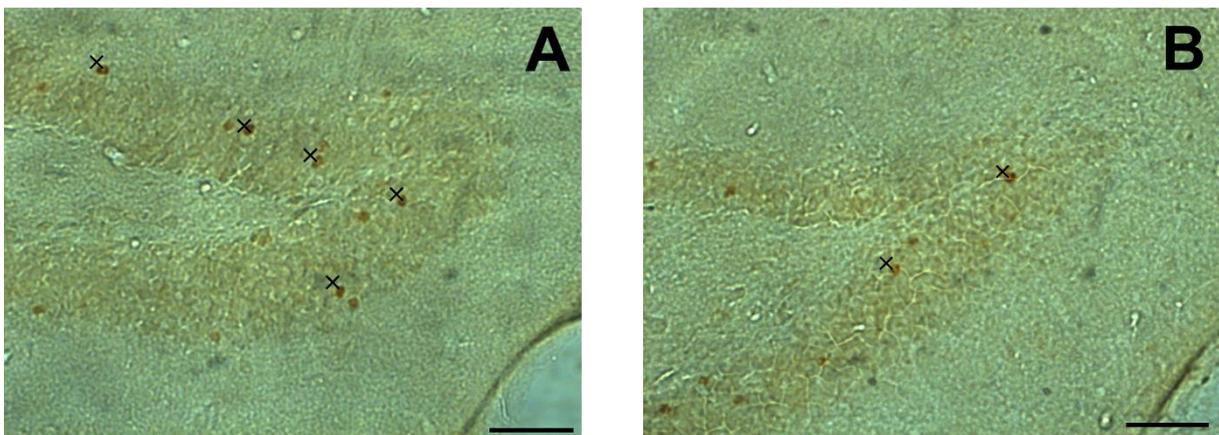
Eine unerwartete hoch signifikante Differenz in der Anzahl immunpositiver Neurone durch TMT zeigt sich im Hippocampus (siehe **Abb. 32,33**). Die Doppelknockout Mäuse weisen entlang des DG nur ein Viertel so viele aktivierte Zellen gegenüber ihren Wildtypen auf (**Abb. 31**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 122±17; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 31±12; F(1,11)=2,076; p=0,001).



**Abb. 31** Hippocampus: Anzahl der c-Fos aktivierten Neurone [n]. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> zeigen signifikant weniger aktivierte Zellen (p=0.001); (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> n=10; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> n=10; \*\*\* p<0.001 T-test)



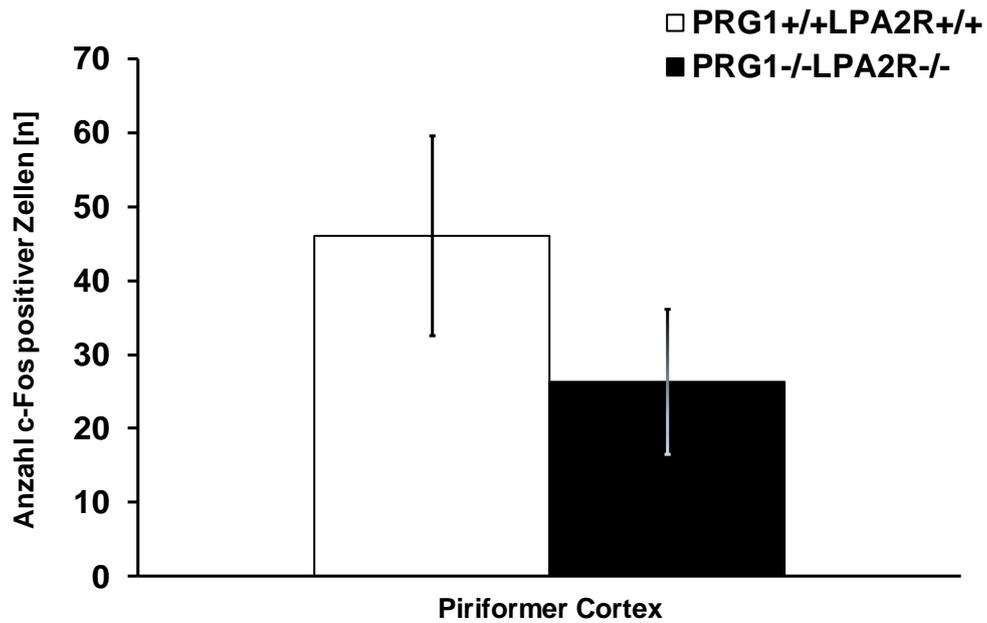
**Abb. 32** Hippocampus: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 68 bis 81, Bregma -1,355mm A bis -2,70mm B (Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>); (Maßstab: 2mm)



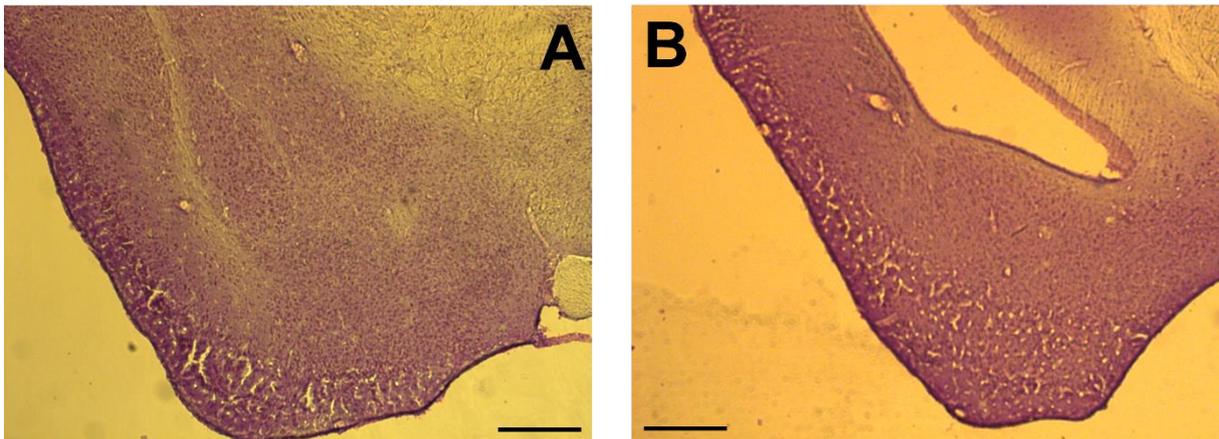
**Abb. 33** Hippocampus: 40-fache Vergrößerung, coronar level 68, Bregma -1,355mm; A Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>; B Maus 89: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>; (Maßstab: 50µm)

### 5.2.5 Piriformer Cortex - PIR

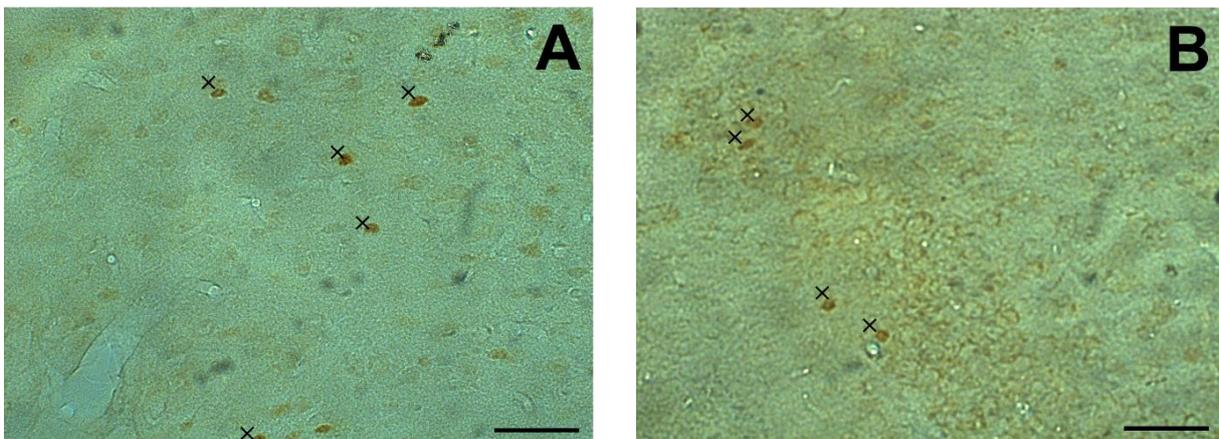
Im PIR als Region zur bewussten Verarbeitung von Informationen konnten zwischen den Doppelknockout Mäusen und ihren Wildtypen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone quantifiziert werden (siehe auch **Abb. 35, 36**); (**Abb. 34**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 491,3±108,6; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 280,8±78,5; F(1,11)=0,504; p=0,116).



**Abb. 34** Piriformer Cortex: Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone [n]. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,116$ ); (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> n=10; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> n=10; T-test)



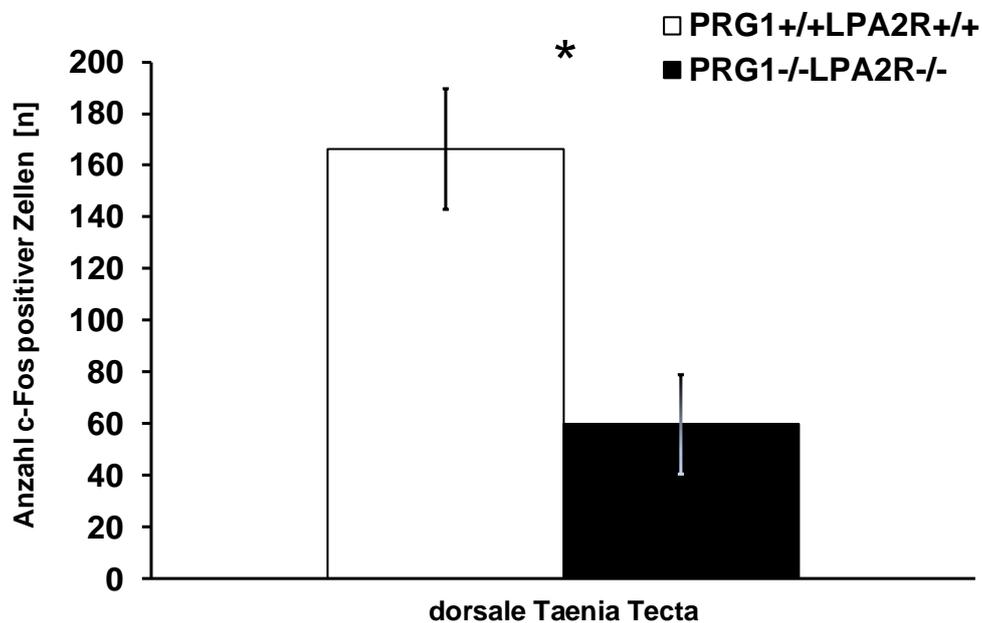
**Abb. 35** Piriformer Cortex: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 42 bis 78, Bregma 1,245mm A bis -2,355mm B (Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>); (Maßstab: 2mm)



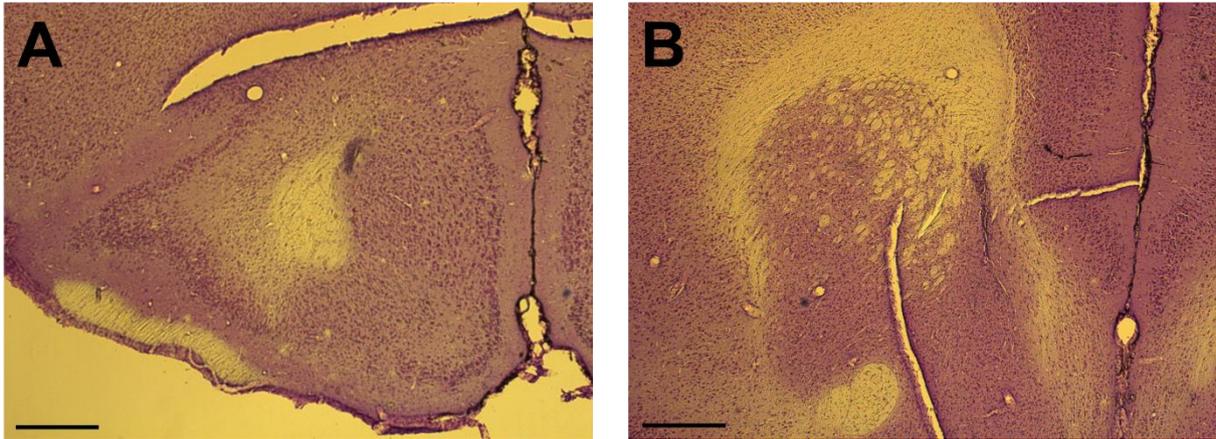
**Abb. 36** Piriformer Cortex: 40-fache Vergrößerung, coronar level 42, Bregma 1,245mm; A Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>; B Maus 89 PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>; (Maßstab: 50µm)

### 5.2.6 Dorsale Taenia Tecta - TTd

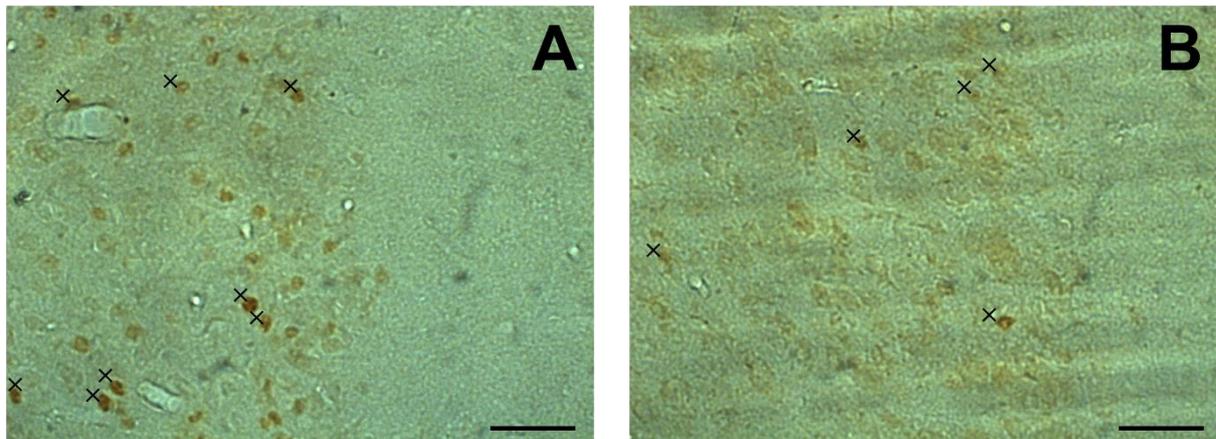
Im TTd weisen die Doppelknockout Tiere signifikant weniger c-Fos immunpositive Neurone auf (**Abb. 37**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 60±19; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 166±23; F(1,11)=1,265; p=0,008). Im Durchschnitt ergeben sich in dieser Region bei den Doppelknockout Mäusen 2,5x weniger immunpositive Neurone im Vergleich zu ihren Wildtypen (**Abb. 38,40**). Hierbei zeigt sich in den Gruppen jeweils ein Ausreißer. Unter den Wildtypen ist ein Tier bei lediglich n=68 Zellen, wobei die restlichen Tiere der Gruppe alle mehr als 120 c-Fos immunpositive Zellen zeigen. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Gruppe hat ein Tier mit n=140, wohingegen sich bei den restlichen Tieren n<65 ergeben.



**Abb. 37** Dorsale Taenia Tecta: Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone [n]. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> zeigen signifikant weniger aktivierte Neurone (p=0,008); (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> n=10; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> n=10; \* p<0,05 T-test)



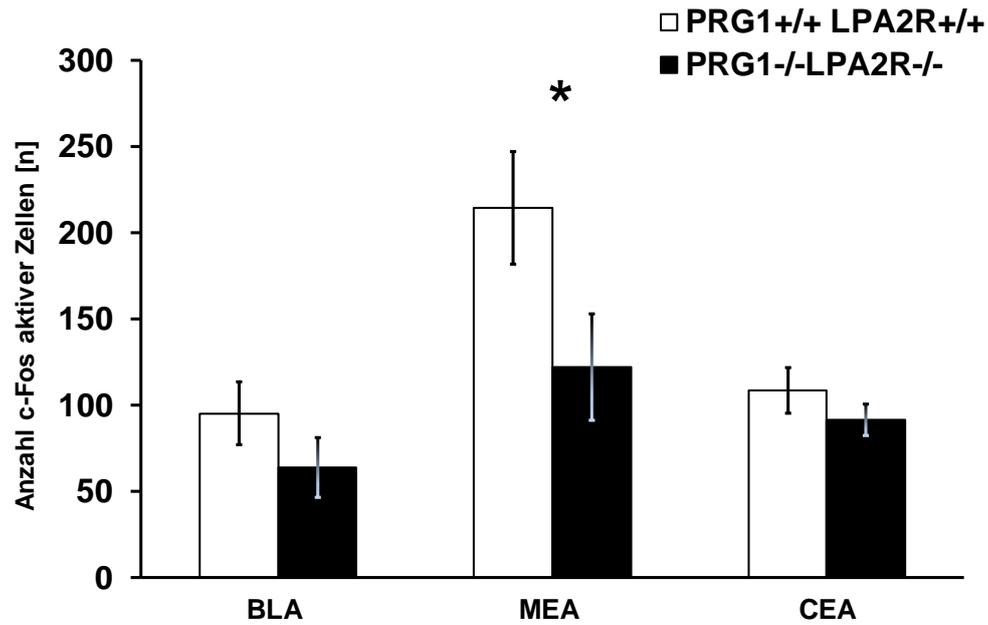
**Abb. 38** Dorsale Taenia Tecta: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 31 bis 40, Bregma 2,315mm A bis 1,42mm B (Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>); (Maßstab: 2mm)



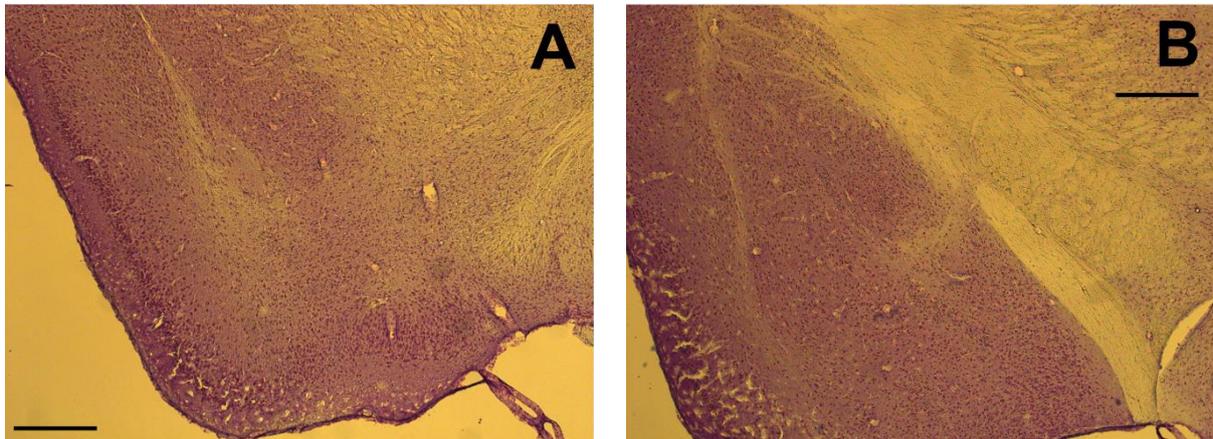
**Abb. 39** Dorsale Taenia Tecta: 40-fache Vergrößerung, coronar level 31, Bregma 2,315mm; A Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>; B Maus 89: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>; (Maßstab: 50µm)

### 5.2.7 Amygdala

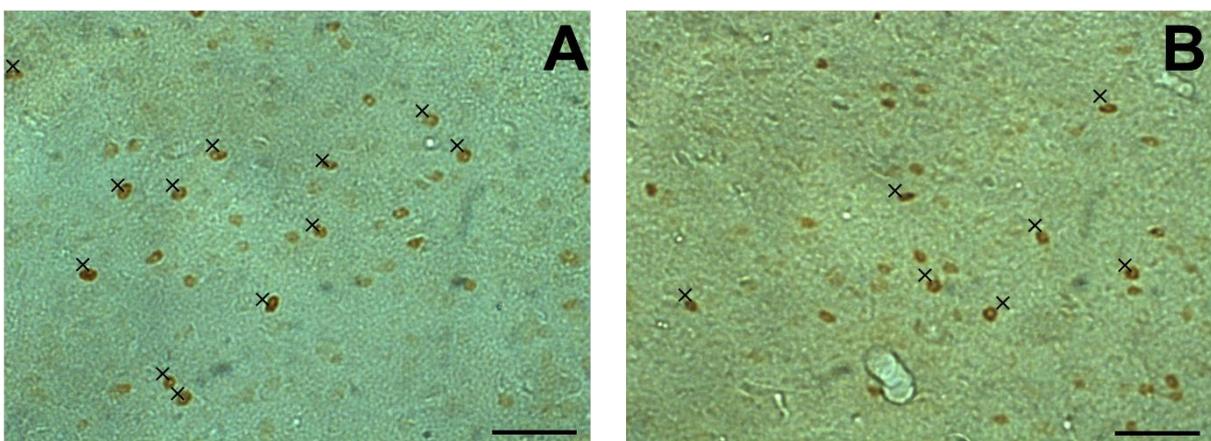
In der Amygdala wurden drei Regionen ausgewertet, wobei sich im Bereich der MeA ein signifikanter Gruppenunterschied ergibt (**Abb. 41,42**); (**Abb. 40**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 214±32; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 122±31; F(1,11)=0,211; p=0,047). In der BLA (**Abb. 40**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 95±18; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 64±17; F(1,11)=0,674; p=0,206) und der CeA (**Abb. 40**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 92±9; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 109±13; F(1,11)=0,164; p=0,262) lassen sich keine Unterschiede quantifizieren. Zu erwähnen ist eine hohe Varianz im Bereich der MeA in beiden Gruppen. Bei den PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tieren divergiert die Anzahl der Neurone von 26 bis zu 208, bei den Wildtypen hingegen zwischen 121 bis 296 Zellen.



**Abb. 40** Amygdala (BLA, MeA, CeA): Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone [n]. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> zeigen im Bereich der MeA signifikant weniger aktivierte Neurone ( $p=0,047$ ); (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>  $n=10$ ; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>  $n=10$ ; \*  $p<0,05$  T-test)



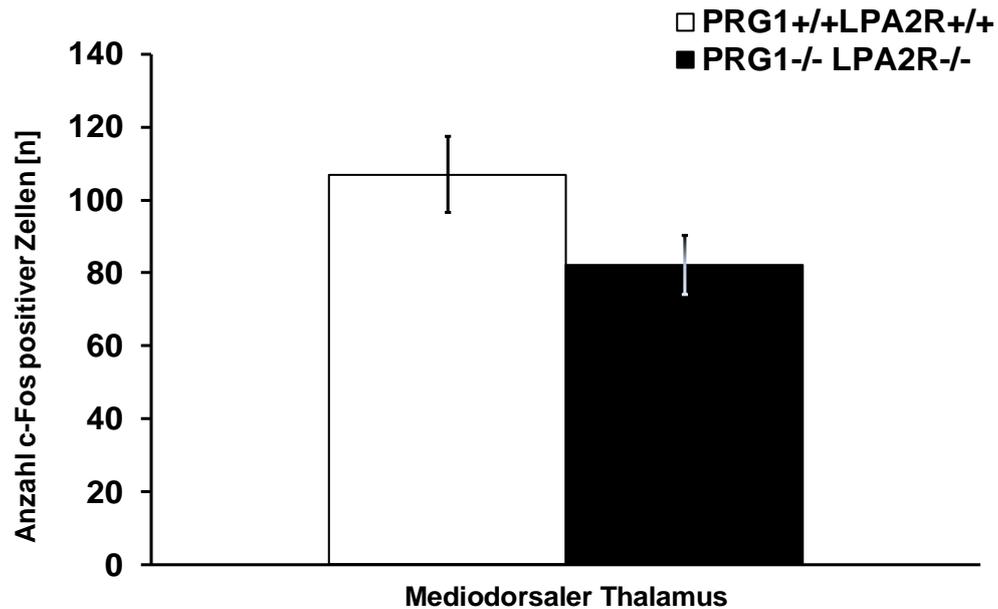
**Abb. 41** Amygdala: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 62 bis 75, Bregma -0,755mm A bis -2,055mm B (Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>); (Maßstab: 2mm)



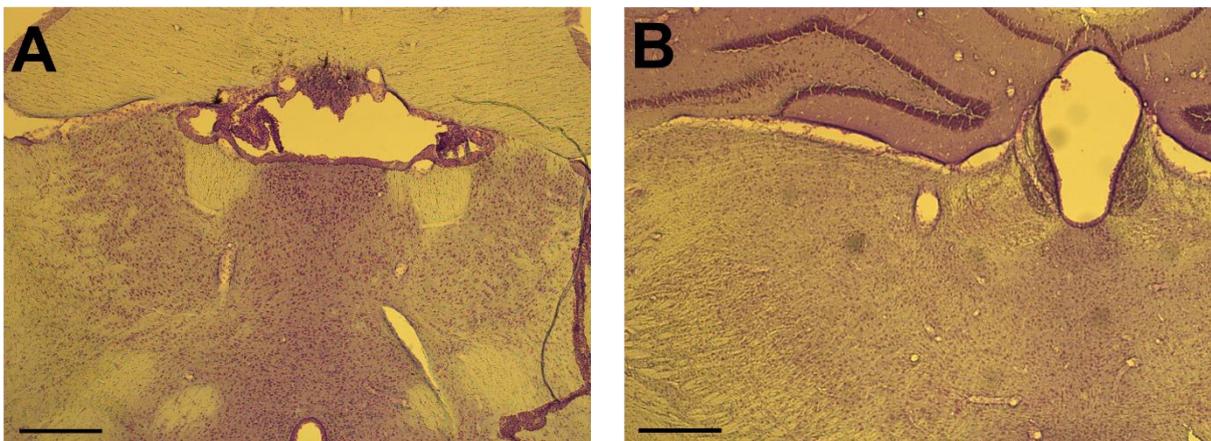
**Abb. 42** MeA: 40-fache Vergrößerung, coronar level 67, Bregma -1,55mm; A Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>; B Maus 89: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>; (Maßstab: 50µm)

### 5.2.8 Mediodorsaler Thalamus - MD

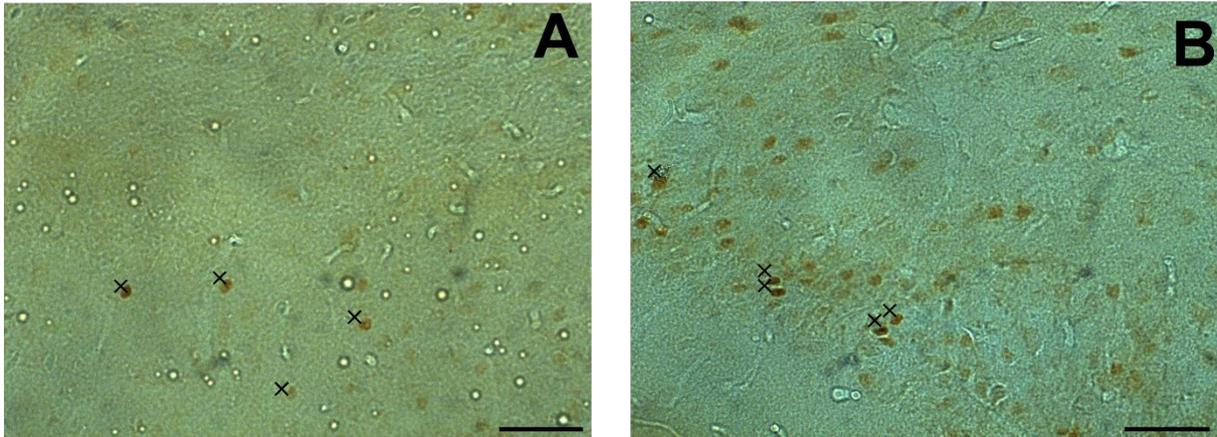
Im MD ergeben sich keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an c-Fos immunpositiven Neuronen in den Vergleichsgruppen (siehe auch **Abb. 44;45**) (**Abb. 43**; PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> 107±10; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> 82±8; F(1,11)=1,022; p=0,066). Die Streubreite zeigt sich sehr gering mit 73 bis 128 bei den Wildtypen und 79 bis 109 Zellen bei den Doppelknockout Mäusen.



**Abb. 43** Mediodorsaler Thalamus: Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone [n]. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,066$ ); (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> n=10; PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup> n=10; T-test)



**Abb. 44** Mediodorsaler Thalamus: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 61 bis 74, Bregma -0,655mm A bis -1,955mm B (Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>); (Maßstab: 2mm)



**Abb. 45** Mediodorsaler Thalamus: 40-fache Vergrößerung, coronar level 61, Bregma - 0,655mm; A Maus 59: PRG1<sup>+/+</sup>LPA2R<sup>+/+</sup>; B Maus 89: PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>; (Maßstab: 50µm)

### 5.3 Korrelation Verhalten - Morphologie

Eine Korrelationsanalyse von signifikanten Verhaltens- und morphologischen Daten zur Ermittlung stochastischer, linearer Zusammenhänge wird aufgrund des in der Zielstellung erwarteten und beschriebenen Effekts der Verhaltens-Normalisierung an dieser Stelle nicht durchgeführt. In der TMT-Exposition zeigen sich in Bezug auf die Dauer der verschiedenen Verhaltensmuster zwischen den Wildtypen und den Doppelknockouts keine Unterschiede mehr. Beim Freezing und Grooming gibt es in der Häufigkeit einen signifikanten Unterschied, nicht jedoch in der Dauer des Verhaltens, welche eine deutlich größere Relevanz hat. Die neu aufgetretenen signifikanten Unterschiede in der Anzahl c-Fos immunpositiver Zellen lassen sich somit nicht mit einem der Verhaltensmuster korrelieren.

## 6 Diskussion

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit ist, die Interaktion des postsynaptischen PRG1 und des präsynaptisch lokalisierten LPA2R mit Hilfe verhaltensbiologischer und morphologischer Methoden zu untersuchen. Dies soll die Hypothese prüfen, ob die im Verhalten und der Morphologie aufgezeigten Auffälligkeiten der PRG1<sup>-/-</sup> Tiere mit einem weiteren Knockout des LPA2Rs (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>) aufgehoben werden können (Trimbuch et al. 2009; Schneider 2016). Somit können die publizierten Arbeiten der bereits elektrophysiologisch nachgewiesenen Normalisierung der EPSCs bei PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tieren im Vergleich zu ihren Wildtypen verhaltensbiologisch und morphologisch ergänzt werden (Trimbuch et al. 2009).

Im Folgenden schließt sich ein Vergleich der PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tiere mit PRG1<sup>-/-</sup> Mäusen an, um den oben beschriebenen Effekt zu verdeutlichen. Die zum Vergleich herangezogenen Versuche mit den PRG1<sup>-/-</sup> Mäusen wurden ebenfalls am Institut für Anatomie an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchgeführt, um eine Übereinstimmung der Rahmenbedingungen und Versuchsaufbauten für eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu schaffen. Diese Ergebnisse sind bereits durch eine Dissertationsarbeit veröffentlicht (Schneider 2016).

Hier zunächst eine Erklärung des Begriffes „Rescue“. Unter Rescue wird in meiner Arbeit im Folgenden die Rücksetzung des hervorgerufenen Effektes eines Knockouts durch das Hinzufügen eines weiteren Knockouts bezeichnet. Es bezieht sich sowohl auf das Verhalten der Tiere als auch auf die Anzahl der Zellen in der Morphologie. Die Adjektive teilweise bzw. vollständig/komplett beziehen sich auf je einen Komplex eines Verhaltensversuches bzw. Verhaltensmusters (Angst, Furcht, Aktivität). Zeigen alle Werte eines Versuchsaufbaus in den Doppelknockout Tieren keine signifikanten Unterschiede mehr, wird von einem vollständigen/kompletten Rescue gesprochen. Trifft dies nur auf einige Parameter einer Versuchsreihe zu, handelt es sich um ein teilweises Rescue. Werden weiterhin für alle Werte einer Testeinheit signifikante Unterschiede bestimmt, liegt kein Rescue vor.

Grundsätzlich zeigen alle bisher vorliegenden Ergebnisse ein teilweises Rescue sowohl im Verhalten als auch in der Morphologie durch einen zusätzlichen Knockout des LPA2Rs bei PRG1<sup>-/-</sup> Tieren festgestellt werden. So zeigt sich ein vollständiges Rescue in der Reaktion der Tiere auf TMT, während sich in den beiden anderen Verhaltenstests (EPM und soziale Interaktion) weiterhin signifikante und vergleichbare Verhaltensunterschiede analog zu den PRG1<sup>-/-</sup> Tieren gegenüber den Wildtypen beobachten lassen. In der Morphologie zeigt sich korrelierend zu dem TMT Versuch ein komplettes Rescue der aktivierten Regionen, dargestellt durch c-Fos immunpositive Neurone. Allerdings zeigen sich in Arealen ohne signifikante Unterschiede bei den PRG1<sup>-/-</sup> Mäusen zu ihren Wildtypen neue Unterschiede bei den

Doppelknockout Mäusen, sodass nicht nur von einem Rescue ausgegangen werden kann, sondern ebenfalls von zu separierenden und somit neuen Effekten des hinzugefügten LPA2R-Knockouts.

### **Rescue der glutamatergen Hyperexzitation der motorischen Aktivität**

Für die motorische Aktivität lässt sich ein vollständiges Rescue der Doppelknockout Mäuse festhalten. Bei einem Mangel von PRG1 wird eine erhöhte Erregbarkeit mit gesteigertem Bewegungsdrang, ausgedrückt durch repetitive stereotypische Bewegungsmuster, beobachtet. Bereits während der Käfighaltung ohne Stimulation durch ein Testverfahren zeigen die PRG1<sup>-/-</sup> Tiere Springen in den Käfigecken und stereotypes Rennen im Kreis (Schneider 2016). Die dahinterstehende Hypothese der gesteigerten Aktivität und eines damit erhöhten Bewegungsumfanges durch eine glutamaterge Hyperexzitation wird durch das Ergebnis eines Rota-Rod-Versuches gestützt. Dieses Verfahren, welches die motorische Koordination und Ausdauer untersucht (Shiotsuki et al. 2010), ergibt für die PRG1<sup>-/-</sup> Mäuse eine längere Laufzeit und damit eine höhere Aktivität im Vergleich zu ihren Wildtypen. Dieser Effekt kann bei den PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> nicht beobachtet werden, sie zeigen im Ergebnis keinen Unterschied zu ihren Wildtypen während des Versuches, was ebenfalls für ein Rescue durch den zusätzlichen Knockout des LPA2R spricht (Schneider et al. 2018). Ähnliche Ergebnisse ergibt die Beobachtung in einem großen Open Field, welches ebenfalls ein Test zur Bestimmung der motorischen Aktivität und der Exploration einer neuen Umgebung ist (Crawley und Paylor 1997). Auch hier zeigt sich ein vollständiges Rescue der bei den PRG1<sup>-/-</sup> Tiere beobachteten Auffälligkeiten bei den Doppelknockouts jeweils im Vergleich mit ihren Wildtypen (Schneider et al. 2018). Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtung, dass sich die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tiere in der Käfighaltung ähnlich wie ihre Wildtypen verhalten, womit ein Rescue in unstimulierten Situationen, im normalen Käfigverhalten und der motorischen Aktivität, belegt wird.

### **Angst und Furcht**

In dieser Arbeit dienen drei unterschiedliche Verhaltensversuche der Eruierung von Furcht- und Angstverhalten und lassen eine Unterscheidung dieser beiden Formen zu. Durch das EPM (Pellow 1985; Lister 1987; Espejo 1997) und die soziale Interaktion (Bailey und Crawley 2009) wird das Angstverhalten objektiviert und durch die Konfrontation mit TMT die Furchtreaktion (Day et al. 2004; Janitzky et al. 2009). Eine Unterscheidung von Angst und Furcht ist hier von zentraler Bedeutung, da die Doppelknockout Mäuse in den Angst auslösenden Tests weiterhin Verhaltensauffälligkeiten zeigen, während sich im Furcht provozierenden TMT Versuch ein komplettes Rescue ergibt.

Die Furcht ist eine Reaktion auf einen spezifischen Stimulus, eine externe Gefahr, wie zum Beispiel auf den Duftstoff TMT (Steimer 2002). Die Angst dagegen ist eine generalisierte Reaktion auf einen inneren Konflikt oder einen unbekanntem Stimulus (Steimer 2002). Für beide Verhalten, die Angst und die Furcht, ist das glutamaterge System entscheidend, welches die neuronale Exzitation in limbischen/paralimbischen Hirnstrukturen reguliert (Lister 1987, Bernadette 2005).

Die Angst- und Furchtverarbeitung kann auch morphologisch teilweise separiert werden. Als übergeordnete Struktur der Verarbeitung von Gefahr gilt die Amygdala (Fox et al. 2015), die eine zentralere Rolle in der Furchtverarbeitung spielt (Davis 1998; Steimer 2002) und in der Angstverarbeitung eine wichtige Funktion zusammen mit weiteren Arealen übernimmt. So konnte gezeigt werden, dass eine Läsion der Amygdala bei Ratten keine Auswirkung auf das Angstverhalten im EPM hat (Treit et al. 1993). Diese unterschiedlichen Verarbeitungswege können eine Erklärungsmöglichkeit dafür sein, dass sich ein Rescue im Furcht-, nicht aber im Angstverhalten ergibt. Diese Ergebnisse stützen die Annahme der differierenden Verarbeitungswege der Furcht und der Angst, wobei die neuronale Verschaltung der Angst deutlich komplexer und rudimentärer verstanden ist als die der Furcht (Tovote et al. 2015). Dennoch wird bisher eine große Überlappung der Hirnregionen und neuronalen Verschaltungen, die das Angst- und Furchtverhalten steuern, angenommen und die neuronalen Wege zur letztendlichen Reaktion auf den Stimulus als größtenteils gleiche Endstrecke vermutet (Tovote et al. 2015). Des Weiteren stellt sich hier die Überlegung, ob die Interaktion von PRG1 und LPA2R in der Angstverarbeitung eine untergeordnete Rolle spielt, dagegen aber die Furchtreaktion maßgeblich reguliert. Ein einfacher Knockout von PRG1 hat auf Angst- und Furchtverhalten einen Einfluss, messbar durch Verhaltensänderung (Schneider 2016). Ein Hinzufügen eines LPA2R Knockout dagegen scheint nur in Bezug auf die Furcht einen Einfluss zu haben, aber keine oder eine geringere Wirkung auf die Angstverarbeitung. Dies lässt als mögliche Schlussfolgerung zu, dass es eine geringere Dichte des Rezeptors im Angst-pathway gibt, bzw. dass weitere Mechanismen für die Generierung von Angst-Verhalten bestehen, die unabhängig von PRG1 und LPA2R sind. Hierzu wären weitere Untersuchungen notwendig.

## **EPM**

Im EPM lässt sich ein signifikanter Genotypeneffekt in allen untersuchten Parametern quantifizieren. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tiere halten sich signifikant häufiger und länger auf den offenen Armen auf. Das entspricht nicht dem physiologischen Verhalten, das die Wildtypen mit einem langen Aufenthalt in den geschlossenen Armen zeigen. Auch das Betreten eines anderen Armes, also der Wechsel der Position der Maus auf dem EPM, weisen die Doppelknockout Mäusen um ein Vielfaches häufiger auf, wodurch sich in diesem Test auf eine erhöhte Aktivität schließen lässt. Die bereits oben dargestellte Hypothese eines Rescues der höheren

motorischen Aktivität kann somit nicht in vollem Umfang gelten. Dieser Unterschied der Genotypen ist unter dem Einfluss des Stimulus durch die Versuchssituation im EPM zu beobachten, im Gegensatz zum oben beschriebenen unauffälligen Verhalten im Käfig, Rota-Rod-Test oder Open Field und damit kontextabhängig. Dies führt zur These, dass es sich beim motorischen Verhalten eher um eine Tendenz zum Rescue handelt. Andererseits könnte hier auch diskutiert werden, dass dieser Effekt einer höheren Aktivität Ausdruck einer gestörten neuronalen Verarbeitung ist. Dies konnte in den thalamocortikalen Verschaltungen des Barrel-cortex bei den PRG1 defizienten Mäusen schon gezeigt werden (Unichenko et al. 2016).

Interessant ist der Vergleich der Tiere dieser Arbeit mit den PRG1 Knockout Mäusen. Hier zeigen sich nahezu identische Ergebnisse in der Anzahl des Betretens der offenen Arme des EPM. Dies belegt überzeugend, dass der zusätzliche LPA2R Knockout keinen Einfluss auf das Verhalten im EPM zeigt und damit keine Auswirkung auf dieses Angstverhalten hat.

### **Soziale Interaktion**

In der sozialen Interaktion, als zweiter Verhaltensversuch zum Test des Angst- und Sozialverhaltens, erfolgt ein weiterer Hinweis auf eine Tendenz zum Rescue. In dem Versuchsaufbau der sozialen Interaktion wird eine hohe Interaktion der Tiere mit einem weniger Angst behafteten Verhalten korreliert (File et al. 1991). Andersherum ist eine geringe Anzahl an sozialen Kontakten und wenig verbrachte Zeit in der Interaktion ein Zeichen für ein ängstliches Verhalten (File und Seth 2003; Bailey und Crawley 2009), aber möglicherweise auch Zeichen einer erhöhten Aktivität und Exploration. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tiere zeigen in der sozialen Interaktion nur ein Viertel der Kontaktzeit im Vergleich mit ihren Wildtypen. Dies spiegelt sich in dem zumeist korrelierenden Parameter der Anzahl an Kontakten nicht wider. Hier finden sich in der Häufigkeit der Kontakte keine Unterschiede zwischen den Doppelknockout Mäusen und den Wildtypen. Dem zeitlichen Faktor in der Interaktion steht allerdings ein höherer Stellenwert in der Beurteilung des sozialen Verhaltens als der Anzahl der Kontakte zu. Demnach zeigen die Doppelknockout Mäuse ein verändertes Sozialverhalten, ähnlich wie die PRG1 defizienten Mäuse. Die Vermeidung des Kontakts zu einem anderen Tier korreliert mit einem ängstlichen Verhalten. Im Vorfeld wurden hier andere Ergebnisse erwartet. In den oben dargestellten Ergebnissen im EPM zeigt sich durch ein PRG1 Mangel ein herabgesetztes Angstverhalten. Konträr dazu scheint in der sozialen Interaktion mehr Angst geäußert zu werden. Hier müssen kritisch die Lichtverhältnisse während der sozialen Interaktionstestung hinterfragt werden. Je heller die Lichtverhältnisse, desto mehr Angstverhalten wird generiert (File und Seth 2003). In der Literatur wird beschrieben, dass gedimmte Lichtverhältnisse (< 20lux) die soziale Interaktion fördern und erst damit eine Methode darstellen, um das Angstverhalten, basierend auf der Anzahl und Zeit der Kontakte zwischen den Tieren, zu beurteilen (Bailey und Crawley 2009). In unserem Versuchsaufbau wurde allerdings ein gleichmäßiges Neonlicht mit 250lux gewählt,

wodurch sich das unerwartete Ergebnis eines ängstlicheren Verhaltens der untersuchten Tiere erklären könnte. Die Lichtverhältnisse beeinflussen die Doppelknockout Tiere anders als ihre Wildtypen und damit scheint die sensorische Verarbeitung der Lichtverhältnisse als Stressor gestört zu sein (Schneider 2016). Dies wäre ein weiterer Hinweis auf eine gestörte Verarbeitung sensorischer Reize im ZNS, vor allem im Kortex. Hier sollte sich zur Validierung eine Wiederholung des Tests mit Lichtverhältnissen von < 20lux anschließen. Dennoch lässt sich eine Tendenz zum Rescue festhalten, da die Parameter des Testaufbaus der untersuchten PRG1<sup>-/-</sup> und PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tiere identisch sind, die Ergebnisse sich jedoch unterscheiden. Während die PRG1<sup>-/-</sup> Mäuse eine signifikant geringere Anzahl und weniger Zeit in der gesamten Kontaktzeit zeigen, lässt sich bei den Doppelknockout Tieren nur eine Signifikanz in der Kontaktzeit festhalten. Auch in der Zeit pro Kontakt stechen die Doppelknockout Tiere mit deutlich kürzeren Kontakten im Gegensatz zu ihren Wildtypen hervor, während die PRG1<sup>-/-</sup> Mäuse hier keinen Unterschied zu ihren Wildtypen aufweisen. Aus diesem Vergleich lässt sich entnehmen, dass das LPA2R Knockout in der sozialen Interaktion eine Auswirkung auf das Verhalten hat und eine teilweise Angleichung an die Wildtypen stattfindet, die unter den gleichen Bedingungen untersucht werden.

## TMT

Der TMT Versuch nimmt in dieser Arbeit eine besondere Rolle ein, da er nicht nur die Analyse des Verhaltens der Tiere zulässt, sondern zusätzlich ein morphologisches Korrelat bietet. Sowohl im Verhalten, als auch in der Morphologie lässt sich ein Rescue durch das Hinzufügen eines LPA2R Knockouts in PRG1<sup>-/-</sup> Mäuse erzielen.

Mithilfe der Konfrontation des Duftstoffes TMT kann die Verarbeitung der Furcht im Tierversuch untersucht werden (Day et al. 2004; Janitzky et al. 2009). Im Versuchsaufbau werden die Tiere am ersten Tag mit der Versuchsbox vertraut gemacht. In dieser sogenannten **Habituation** werden die Tiere keinem TMT Duftstoff ausgesetzt. In der Habituation zeigen sich die Doppelknockout Mäuse in allen Parametern vergleichbar zu ihren Wildtypen, außer im Rampage (Rampage = Herausziehen des Filterpapiers aus der Vertiefung). Dies weist erneut auf ein Rescue der allgemein erhöhten motorischen Aktivität der Tiere hin. Im Vergleich zeigen die PRG1<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant mehr Jumping und weniger Inactivity als die Wildtypen. Das Jumping ist in der Zusammenschau aller Ergebnisse ein Verhaltensmuster, das nur die PRG1<sup>-/-</sup> Mäuse ausführen, sowohl in der Käfighaltung als auch in der Habituation sowie deutlich häufiger in der Exposition (Schneider 2016). Das Jumping als Zeichen der Hyperexzitation und gesteigerten Aktivität erfährt ein komplettes Rescue in den Doppelknockout Mäusen.

Auffällig ist, dass in beiden Gruppen, den PRG1<sup>-/-</sup> und PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tieren, bei den Wildtypen jeweils signifikant mehr Rampage in der Habituation auftritt, während die Knockout Tiere

dieses Verhalten gar nicht oder sehr selten aufweisen. Die Wildtypen drücken durch das Rampage eine intensive und neugierige Untersuchung der Umgebung aus. Durch das zusätzliche LPA2R Knockout ergibt sich kein Rescue. Die Doppelknockout Mäuse führen genauso wie die PRG1<sup>-/-</sup> Tiere keine intensive Untersuchung der Umgebung aus. Dies ist nicht auf ein vermindertes Furchtverhalten zurückzuführen, sondern eher mit einer insgesamt reduzierten Verarbeitung sensorischer Informationen erklärbar (Schneider 2016).

Im zweiten Teil des Versuchs, der **Exposition** werden die Tiere dem TMT Duftstoff ausgesetzt und nach einer genau definierten Zeit getötet, um die durch die TMT-Exposition aktivierten Neurone später morphologisch nachweisen zu können. In der Exposition mit TMT lassen sich keine Unterschiede im Verhalten zwischen den PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tieren und ihren Wildtypen quantifizieren. Sie weisen das schon in mehreren Veröffentlichungen beschriebene Furchtverhalten von Mäusen bei Konfrontation mit TMT auf (Day et al. 2004; Takahashi et al. 2005; Buron et al. 2007; Fendt und Endres 2008; Endres und Fendt 2009). Die Tiere zeigen nach einem Drittel der Versuchszeit das typische Freezing, eine regungslose, zusammengekauerte Körperhaltung, die mindestens zwei Sekunden gehalten wird. Die Freezing Dauer und Häufigkeit nimmt mit fortschreitender Versuchszeit zu. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tiere zeigen keinen Unterschied in der Gesamtdauer des Freezingverhaltens, wohingegen sich die Häufigkeit dieses Verhaltens im Vergleich zu den Wildtypen unterscheidet. Dennoch kann dieses Ergebnis als ein Rescue gewertet werden, da zum einen die Dauer der aussagekräftigere Parameter ist und zudem die Wildtypen eine etwas geringere, allerdings nicht signifikante, Anzahl an Freezing aufweisen als die Doppelknockout Mäuse. Im Vergleich dazu weisen die PRG1<sup>-/-</sup> Tieren ein sehr eindeutiges Ergebnis auf. Ihre Wildtypen verharrten über dreimal so lange in der Schutzposition und zeigen dieses Muster signifikant häufiger. Dennoch lässt sich bei den PRG1<sup>-/-</sup> Tieren Freezing beobachten, was dafür spricht, dass eine PRG1 Mangel keinen absoluten Ausfall der Furchtreaktion bewirkt (Schneider 2016).

Die Furchtreaktion TMT Fear bei den Doppelknockout Tieren ist ebenfalls ohne Unterschied. Dies ist ein schreckhaftes, sofortiges Zurückweichen des Tieres, wenn es sich zu nah an das Filterpapier mit dem Duftstoff nähert. Es kann auch hier von einem kompletten Rescue gesprochen werden, da die PRG1<sup>-/-</sup> Tiere dieses Verhalten nur halb so oft durchführen als ihre Wildtypen und teilweise sogar über das mit TMT getränkte Filterpapier laufen (Schneider 2016).

In den weiteren, oben beschriebenen Parametern lassen sich bei den PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tieren keine signifikanten Unterschiede beschreiben, während die PRG1<sup>-/-</sup> Tiere zusätzlich zu den bereits erwähnten Unterschieden auch im Running, Grooming und der Inactivity ein signifikant unterschiedliches Verhalten gegenüber den Wildtypen aufweisen (Schneider 2016).

Zusammenfassend kann für die TMT-Exposition ein komplettes Rescue in der Furchtreaktion in den Doppelknockout Mäusen festgehalten werden.

## Morphologie

Zu dem Testverfahren mit TMT kann in der vorliegenden Arbeit auch die **Morphologie** zur Beurteilung hinzugezogen werden. Zur Darstellung der durch TMT-Exposition induzierten Gen-Aktivität in Neuronen kann das immediate-early gene c-Fos verwendet werden. Das im weiteren Verfahren immunhistochemisch markierte c-Fos ermöglicht eine morphologische Nachvollziehbarkeit der zu einem bestimmten Zeitpunkt aktivierten Neurone (Herrera und Robertson 1996). Hier stellen sich bei dem olfaktorischen Tierversuch insbesondere die Regionen der Geruchsbahn dar sowie die Furcht verarbeitenden Regionen (Sallaz und Jourdan 1996; Funk und Amir 2000). Die Regionen, die aktivierte Zellen enthalten, sind ausgewertet.

In der Auswertung der Morphologie der PRG1<sup>-/-</sup> Tiere zeigen sich signifikant mehr c-Fos positive Neurone in drei der insgesamt acht ausgewerteten Hirnregionen. Die Hirnareale mit signifikanten Unterschieden sind der OB, als erste wichtige Region in der Geruchsbahn, der OT und der MD, die als Zentren der bewussten und unbewussten Geruchsverarbeitung gelten (Schneider 2016). Die Ergebnisse stellen die erwartete Hyperexzitation durch einen Mangel an PRG1 dar und korrelieren mit den Schlussfolgerungen des TMT Verhaltensversuches, dass das fehlende Freezing und die erhöhte motorische Aktivität Ausdruck einer fehlerhaften Furchtreaktion durch diesen Knockout sind. Für die auditorische Schreckreaktion ist gezeigt, dass dabei der Thalamus involviert ist (Tovote et al. 2015). Die Aktivierung von Neuronen im MD nach TMT-Exposition ist damit der erste Hinweis, dass auch über die Riechbahn der Thalamus an der Furchtverarbeitung beteiligt ist.

Diese Untersuchungen untermauern zunächst die Hypothese, dass in PRG1 defizienten Tieren ein LPA Überschuss im synaptischen Spalt entsteht. Der Wegfall des modulierenden PRG1-Proteins führt zu einer überschießenden Reaktion an den glutamatergen Synapsen. Diese Übererregung führt zu der gestörten Verarbeitung und in der Folge zu einer veränderten Furchtreaktion unter TMT. Die Tiere zeigen deutlich weniger physiologisches Freezing und durch eine abnorme sensorische Verarbeitung eine motorische Hyperaktivität mit Jumping, das als eine Art Ersatzhandlung interpretiert werden kann.

Diesen Ergebnissen der PRG1 defizienten Tiere gilt in der Auswertung der Morphologie der Doppelknockout Tiere zunächst das Hauptaugenmerk. In allen Regionen, in denen die PRG1<sup>-/-</sup> Tiere deutlich mehr c-Fos aktivierte Zellen aufweisen, dem OB, OT und MD, zeigt sich für die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> defizienten Tiere kein Unterschied in der Zellzahl zu ihren Wildtypen.

Im morphologischen Korrelat kann somit für die Furchtreaktion ebenfalls ein vollständiges Rescue festgestellt werden.

### **Interaktion zwischen PRG1 und LPA2R**

Das PRG1 ist ein membranständiges Protein an der Postsynapse von glutamatergen Neuronen (Bräuer et al. 2003). Es interagiert mit dem Lipidphosphat LPA im synaptischen Spalt (Trimbuch et al. 2009). Dadurch kann das PRG1 von der Postsynapse den präsynaptisch lokalisierten LPA2R modulieren (Trimbuch et al. 2009; Petzold et al. 2015). PRG1 beeinflusst aktivitätsgesteuert die Konzentration von LPA im synaptischen Spalt (Zhang et al. 2000; Brindley 2004; Unichenko et al. 2016), wodurch der LPA2R durch eine Calcium Freisetzung zu einer vermehrten Glutamatergischen Hyperexzitation führt (Tokumitsu et al. 2010). Diese glutamaterge Hyperexzitation wird in eine höhere EPSC-Frequenz übergeführt und ist letztendlich eine wesentliche Grundlage für die beschriebenen Verhaltensveränderungen, wie der motorischen Hyperaktivität. Wird nun im folgenden Schritt ebenfalls ein Knockout für den LPA2R hinzugefügt, hat die erhöhte LPA Konzentration, da LPA nicht an LPA2R binden kann, im synaptischen Spalt keine glutamaterge Hyperexzitation mehr zur Folge. Dies wird bereits in einem in vitro Versuch dargelegt. Eine LPA Applikation induziert in Wildtypen eine Hyperexzitation, während diese bei einem LPA2R Knockout ausbleibt und gemessen an der EPSC wildtypähnliche Ergebnisse aufweist (Trimbuch et al. 2009). Auch die beobachteten epilepsietypischen Potentiale im EEG der juvenilen PRG1 defizienten Mäusen, werden bei den Doppelknockout Mäusen nicht beobachtet, die übersynchronisierte neuronale Aktivität kann nicht mehr nachgewiesen werden (Trimbuch et al. 2009). Ein weiterer Versuchsaufbau unterstreicht diese Ergebnisse. Bei dem Wachstumsfaktor Neurotrophin-3 (NT-3), dessen Konzentration in der Amygdala und im Hippokampus mit Angst- und Furchtverhalten korreliert (Allen und Dawbarn 2006; Yee et al. 2007), kann ebenfalls ein Rescue beobachtet werden. In dieser Studie wird das Level an NT-3 bei PRG1<sup>-/-</sup> und PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> defizienten Tiere bestimmt und eine erhöhte NT-3 Konzentration in PRG1<sup>-/-</sup> Tieren durch einen zusätzlichen Knockout von LPA2R normalisiert. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> defizienten Tiere zeigen ein ähnliches NT-3 Level im Vergleich zu ihren Wildtypen und ergeben damit ein Rescue (Petzold 2016).

PGR1 ist an der postsynaptischen Membran an exzitatorischen Synapsen glutamaterger Neurone lokalisiert, wo es die zelluläre Plastizität beeinflussen kann. An der präsynaptischen Membran oder an GABAergen Synapsen kann es bislang in mehreren Studien nicht nachgewiesen werden (Heinbockel et al. 2004; Trimbuch et al. 2009; Tokumitsu et al. 2010). Das Vorliegen an anderen Synapsen wird noch diskutiert, es liegen diesbezüglich noch keine eindeutigen publizierten Ergebnisse vor. Somit ist eine Modulation an der glutamatergen Transmission über PRG1 anzunehmen. Auch die Lokalisation des LPA2R präsynaptisch und an glutamatergen Neuronen ist bestätigt (Trimbuch et al. 2009; Streu 2013). Folglich kann

festgehalten werden, dass PRG1 modulierende Auswirkungen mindestens an glutamatergen Synapsen über die Exzitation hat, vermittelt über LPA und den LPA2R. Die Testverfahren dieser Arbeit wurden so gewählt, dass sie auch das glutamaterge Transmittersystem ansprechen, wodurch die Funktion des PRG1s bzw. des LPA2Rs untersucht werden kann. Auf dieser Grundlage wird in der Arbeit ein olfaktorischer Tierversuch mit dem Duftstoff TMT gewählt, da erstens bei Nagern der Geruchssinn hervorragend ausgebildet ist und zweitens die Neurone und Verschaltungen der Geruchsbahn in vielen Synapsen über Glutamat vermittelt werden (Pimentel und Margrie 2008; Dong et al. 2009). Mittels Doppelimmunfluoreszenz ist nachgewiesen, dass in den Hirnarealen der Geruchsverarbeitung die c-Fos markierten, aktivierten Neurone über glutamaterge Transmission funktionieren (Schneider 2016). Glutamat als vorherrschender Neurotransmitter wurde unter anderem im Nervus olfactorius, dem OB sowie in der Verknüpfung der Mitral-, Körner- und Periglomerulärzellen und auch in der weiterführenden Transduktion über den Tractus olfactorius lateralis und dem PIR nachgewiesen (Heinbockel et al. 2004; Jones et al. 2008; Pimentel und Margrie 2008; Dong et al. 2009). Dies lässt die Annahme der in dieser Arbeit vorangestellten Hypothese einer Beeinflussung der glutamatergen Transmission durch PRG1 und LPA2R festigen. In der Arbeit werden alle Hirnregionen, die c-Fos markierte Zellen aufweisen, ausgezählt. Im OB, Septum, OT, HIP, PIR, TTd, Amygdala und MD zeigen sich c-Fos aktivierte Neurone. Explizit in diesen aufgezählten Regionen wurden in anderen Arbeiten teilweise bereits Belege für das Vorliegen glutamaterger Transmission bzw. die Existenz von PRG1 dargelegt. PRG1 konnte in verschiedenen glutamatergen Regionen wie cerebellärem Cortex, cerebralem Cortex, OB, Putamen und HIP nachgewiesen werden (Tokumitsu et al. 2010). Nun lässt sich schlussfolgern, dass ein Mangel an PRG1, als integrales Membranprotein der Postsynapse glutamaterger Neurone, die glutamaterge Synapse durch seine fehlende Kontrollfunktion überaktiviert. Durch die gestörte und erhöhte Glutamatfreisetzung können die unphysiologischen, hyperaktiven Verhaltensmuster der PRG1 defizienten Tiere erklärt werden (Heinbockel et al. 2004; Jones et al. 2008; Pimentel und Margrie 2008; Dong et al. 2009). Durch einen zweifachen Knockout lässt sich belegen, dass das PRG1 seine physiologische Modulationsarbeit an der glutamatergen Synapse über den LPA2R leistet, da sich die Doppelknockout Tiere sowohl im Furchtverhalten als auch bezüglich der c-Fos markierten Neurone unauffällig zeigen.

### **c-Fos**

Die Anzahl der c-Fos markierten immunpositiven Neurone der Gruppen unterscheiden sich deutlich. Im Vergleich der Daten der PRG1<sup>-/-</sup> und PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tiere mit ihren jeweiligen Wildtypen fällt auf, dass die Anzahl der gezählten Zellen erheblich differieren. Somit können die Gruppen nicht direkt verglichen werden, sondern nur die Knockout Tiere mit ihrem jeweiligen Wildtyp Geschwistertieren. Trotz gleicher Rahmenbedingungen, verwendeter Mikroskope

und gemeinsamer Erarbeitung der Beurteilung einer c-Fos markierten Zelle, ergeben sich diese erhebliche Unterschiede bspw. im OB: Alle Schichten des OB aufsummiert zeigen die PRG1<sup>-/-</sup> Tiere im Durchschnitt 1148 markierte Zellen, ihre Wildtypen 512 (Schneider 2016). Die Gruppe der PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tiere dagegen weist 437 und deren Wildtypen 5490 aktivierte Zellen auf. Der Unterschied der markierten Zellen beträgt den Faktor 4-10. Die Versuchsparameter wurden jeweils gleich gewählt (Verhaltensmodell, Tötungszeitpunkt, Immunfärbung). Unterschieden haben sich die Zeitpunkte der Untersuchung (Zuchteffekte, Haltungsbedingungen im Tierstall) und die Untersuchenden.

Eine interessante Beobachtung lässt sich auch im Vergleich der c-Fos markierten und damit aktivierten Neurone in Bezug auf die Anzahl der gezählten, angefärbten Zellen machen. Wie erwartet zeigen die PRG1 defizienten Tiere in den signifikanten Regionen der Geruchsbahn eine deutlich höhere Anzahl an c-Fos markierten Neuronen. Auch in den nicht signifikanten Regionen lässt sich eher die Tendenz zu mehr aktivierten Zellen festhalten (Schneider 2016). Durch den zusätzlichen Knockout mit LPA2R kommt es wie oben erläutert zu einem Rescue. In den signifikanten Regionen der PRG1<sup>-/-</sup> Tiere (OB, OT, MS) zeigen sich bei den Doppelknockout Mäusen keine signifikanten Unterschiede mehr. Allerdings lässt sich hier genau die umgekehrte Tendenz beobachten und die Doppelknockout Tiere zeigen eher weniger aktivierte Neurone. In keiner der acht ausgewerteten Regionen weisen die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tiere mehr c-Fos markierte Zellen auf als ihre Wildtypen, auch nicht in den neu aufgetretenen Regionen mit einem signifikanten Unterschied. Dies lässt den Rückschluss zu, ohne dass sich hierfür bislang ein phänotypisches Korrelat beobachten lässt, dass es nicht nur zu einem Rescue kommt, sondern statt der Hyperexzitation teilweise eine Untererregung entsteht. Dies lässt sich auch anhand von EPSC-Vergleichen eruieren. Es kann auf dem Level einzelner Neurone das miniature EPSC (mEPSC) pyramidalen Zellen von CA1 bestimmt werden in PRG1<sup>-/-</sup> und PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tieren. Die Doppelknockout Tiere zeigen signifikant niedrigere mEPSCs (Trimbuch et al. 2009). Gegenüber Wildtypen weisen Neurone nur mit einem LPA2R Knockout wiederum auch niedrigere mEPSCs auf, wodurch die Hypothese eines „überschießenden“ Rescues in die Untererregung gestützt werden könnte (Trimbuch et al. 2009).

### **Zusätzliche Effekte durch den LPA2R Knockout**

Im Folgenden sollen Überlegungen bezogen auf den **LPA2R** angestellt und diskutiert werden, welche Auswirkungen dessen Knockout zusätzlich zum Rescue gegenüber den PRG1 Knockout Tieren hat. Eine alleinige Deletion des LPA2R in Mäusen zeigt einen unauffälligen Phänotyp der Tiere (Contos et al. 2002; Ohuchi et al. 2008), dennoch kann nicht davon ausgegangen werden, dass sich durch das Doppelknockout wieder ein „gesundes, normales“ Tier ergibt. Der zusätzliche Knockout von LPA2R kann zwar die entstehenden Defizite des PRG1 Mangels

teilweise aufheben, jedoch ergibt sich daraus nicht wieder eine Wildtyp Maus. Ziel dieser Arbeit war es die Interaktion des PRG1s und des LPA2Rs weiterführend zu untersuchen.

In den oben dargelegten Ergebnissen zeigen sich bei den PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tieren signifikante Unterschiede in Hirnregionen, in denen sich zwischen den PRG1 defizienten Tieren und deren Wildtypen keine Unterschiede ergeben. Daraus kann geschlossen werden, dass LPA2R ohne eine Modulation über PRG1 Effekte hat und dementsprechend andere Lokalisationen als dieses aufweist. Eine neue signifikante Differenz in der Anzahl c-Fos markierter Zellen ergibt sich im TTd, DG des Hippocampus, lateralem Septum und in der MeA. In diesen Regionen zeigen die Doppelknockout Tiere signifikant weniger aktivierte Neurone als ihre Wildtypen. Diese niedrigere Aktivierung lässt sich durch den LPA2R Knockout gut erklären, welches an der prä-synaptischen Membran über die Calcium Freisetzung zu einer Exzitation von Glutamat führt. Liegt in den betreffenden Hirnregionen an der Postsynapse kein PRG1 vor, so kommt es möglicherweise nicht zu einer erhöhten LPA Konzentration im synaptischen Spalt. An Stelle dessen kommt es nur zur Auswirkung des LPA2R Knockouts in den genannten Regionen. Der Doppelknockout präsentiert sich hier nur über den LPA2R, über dessen Mangel es zu einer Untererregung kommt.

In den neuen signifikanten Regionen (TTd, DG, lateralem Septum MeA) scheint in der Furchtverarbeitung die Interaktion zwischen PRG1 und LPA2R keine bedeutende Rolle zu spielen, obwohl beide in den genannten Regionen nachgewiesen werden können. Am Beispiel des **Gyrus dentatus** wird dies nun veranschaulicht. Sowohl das PRG1 als auch LPA2R können im DG nachgewiesen werden. Es konnte ein polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus des PRG1s generiert und damit PRG1 in glutamatergen Regionen wie im cerebellären Cortex, cerebralen Cortex, OB, Putamen und HIP quantifiziert werden (Tokumitsu et al. 2010). Bei PRG1 defizienten Tieren zeigen sich durch den TMT Stimulus aktivierte Neurone im DG, allerdings ohne Unterschied in der Anzahl zu ihren Wildtypen (Schneider 2016). Auch die Doppelknockout Tiere weisen markierte Zellen auf, jedoch mit signifikant weniger c-Fos markierten Zellen als ihre Wildtypen. Folglich scheint die Interaktion des PRG1s und des LPA2Rs in der Furchtverarbeitung von TMT im Gyrus keine zentrale Rolle zu spielen, sonst sollte sich bei den PRG1 defizienten Tiere eine höhere Zahl aktivierter Neurone und bei den Doppelknockouts ein Rescue ergeben. Beobachtet werden kann nur eine Auswirkung durch den zusätzlichen Knockout des LPA2Rs, der in der Furchtverarbeitung im DG sowie im TTd, lateralem Septum und der Amygdala eine Rolle spielt, die sich morphologisch durch weniger aktivierte Zellen ausdrückt, phänotypisch allerdings keine Auffälligkeiten zeigt.

Ein besonderes Augenmerk soll hier auch noch auf die **Amygdala** gerichtet werden. Als ein wichtiges Zentrum der Angst- und Furchtverarbeitung kommt ihr eine bedeutende Rolle im Verhalten auf einen Stressor zu. Erstaunlicher Weise zeigen sich bei den PRG1 defizienten

Tieren keine Unterschiede in der Anzahl c-Fos markierter Zellen (Schneider 2016). Durch eine Läsion der Amygdala lässt sich TMT-induziertes Freezing verhindern (Müller und Fendt 2006) und spricht ihr damit eine zentrale Schaltfunktion in der durch TMT ausgelösten Furchtverarbeitung zu. Dies lässt nur die Schlussfolgerung zu, dass ein PRG1 Mangel in der Furchtverarbeitung zwar zu signifikant weniger Freezing führt, dies aber nicht über eine Generierung in der Amygdala erklärt werden kann, sondern andere Strukturen verantwortlich zu sein scheinen. Diese Region könnte zum Beispiel das OT sein. Hier zeigen die PRG1 defizienten Tiere eine deutlich erhöhte Anzahl aktivierter Neurone und im Verhalten korrelierend eine Hyperaktivität in Form von stereotypischen Jumping (Schneider 2016). Eine Verarbeitung sensorischer, insbesondere olfaktorischer Informationen über das OT wurde durch eine gezielte Ausschaltung des OTs nachgewiesen, was zu einem unkontrollierten und stereotypischen Fehlverhalten führt (McKenzie 1972; Wesson und Wilson 2011). Durch das Hinzufügen des LPA2R Knockouts kommt es morphologisch zu einem eindeutigen Rescue. OT ist folglich eingebunden in den Verarbeitungsweg der durch TMT induzierten Furcht und wird über die Interaktion von PRG1 und LPA2R vermittelt.

Bei der Betrachtung der Regionen der Amygdala sind weitere Unterschiede zu diskutieren. Während die PRG1 defizienten Tiere in keiner der drei Hauptregionen der Amygdala Auffälligkeiten aufweisen, ergibt die aktivierte Zellzahl der PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tiere signifikant weniger Neurone im Bereich der MeA als ihre Wildtypen. Durch die TMT-Exposition aktivierte Neurone können im MeA nachgewiesen werden (Day et al. 2004; Blanchard et al. 2005; Brennan und Zufall 2006). Auch eine gezielte Inhibition der MeA kann eine deutlich reduzierte Freezing Reaktion auf die Stimulation unter TMT hervorrufen (Müller und Fendt 2006). Die BLA und CeA scheinen keine große Funktionsübernahme in der TMT-induzierten Furchtreaktion zu haben (Takahashi et al. 2007; Rosen et al. 2015). Durch eine Inhibition des BLA zeigt sich das Freezingverhalten unter TMT nur geringfügig beeinflusst (Fendt et al. 2003; Müller und Fendt 2006; Wallace und Rosen 2001). Diese Ergebnisse lassen sich mit dem PRG1 Knockout nicht nachvollziehen, aber durch den PRG1LPA2R Doppelknockout, der nur eine Auswirkung in der MeA zeigt. Eine mögliche Erklärung könnte die Vielzahl an GABAergen Interneurone in der Amygdala, insbesondere in der BLA und CeA sein (McDonald und Augustine 1993; Sosulina et al. 2006; Bienvendu et al. 2012; Tovote et al. 2015). Die BLA besteht zwar zu einem Großteil aus glutamatergen Projektionsneuronen, weist aber dennoch GABAergen Interneuronen auf, während CeA einen bedeutend größeren Anteil an GABAergen Neuronen zeigt (McDonald 1982). Diese beträchtliche Anzahl an Interneuronen lässt sich im OT beispielsweise nicht nachweisen, sodass die Interneurone mit anderen Transmittern ein Anknüpfungspunkt zur Überlegung der Auswirkung der Knockouts sein können, da diese wie oben bereits beschrieben ausschließlich an glutamatergen Synapsen vorkommen.

In adulten Tieren kann PRG1 insbesondere in LeA und BLA nachgewiesen werden (Streu 2013). Da die Furchtverarbeitung jedoch hauptsächlich über MeA läuft, hier aber PRG1 deutlich weniger präsentiert wird, kann der LPA2R Knockout nicht kompensiert werden und es kommt zur Untererregung. Dies erklärt die signifikant weniger aktivierten Neurone in der MeA in den Doppelknockout Mäusen.

Zu berücksichtigen ist zusätzlich, dass die Amygdala als zentrale Region viele Informationen sowie unspezifische Informationen erhält und damit immer aktivierte Neurone aufweist und somit eine Signifikanz in diesem Hirnareal durch Verhaltensversuche schwieriger nachzuweisen ist.

Ähnlich wie für die MeA Region lässt sich auch für das **mediale Septum** argumentieren. Ebenfalls eine Region, die unter PRG1 Mangel keine signifikanten Unterschiede ergibt, durch das Hinzukommen des LPA2R Knockouts jedoch deutlich weniger aktivierte Neurone unter TMT zeigt. Wie für die MeA ist auch für das Septum eine klare Involvierung in die Furchtverarbeitung ausgelöst durch TMT nachgewiesen (Day et al. 2004). Auch im medialen Septum ist folglich nicht von einer Interaktion des PRG1s und des LPA2Rs in der Verarbeitung von TMT-induziertem Stress auszugehen.

### **Zusammenfassung**

In einer abschließenden Zusammenfassung kann festgehalten werden, dass die vorliegende Arbeit die Interaktion des postsynaptischen PRG1 und des präsynaptischen LPA2R durch ein Rescue im Verhalten und der Morphologie darlegen kann. Die Auswirkung eines PRG1 Mangels findet über den LPA2R statt, wodurch ein Doppelknockout keine Auswirkung an Synapsen zeigt, an denen beide exprimiert werden. Die Interaktion der beiden spielt in der Furchtverarbeitung eine große Rolle, wohingegen diese in den angstverarbeitenden Regionen eher untergeordnet ist. Die Defizite eines PRG1s kann durch das Hinzufügen eines LPA2R Knockouts phänotypisch teilweise aufgehoben werden, führt auf zellulärer Ebene aber zu einer Untererregung über eine geringere Glutamat Freisetzung. Es ergibt sich also durch das Doppelknockout selbstverständlich kein neues Wildtyp Tier, allerdings können die Defizite des PRG1s aufgehoben und damit die Interaktion zwischen PRG1 und LPA2R bewiesen werden. Zusätzlich zeigen sich Effekte des LPA2R Knockouts in Regionen, in denen keine Interaktion mit PRG1 stattfindet. Eine Untererregung lässt sich morphologisch aufzeigen, die keine Effekte in den Phänotypen in den hier vorliegenden Verhaltensversuchen aufweisen.

### **Aussicht**

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit dient der Grundlagenforschung, sodass eine direkte Anwendung der Ergebnisse nicht als Ziel der Arbeit gilt. Dennoch können in der **Aussicht**

einige weiterführenden Gedanken zu praxisrelevanten Ansätzen führen. Der Ansatz der Interaktion von PRG1 und LPA2R an glutamatergen Synapsen können im Bereich der Schizophrenie interessant werden. Die Glutamathypothese der Schizophrenie kann in Tiermodellen nachgewiesen werden. Als Korrelat klinischer Aspekte einer Erkrankung mit einer Schizophrenie lassen sich im Tiermodell motorische Hyperaktivität, Stereotypien und sozialer Rückzug nachweisen (Schmitt et al. 2015). Diese Reaktionen können unter dem TMT Stressor bei einem PRG1 Knockout beobachtet und durch eine hinzugefügte Funktionsuntüchtigkeit des LPA2R behoben werden, sodass dies ein Ansatz zu einer zukünftigen medikamentösen Therapie sein könnte. Neue Untersuchungen konnten für PRG1 einen single nucleotide polymorphism nachweisen, der möglicherweise bei der Schizophrenie oder stress-induzierten Erkrankungen als Ursache eine Rolle spielen wird (Vogt et al. 2016; Thalman et al. 2019). Für eine normale Funktion des sensorischen, motorischen und kognitiven Netzwerkes ist eine Balance zwischen Exzitation und Inhibition notwendig. Eine Unausgewogenheit wird als Ursache für viele psychiatrische Erkrankungen wie zum Beispiel autism spectrum disorders (ASD), bipolare Störung oder auch Epilepsien oder neuropathische Schmerzen angenommen (Choi et al. 2010; Vogt et al. 2016; Schroeder et al. 2017). LPA als Signalträger wurde bereits in der Literatur vermutet (Choi et al. 2010), sodass auch hier der Ansatz der Interaktion zwischen PRG1 und LPA2R eine zukunftsweisende Rolle spielen könnte (Fakhoury 2015; Vogt et al. 2016; Schneider et al. 2018).

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit soll die Interaktion zwischen dem postsynaptischen plasticity related gene 1 (PRG1) und dem präsynaptisch lokalisierten lysophosphatidic acid receptor 2 (LPA2R) an glutamatergen Synapsen untersucht werden. PRG1 hat eine modulierende Wirkung über LPA, das am LPA2R zu einer Calcium Freisetzung und damit zur Freisetzung von Glutamat führt. Durch einen Knockout des PRG1 zeigen sich aufgrund einer glutamatergen Übererregung Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität, Stereotypien und verändertes Angst- und Furchtverhalten. Zur Untersuchung der Fragestellung werden Doppelknockout Tiere (PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup>) mit ihren Wildtypen verglichen. Als Verhaltensversuche werden des Elevated Plus-Maze (EPM) und die soziale Interaktion zur Testung des Angstverhaltens und eine Konfrontation mit dem Duftstoff 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) zur Objektivierung des Furchtverhaltens herangezogen. Dies mit anschließender Quantifizierung aktivierter Neurone über den Nachweis des immediate-early gene (IEG) c-Fos.

Die verhaltensbiologischen und morphologischen Veränderungen der PRG1 defizienten Tiere im TMT Versuch zeigen sich bei den PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tieren vollständig aufgehoben, sodass die Interaktion in der Furchtverarbeitung nachgewiesen ist. Das Freezing, als ein repräsentatives Verhaltensmuster von Mäusen auf den Stressor, wird bei PRG1 defizienten Tieren signifikant seltener beobachtet. Durch einen zusätzlichen LPA2R Knockout weisen die Tiere das in vielen Studien dargelegte typische Freezingverhalten im gleichen Maße wie ihre Wildtypen auf. Auch in der Morphologie lässt sich ein komplettes Rescue der signifikant erhöhten Zellzahl aktivierter Neurone in den Regionen der Geruchsbahn quantifizieren (Bulbus olfactorius, Tuberculum olfactorium, mediodorsaler Thalamus).

Durch das Doppelknockout ergeben sich weitere Hirnregionen (Dorsale Taenia Tecta, Gyrus dentatus, lateralem Septum, Amygdala), in denen sich signifikant weniger c-Fos markierte Neurone im Vergleich zu den Wildtypen nach einer TMT-Exposition nachweisen lassen. Bei PRG1 defizienten Mäusen kann allerdings keine Unterschiede zu ihren Wildtypen beobachtet werden. Dies weist zum einen auf einen Effekt allein durch den LPA2R Knockout in Regionen hin, in denen es keine Interaktion mit PRG1 zu geben scheint und zum anderen auf eine Untererregung durch den fehlenden LPA2 Rezeptor.

In der Angstverarbeitung scheint die Interaktion eine weitaus geringere Rolle zu spielen, es ergibt sich lediglich eine Tendenz zum Rescue. Die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tiere sind phänotypisch in der Käfighaltung und unter dem Stressor mit TMT unauffällig. Im Angstmodell des EPMs weisen die PRG1<sup>-/-</sup>LPA2R<sup>-/-</sup> Tiere jedoch weiterhin einen signifikant längeren Aufenthalt auf den offenen Armen auf, als Tiere mit einem PRG1 Mangel.

## 8 Literaturverzeichnis

- (1) Adolphs, R. (2013): The biology of fear. In: *Current biology* : CB 23 (2), S. 93.
- (2) Allen, S. J.; Dawbarn, D. (2006): Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. In: *Clinical science* (London, England : 1979) 110 (2), S. 175–191.
- (3) Ayers, L. W.; Asok, A.; Heyward, F. D.; Rosen, J. B. (2013): Freezing to the predator odor 2,4,5 dihydro 2,5 trimethylthiazoline (TMT) is disrupted by olfactory bulb removal but not trigeminal deafferentation. In: *Behavioural brain research* 253, S. 54–59.
- (4) Bailey, K. R.; Crawley, J. N. (2009): *Anxiety-Related Behaviors in Mice*: CRC Press/Taylor & Francis.
- (5) Bernadette (2005): *The Role of Glutamate in Anxiety and Related Disorders*, S. 820–830.
- (6) Bienvenu, T. C. M.; Busti, D.; Magill, P. J.; Ferraguti, F.; Capogna, M. (2012): Cell-type-specific recruitment of amygdala interneurons to hippocampal theta rhythm and noxious stimuli in vivo. In: *Neuron* 74 (6), S. 1059–1074.
- (7) Blanchard, D. C.; Canteras, N. S.; Markham, C. M.; Pentkowski, N. S.; Blanchard, R. J. (2005): Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29 (8), S. 1243–1253.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) Brechbuhl, J.; Klaey, M.; Broillet, M.-C. (2008): Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. In: *Science* (New York, N.Y.) 321 (5892), S. 1092–1095.
- (11) Brechbuhl, J.; Moine, F.; Klaey, M.; Nenniger-Tosato, M.; Hurni, N.; Sporkert, F. et al. (2013): Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predator scents. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (12), S. 4762–4767.
- (12) Brennan, P. A.; Zufall, F. (2006): Pheromonal communication in vertebrates. In: *Nature* 444 (7117), S. 308–315.
- (13) 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.
- (14) Bullitt, E. (1990): Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. In: *The Journal of comparative neurology* 296 (4), S. 517–530.
- (15) Buron, G.; Hacquemand, R.; Pourie, G.; Lucarz, A.; Jacquot, L.; Brand, Gerard (2007): Comparative behavioral effects between synthetic 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) and the odor of natural fox (*Vulpes vulpes*) feces in mice. In: *Behavioral neuroscience* 121 (5), S. 1063–1072.
- (16) Choi, J.; Chun, J. (2013): Lysophospholipids and their receptors in the central nervous system. In: *Biochimica et biophysica acta* 1831 (1), S. 20–32.

- (17) Choi, J.; Deron 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.
- (18) Chun, J.; Hla, T.; Lynch, K. R.; Spiegel, S.; Moolenaar, Wouter H. (2010): International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. In: Pharmacological reviews 62 (4), S. 579–587.
- (19) Conn, P. J. (2003): Physiological roles and therapeutic potential of metabotropic glutamate receptors. In: Annals of the New York Academy of Sciences 1003, S. 12–21.
- (20) Contos, J. J. A.; Ishii, I.; Fukushima, N.; Kingsbury, M. A.; Ye, X.; Kawamura et al. (2002): Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2). In: Molecular and cellular biology 22 (19), S. 6921–6929.
- (21) Craighead, W. E.; Nemeroff, C. B. (2004): The Concise Corsini Encyclopedia of Psychology and Behavioral Science: Wiley.
- (22) 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.
- (23) Davidson, R. J. (2002): Anxiety and affective style: role of prefrontal cortex and amygdala. In: Biological Psychiatry 51 (1), S. 68–80.
- (24) Davis, M. (1998): Are different parts of the extended amygdala involved in fear versus anxiety? In: Biological Psychiatry 44 (12), S. 1239–1247.
- (25) Davis, M. (2006): Neural systems involved in fear and anxiety measured with fear-potentiated startle. In: The American psychologist 61 (8), S. 741–756.
- (26) Day, H. E. W.; Masini, C. V.; Campeau, S. (2004): The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. In: Brain research 1025 (1-2), S. 139–151.
- (27) Dewan, A.; Pacifico, R.; Zhan, R.; Rinberg, D.; Bozza, T. (2013): Non-redundant coding of aversive odours in the main olfactory pathway. In: Nature 497 (7450), S. 486–489.
- (28) Dong, H. W. (2008): Allen reference atlas. A digital color brain atlas of the c57 black/6j male mouse. Hoboken: Wiley.
- (29) Dong, H.-W.; Hayar, A.; Ennis, M. (2007): Activation of group I metabotropic glutamate receptors on main olfactory bulb granule cells and periglomerular cells enhances synaptic inhibition of mitral cells. In: The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 27 (21), S. 5654–5663.
- (30) Dong, H.-W.; Heinbockel, T.; Hamilton, K. A.; Hayar, A.; Ennis, Matthew (2009): Metabotropic glutamate receptors and dendrodendritic synapses in the main olfactory bulb. In: Annals of the New York Academy of Sciences 1170, S. 224–238.
- (31) Dong, H.-W.; Petrovich, G. D.; Swanson, L. W. (2001): Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. In: Brain Research Reviews 38 (1-2), S. 192–246.
- (32) Dragunow, M.; Faull, R. (1989): The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. In: Journal of neuroscience methods 29 (3), S. 261–265.
- (33) Ehrlich, I.; Humeau, Y.; Grenier, F.; Ciocchi, Stephane; Herry, Cyril; Lüthi, Andreas (2009): Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. In: Neuron 62 (6), S. 757–771.

- (34) Endres, T.; Fendt, M. (2009): Aversion- vs fear-inducing properties of 2,4,5-trimethyl-3-thiazoline, a component of fox odor, in comparison with those of butyric acid. In: *The Journal of experimental biology* 212 (Pt 15), S. 2324–2327.
- (35) Espejo, E. F. (1997): Structure of the mouse behaviour on the elevated plus-maze test of anxiety. In: *Behavioural brain research* 86 (1), S. 105–112.
- (36) Fakhoury, M. (2015): Autistic spectrum disorders. A review of clinical features, theories and diagnosis. In: *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 43, S. 70–77.
- (37) Fendt, M.; Koch, M.; Schnitzler, H. U. (1994): Lesions of the central gray block the sensitization of the acoustic startle response in rats. In: *Brain research* 661 (1-2), S. 163–173.
- (38) Fendt, M.; Endres, T. (2008): 2,3,5-Trimethyl-3-thiazoline (TMT), a component of fox odor - just repugnant or really fear-inducing? In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 32 (7), S. 1259–1266.
- (39) Fendt, M.; Endres, T.; Apfelbach, R. (2003): Temporary inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis but not of the amygdala blocks freezing induced by trimethylthiazoline, a component of fox feces. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23 (1), S. 23–28.
- (40) Fendt, M.; Endres, T.; Lowry, C. A.; Apfelbach, R.; McGregor, I. S. (2005): TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 29 (8), S. 1145–1156.
- (41) Ferrero, D. M.; Lemon, J. K.; Fluegge, D.; Pashkovski, S. L.; Korzan, W. J.; Datta, S. R. et al. (2011): Detection and avoidance of a carnivore odor by prey. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (27), S. 11235–11240.
- (42) Figueiredo, H. F.; Bodie, B. L.; Tauchi, M.; Dolgas, C. M.; Herman, J. P. (2003): Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of central stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. In: *Endocrinology* 144 (12), S. 5249–5258.
- (43) File, S. E.; Mabbutt, P. S.; Andres, N. (1991): Diazepam withdrawal responses measured in the social interaction test of anxiety and their reversal by baclofen. In: *Psychopharmacology* 104 (1), S. 62–66.
- (44) File, S. E.; Seth, P. (2003): A review of 25 years of the social interaction test. In: *European Journal of Pharmacology* 463 (1-3), S. 35–53.
- (45) Firestein, S. (2001): How the olfactory system makes sense of scents. In: *Nature* 413 (6852), S. 211–218. DOI: 10.1038/35093026.
- (46) Fortes-Marco, L.; Lanuza, E.; Martinez-Garcia, F. (2013): Of pheromones and kairomones: what receptors mediate innate emotional responses? In: *Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)* 296 (9), S. 1346–1363.
- (47) Fourcade, O.; Simon, M. F.; Viode, C.; Rugani, N.; Leballe, F.; Ragab, A. et al. (1995): Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. In: *Cell* 80 (6), S. 919–927.
- (48) Fox, A. S.; Oler, J. A.; Tromp, D. P. M.; Fudge, J. L.; Kalin, N. H. (2015): Extending the amygdala in theories of threat processing. In: *Trends in neurosciences* 38 (5), S. 319–329.
- (49) Fukushima, N.; Chun, J. (2001): The LPA receptors. In: *Prostaglandins & other lipid mediators* 64 (1-4), S. 21–32.

- (50) Funk, D.; Amir, S. (2000): Circadian modulation of Fos responses to odor of the red fox, a rodent predator, in the rat olfactory system. In: *Brain research* 866 (1-2), S. 262–267.
- (51) Galvez, T.; Pin, J.-P. (2003): Comment fonctionne un recepteur couple aux proteines G? Le cas des recepteurs metabotropiques du glutamate et du GABA. In: *Medecine sciences : M/S* 19 (5), S. 559–565.
- (52) Grüneberg, H. (1973): A ganglion probably belonging to the N. terminalis system in the nasal mucosa of the mouse. In: *Z. Anat. Entwickl. Gesch. (Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte)* 140 (1), S. 39–52.
- (53) Hedrich, H. J.; Bullock, G. R. (2004): *The laboratory mouse*. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press (The handbook of experimental animals).
- (54) Heinbockel, T.; Heyward, P.; Conquet, F.; Ennis, M. (2004): Regulation of main olfactory bulb mitral cell excitability by metabotropic glutamate receptor mGluR1. In: *Journal of neurophysiology* 92 (5), S. 3085–3096.
- (55) Herrera, D. G.; Robertson, H. A. (1996): Activation of c-fos in the brain. In: *Progress in neurobiology* 50 (2-3), S. 83–107.
- (56) Hooks, S. B.; Santos, W. L.; Im, D. S.; Heise, C. E.; Macdonald, T. L.; Lynch, K. R. (2001): Lysophosphatidic acid-induced mitogenesis is regulated by lipid phosphate phosphatases and is Edg-receptor independent. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (7), S. 4611–4621.
- (57) Janitzky, K.; Stork, O.; Lux, A.; Yanagawa, Y.; Schwegler, H.; Linke, R. (2009): Behavioral effects and pattern of brain c-fos mRNA induced by 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a component of fox feces odor in GAD67-GFP knock-in C57BL/6 mice. In: *Behavioural brain research* 202 (2), S. 218–224.
- (58) Jones, P. J.; Xiang, Z.; Conn, P. J. (2008): Metabotropic glutamate receptors mGluR4 and mGluR8 regulate transmission in the lateral olfactory tract-piriform cortex synapse. In: *Neuropharmacology* 55 (4), S. 440–446.
- (59) Kandel, E. R. (2013): *Principles of neural science*. Part V/32: Smell and Taste: The Chemical Senses. 5th ed. New York: McGraw-Hill.
- (60) Keshavarzi, S.; Power, J. M.; Albers, E. H. H.; Sullivan, R. K. S.; Sah, P. (2015): Dendritic Organization of Olfactory Inputs to Medial Amygdala Neurons. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 35 (38), S. 13020–13028. .
- (61) Kiyokawa, Y.; Kikusui, T.; Takeuchi, Y.; Mori, Y. (2005): Mapping the neural circuit activated by alarm pheromone perception by c-Fos immunohistochemistry. In: *Brain research* 1043 (1-2), S. 145–154.
- (62) Knight, D. C.; Waters, N. S.; Bandettini, P. A. (2009): Neural substrates of explicit and implicit fear memory. In: *NeuroImage* 45 (1), S. 208–214.
- (63) Kobayakawa, K.; Kobayakawa, R.; Matsumoto, H.; Oka, Y.; Imai, T.; Ikawa, M. et al. (2007): Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. In: *Nature* 450 (7169), S. 503–508.
- (64) Korsching, S. (2002): Olfactory maps and odor images. In: *Current Opinion in Neurobiology* 12 (4), S. 387–392.
- (65) Lang, S.; Kroll, A.; Lipinski, S. J.; Wessa, M.; Ridder, S.; Christmann, C. et al. (2009): Context conditioning and extinction in humans: differential contribution of the hippocampus, amygdala and prefrontal cortex. In: *The European journal of neuroscience* 29 (4), S. 823–832.

- (66) Lanuza, E.; Nader, K.; Ledoux, J. E. (2004): Unconditioned stimulus pathways to the amygdala: effects of posterior thalamic and cortical lesions on fear conditioning. In: *Neuroscience* 125 (2), S. 305–315.
- (67) Ledoux, J. E.; Iwata, J.; Cicchetti, P.; Reis, D. J. (1988): Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8 (7), S. 2517–2529.
- (68) Liberles, S. D.; Buck, L. B. (2006): A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. In: *Nature* 442 (7103), S. 645–650.
- (69) Liberles, S. D. (2009): Trace amine-associated receptors are olfactory receptors in vertebrates. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1170, S. 168–172.
- (70) Lister, R. G. (1987). In: *Psychopharmacology* 92 (2).
- (71) 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.
- (72) Matsumoto, H.; Kobayakawa, K.; Kobayakawa, R.; Tashiro, T.; Mori, K.; Sakano, H.; Mori, K. (2010): Spatial arrangement of glomerular molecular-feature clusters in the odorant-receptor class domains of the mouse olfactory bulb. In: *Journal of neurophysiology* 103 (6), S. 3490–3500.
- (73) McDonald, A. J. (1982): Cytoarchitecture of the central amygdaloid nucleus of the rat. In: *The Journal of comparative neurology* 208 (4), S. 401–418.
- (74) McDonald, A. J. (1998): Cortical pathways to the mammalian amygdala. In: *Progress in neurobiology* 55 (3), S. 257–332.
- (75) McDonald, A. J.; Augustine, J. R. (1993): Localization of GABA-like immunoreactivity in the monkey amygdala. In: *Neuroscience* 52 (2), S. 281–294.
- (76) McKenzie, G. M. (1972): Role of the tuberculum olfactorium in stereotyped behaviour induced by apomorphine in the rat. In: *Psychopharmacologia* 23 (3), S. 212–219.
- (77) Mills, G. B.; Moolenaar, W. H. (2003): The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 3 (8), S. 582–591.
- (78) Miyamichi, K.; Amat, F.; Moussavi, F.; Wang, C.; Wickersham, I.; Wall, N. R. et al. (2011): Cortical representations of olfactory input by trans-synaptic tracing. In: *Nature* 472 (7342), S. 191–196.
- (79) Mombaerts, P.; Wang, F.; Dulac, C.; Chao, S. K.; Nemes, A.; Mendelsohn, Monica et al. (1996): Visualizing an Olfactory Sensory Map. In: *Cell* 87 (4), S. 675–686.
- (80) Morrow, B. A.; Redmond, A. J.; Roth, R. H.; Elsworth, J. D. (2000): The predator odor, TMT, displays a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. In: *Brain research* 864 (1), S. 146–151.
- (81) Müller, M.; Fendt, M. (2006): Temporary inactivation of the medial and basolateral amygdala differentially affects TMT-induced fear behavior in rats. In: *Behavioural brain research* 167 (1), S. 57–62.
- (82) Müller, R.; Bravo, R.; Burckhardt, J.; Curran, T. (1984): Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. In: *Nature* 312 (5996), S. 716–720.
- (83) Ohuchi, H.; Hamada, A.; Matsuda, H.; Takagi, A.; Tanaka, M.; Aoki, J. et al. (2008): Expression patterns of the lysophospholipid receptor genes during mouse early development. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237 (11), S. 3280–3294.

- (84) Orsini, C. A.; Maren, S. (2012): Neural and cellular mechanisms of fear and extinction memory formation. In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 36 (7), S. 1773–1802.
- (85) Pellow (1985): Validation of open" closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat.
- (86) Pessoa, L. (2010): Emotion and cognition and the amygdala: from "what is it?" to "what's to be done?". In: *Neuropsychologia* 48 (12), S. 3416–3429.
- (87) Petzold, S. (2016): Plasticity-Related-Gene-1: Unterschiede im Verhalten und in der Morphologie der Amygdala im Mausmodell.
- (88) Petzold, S.; Sommer, B.; Kröber, A.; Nitsch, R.; Schwegler, H.; Vogt, J.; Roskoden, T. (2015): 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.
- (89) Pimentel, D. O.; Margrie, T. W. (2008): Glutamatergic transmission and plasticity between olfactory bulb mitral cells. In: *The Journal of physiology* 586 (8), S. 2107–2119.
- (90) Pin, J.-P.; Acher, F. (2002): The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. In: *Current drug targets. CNS and neurological disorders* 1 (3), S. 297–317.
- (91) Root, C. M.; Denny, C. A.; Hen, R.; Axel, R. (2014): The participation of cortical amygdala in innate, odour-driven behaviour. In: *Nature* 515 (7526), S. 269–273.
- (92) Rosen, J. B.; Schulkin, J. (1998): From normal fear to pathological anxiety. In: *Psychological review* 105 (2), S. 325–350.
- (93) Rosen, J. B.; Asok, A.; Chakraborty, T. (2015): The smell of fear: innate threat of 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a single molecule component of a predator odor. In: *Frontiers in neuroscience* 9.
- (94) Roth, G.; Strüber, N. (2014): *Wie das Gehirn die Seele macht: Klett-Cotta.*
- (95) Sah, P.; Faber, E. S. L.; Lopez De Armentia, M.; Power, J. (2003): The amygdaloid complex: anatomy and physiology. In: *Physiological reviews* 83 (3), S. 803–834.
- (96) Sallaz, M.; Jourdan, F. (1996): Odour-induced c-fos expression in the rat olfactory bulb. Involvement of centrifugal afferents. In: *Brain research* 721 (1-2), S. 66–75.
- (97) Schaible, H.-G. (2006): *Neuro- und Sinnesphysiologie. Heidelberg: Springer Medizin.*
- (98) Schmitt, A.; Malchow, B.; Keeser, D.; Falkai, P.; Hasan, A. (2015): Neurobiologie der Schizophrenie. Aktuelle Befunde von der Struktur zu den Molekülen. In: *Der Nervenarzt* 86 (3), 324-6, 328-31.
- (99) Schneider, P. (2016): "Der Einfluss des plasticity related gene 1 (PRG-1) auf das Riechsystem: emotionales Verhalten sowie Veränderungen in der c-Fos Expression im Riechsystem nach Duftstoffexposition". Magdeburg.
- (100) 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.
- (101) Schroeder, J. C.; Reim, D.; Boeckers, T. M.; Schmeisser, M. J. (2017): Genetic Animal Models for Autism Spectrum Disorder. In: *Current topics in behavioral neurosciences* 30, S. 311–324.
- (102) Schünke, M.; Schulte, E.; Schumacher, U.; Voll, M. (2015): *Kopf, Hals und Neuroanatomie. Unter Mitarbeit von Michael Schünke, Erik Schulte, Udo Schumacher und Markus Voll. 4., überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme (Prometheus : LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke, Erik Schulte ; Udo Schumacher. Ill. von Markus Voll).*

- (103) Sheng, M.; Greenberg, M. E. (1990): The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. In: *Neuron* 4 (4), S. 477–485.
- (104) 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.
- (105) Shiotsuki, H.; Yoshimi, K.; Shimo, Y.; Funayama, M.; Takamatsu, Y.; Ikeda, Kazutaka et al. (2010): A rotarod test for evaluation of motor skill learning. In: *Journal of neuroscience methods* 189 (2), S. 180–185.
- (106) 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.
- (107) Sorensen, S. D.; Conn, P. J. (2003): G protein-coupled receptor kinases regulate metabotropic glutamate receptor 5 function and expression. In: *Neuropharmacology* 44 (6), S. 699–706.
- (108) Sosulina, L.; Meis, S.; Seifert, G.; Steinhäuser, C.; Pape, H.-C. (2006): Classification of projection neurons and interneurons in the rat lateral amygdala based upon cluster analysis. In: *Molecular and cellular neurosciences* 33 (1), S. 57–67.
- (109) Steimer, T. (2002): The biology of fear- and anxiety-related behaviors. In: *Dialogues in Clinical Neuroscience* 4 (3), S. 231–249.
- (110) Storan, M. J.; Key, B. (2006a): Septal organ of Gruneberg is part of the olfactory system. In: *The Journal of comparative neurology* 494 (5), S. 834–844.
- (111) Storan, M. J.; Key, B. (2006b): Septal organ of Gruneberg is part of the olfactory system. In: *The Journal of comparative neurology* 494 (5), S. 834–844.
- (112) Streu, N. (2013): Rolle des Plasticity Related Gene-1 (PRG-1) im Gehirn der Maus.
- (113) 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.
- (114) Swanson, L. W.; Petrovich, G. D. (1998): What is the amygdala? In: *Trends in neurosciences* 21 (8), S. 323–331.
- (115) Takahashi, L. K.; Hubbard, D. T.; Lee, I.; Dar, Y.; Sipes, S. M. (2007): Predator odor-induced conditioned fear involves the basolateral and medial amygdala. In: *Behavioral neuroscience* 121 (1), S. 100–110.
- (116) Takahashi, L. K.; Nakashima, B. R.; Hong, H.; Watanabe, K. (2005): The smell of danger: A behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Defensive Behavior*. In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29 (8), S. 1157–1167.
- (117) Thalman, C.; Horta, G.; Qiao, L.; Endle, H.; Tegeder, I.; Cheng, Hong et al. (2019): Correction: Synaptic phospholipids as a new target for cortical hyperexcitability and E/I balance in psychiatric disorders. In: *Molecular psychiatry*.
- (118) 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.
- (119) Tovote, P.; Fadok, J. P.; Lüthi, A. (2015): Neuronal circuits for fear and anxiety. In: *Nature reviews. Neuroscience* 16 (6), S. 317–331.
- (120) Treit, D.; Pesold, C.; Rotzinger, S. (1993): Dissociating the anti-fear effects of septal and amygdaloid lesions using two pharmacologically validated models of rat anxiety. In: *Behavioral neuroscience* 107 (5), S. 770–785.

- (121) Trimbuch, T. (2009): Untersuchung zur physiologischen Rolle von PRG-1 anhand der Generierung und Phänotypisierung von PRG 1 defizienten Mausmodellen. Freie Universität Berlin; Freie Universität Berlin, Germany.
- (122) 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.
- (123) Unichenko, P.; Kirischuk, S.; Yang, J.-W.; Baumgart, J.; Roskoden, 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.
- (124) 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.
- (125) 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.
- (126) Vernet-Maury, E.; Polak, E. H.; Demaël, A. (1984): Structure-activity relationship of stress-inducing odorants in the rat. In: *Journal of chemical ecology* 10 (7), S. 1007–1018.
- (127) 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.
- (128) Vosatka, R. J.; Hermanowski-Vosatka, A.; Metz, R.; Ziff, E. B. (1989): Dynamic interactions of c-fos protein in serum-stimulated 3T3 cells. In: *Journal of cellular physiology* 138 (3), S. 493–502.
- (129) Wallace, K. J.; Rosen, J. B. (2000): Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox feces. In: *Behavioral neuroscience* 114 (5), S. 912–922.
- (130) Wallace, K. J.; Rosen, J. B. (2001): Neurotoxic Lesions of the Lateral Nucleus of the Amygdala Decrease Conditioned Fear But Not Unconditioned Fear of a Predator Odor: Comparison with Electrolytic Lesions. In: *J. Neurosci.* 21 (10), S. 3619–3627.
- (131) Wesson, D. W.; Wilson, D. A. (2011): Sniffing out the contributions of the olfactory tubercle to the sense of smell. Hedonics, sensory integration, and more? In: *Neuroscience and biobehavioral reviews* 35 (3), S. 655–668.
- (132) Yee, B. K.; Zhu, S.-W.; Mohammed, A. H.; Feldon, J. (2007): Levels of neurotrophic factors in the hippocampus and amygdala correlate with anxiety- and fear-related behaviour in C57BL6 mice. In: *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria : 1996) 114 (4), S. 431–444.
- (133) Zald, D. H.; Pardo, J. V. (1997): Emotion, olfaction, and the human amygdala: amygdala activation during aversive olfactory stimulation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (8), S. 4119–4124.
- (134) Zhang, J.; Pacifico, R.; Cawley, D.; Feinstein, P.; Bozza, T. (2013): Ultrasensitive detection of amines by a trace amine-associated receptor. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 33 (7), S. 3228–3239.
- (135) 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.

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben: An erster Stelle geht mein Dank an meinen Doktorvater **Herrn PD Dr. med. habil. T. Roskoden**, der mir die Möglichkeit eröffnet hat, am Institut für Neuroanatomie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg direkt nach dem ersten Staatsexamen meine wissenschaftliche Arbeit zu beginnen. Von ihm konnte ich die notwendigen Arbeitsschritte in Bezug auf die Tierversuche, Laborarbeit und mikroskopische Auswertung erlernen, er stand immer mit viel Geduld und Zeit hilfsbereit zur Seite. Besonders schätze ich seine ideenreiche und nicht versiegende Begeisterung an der Diskussion über die Ergebnisse, was mich immer wieder motivierte und in den Durststrecken aufbaute.

Weiter möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Schwegler** bedanken, der mich durch den Präparationskurs überhaupt erst für die Neuroanatomie begeistern konnte und mir ebenso die Chance einer Promotionsarbeit an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg ermöglichte.

Einen besonderen Dank möchte ich **Frau A. Kröber** aussprechen, Mitarbeiterin des Institutes für Neuroanatomie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, die viele Stunden mit mir im Labor verbrachte und durch geschickten Anweisungen mich ins selbständige Arbeiten einwies und bei allen Schwierigkeiten mit konstruktiven Lösungen zu Hilfe kam. Ein herzliches Dankeschön auch an die weiteren Mitarbeiter des Instituts für die schöne Arbeitsatmosphäre und die vielen produktiven Gespräche.

Des Weiteren danke ich der Arbeitsgruppe Nitsch und Vogt der Charité Berlin, jetzt Mainz für die Zusammenarbeit und die Knockouttiere, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre sowie dem Zentralen Tierlabor der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg für die Pflege der Tiere.

Bedanken möchte ich mich auch bei **Frau Dipl.-Math. A. Lux** vom Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg für ihre Unterstützung und Ideen zur statistischen Auswertung meiner Ergebnisse.

Ich möchte mich bei meiner Familie und meinem Ehemann für die Begleitung über die vielen Jahre dieser Arbeit bedanken und freue mich insbesondere in Gedanken an meinen Vater über die Fertigstellung meiner vorliegenden Arbeit.

## 10 Ehrenerklärung

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

„Interaktion des postsynaptischen plasticity related gene 1 mit dem präsynaptischen Lyso-phosphatsäure-Rezeptor 2 im emotionalen Verhalten und der Morphologie der Maus“

am Institut für Neuroanatomie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. H. Schwegler und Herrn PD Dr. med. habil. T. Roskoden

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

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

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

Berlin, den 08.11.2020

Runa Gesine Heger

# 11 Bildungsweg

## PERSÖNLICHE DATEN

Runa Gesine Heger  
 geboren am 17. April 1990 in Berlin Zehlendorf  
 wohnhaft in der Gustav-Müller-Str. 47, 10829 Berlin  
 verheiratet, ein Kind

## ARBEITSERFAHRUNG

seit 05.2018	Auguste Viktoria Klinikum Berlin, Fachbereich Neurologie
05.2016 - 04.2018	Gemeinschaftskrankenhaus Herdecke, Fachbereich Neurologie

## AUSBILDUNG

10.2009 – 11.2015	Studium der Humanmedizin, Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg (Note 1,6)
11.2015	mündlich-praktischer Teil des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (Note 1)
10.2014	schriftlicher Teil des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (Note 2)
09.2011	Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (Note 2)
07.2009	Allgemeine Hochschulreife (Note 1,4)

## PROMOTION

11.2011 – 2020	Doktorandin am Institut für Anatomie an der Otto-von-Guericke-Universität, Magdeburg
----------------	--

## LEHRTÄTIGKEIT

05.2015 – 12.2017	Lehrtätigkeit am Dörthe-Krause-Institut in Herdecke im Fachbereich Neurologie für die Ausbildung zur Gesundheits- und KrankenpflegerInnen
-------------------	---

## STIPENDIUM

10.2010 – 10.2014	4 Jahre Stipendiatin der Hans-Jürgen-Schulz-Stiftung, Berlin
-------------------	--

Runa Gesine Heger

## 12 Anhang

### 12.1 Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1 Auflistung und Beschreibung des untersuchten Verhaltens im TMT-Versuch</i> .....	344
--	-----

### 12.2 Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1 Projektion der primären olfaktorischen Sinneszellen zu den Mitralzellen in der glomerulären Schicht des Bulbus olfactorius. Die Axone der ORNs mit dem gleichen OR projizieren in die glomeruläre Schicht des OB auf einen einzelnen Glomerulus (Firestein 2001)</i> .....	11
<i>Abb. 2 Mitralzellen projizieren zu allen fünf Regionen des olfaktorischen Cortex, während die Tuftedzellen lediglich eine Verbindung zum anterior olfaktorischer Nu-cleus und zum Tuberculum olfactorium aufweisen. Der Pathway zum Neocortex, in direkter Projektio Projektion zum piriformer und entorhinaler Cortex und über den Thalamus zum orbitofrontalen Cortex, dient der bewussten Wahrnehmung und Diskriminierung, die Verbindungen über die Amygdala und den Hypothalamus der emotionalen und unkonditionierten Verarbeitung von Gerüchen (Kandel 2013)</i> .....	12
<i>Abb. 3 Verlauf der sensorischen Neurone vom Grüneberg Ganglion und dem olfaktorischen Epithel zum Bulbus olfactorius (Xiao et al. 2013)</i> .....	13
<i>Abb. 4 Vereinfachtes Schema des Schaltkreises TMT-induzierten Freezing-Verhaltens (Rosen et al. 2015b)</i> .....	16
<i>Abb. 5 Schematische Darstellung des Aufbaus einer glutamatergen Synapse mit ionotropen Glutamat-Rezeptoren (N-methyl-D-Aspartat (NMDA), Kainate, <math>\alpha</math>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA)), metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR), vesikuläre n Transportern (vGluT1 and vGluT2 ), Glutamat-Wiederaufnahmetransportern (excitatory amino-acid transporters, EAAT1–5) und dem inhibitorischen Neurotransmitter Gamma-Aminobuttersäure (GABA) (Swanson et al. 2005)</i> .....	18
<i>Abb. 6 Familie der Lipid Phosphatasen/ Phosphotransferasen mit den Untergruppen Lipid Phosphat Phosphatasen 1 bis 3 (LPP) und den Plasticity Related Genes 1 bis 5 (PRG) (Bräuer und Nitsch 2008)</i> .....	20
<i>Abb. 7 Aufbau des humanen PRG1 mit drei extrazellulären und sechs Transmembran-Untereinheiten, sowie blau markierten intrazellulären Regionen, die den C- und N-Terminus darstellen (Bräuer und Nitsch 2008a)</i> .....	21
<i>Abb. 8 Darstellung der Regulierungsmöglichkeiten der Lysophosphatidic Acid (LPA) -Konzentration im synaptischen Spalt zum einen durch Autotaxin (ATX), einer ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase-2 (NPP2), die den Grundbaustein Lysophosphatidylchol in (LPC) zu LPA umwandelt und durch den Abbau des LPA zu Mono-Acyl-Glycerol (MAG) über das Membranproteine Lipid Phosphat Phosphatasen (LPP) (Trimbuch 2009)</i> .....	23
<i>Abb. 9 Schematische Darstellung der Exzitations-Modellierung durch Plasticity Related Gene-1 (PRG1) an der glutamatergen Postsynapse (PSD) mittels Beeinflussung der Lipidphosphat (LP)-Konzentration im synaptischen Spalt. Die linke Synapse stellt die physiologische Situation dar. Die mittlere ein PRG1 Knockout, wodurch die regulatorische Funktion aufgehoben wird und es zur erhöhten EPSP Antwort kommt und die rechte Synapse ein PRG1 und ein LPA2Rezeptor (LPA2R) Doppelknockout, wodurch die präsynaptisch LPA2R vermittelte Signaltransduktion zusätzlich ausgeschaltet wird und somit das PRG1 Knockout keine Beeinflussung der Transmission mehr zeigt (Trimbuch et al. 2009)</i> .....	25

Abb. 10 Schematische Abbildung zur Darstellung der Aufenthaltswahrscheinlichkeit in den offenen oder geschlossenen Armen in Bezug auf das Maß an Angst (Tovote et al. 2015)	30
Abb. 11 Elevated Plus-Maze mit einer Maus im Zentrum	31
Abb. 12 TMT-Box mit einem Versuchstier während der Habituation (H503) zum Zeitpunkt einer „Leaning“ Situation aufgenommen	33
Abb. 13 TMT-Box mit einem Versuchstier während der Exposition (T204) mit TMT zum Zeitpunkt einer „Freezing“ Reaktion	33
Abb. 14 Präparationsareal: Pumpe, NaCl-Lösung, Fixationslösung, Präparierunterlage, Präparierbesteck (Scheren, Pinzetten, Skalpelle), Probenbehälter, Abfallbehälter (von links nach rechts) (Schneider 2016)	35
Abb. 15 Elevated Plus-Maze: Vergleich der Anzahl des Betretens der offenen und geschlossenen Arme sowie des Zentrums. Die PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> zeigen eine signifikant höhere Frequenz im Betreten aller Bereiche im Vergleich zu den PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> , offene Arme (p=0,001), geschlossene Arme (p=0,01), Zentrum (p=0,000); (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; ** p<0,01 *** p<0,001 T-test, ANOVA, einfaktoriell)	38
Abb. 16 Elevated Plus-Maze: Vergleich der gesamten Verweildauer in [s] auf den offenen und geschlossenen Armen sowie im Zentrum. Die PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> verbringen deutlich längere Zeiten auf den offenen Armen (p=0,002), weniger auf den geschlossenen (p=0,001) und vergleichbar viel Zeit im Zentrum (p=0,381) (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; *** p<0,001 T-test, ANOVA, einfaktoriell)	39
Abb. 17 Elevated Plus-Maze: Vergleich der Verweildauer pro Armbesuch in [s] auf den offenen und geschlossenen Armen sowie im Zentrum. Die PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> verbringen pro Betreten der offenen (p<0,05) und der geschlossenen Arme (p=0,000) sowie des Zentrums (p<0,01) signifikant weniger Zeit (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 T-test, ANOVA, einfaktoriell)	40
Abb. 18 Soziale Interaktion: Dauer des Kontakts in [s]. Die PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> zeigen einen signifikant kürzeren Kontakt im Vergleich zu den Wildtypen (p<0,0001); (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; *** p<0,001 T-test)	41
Abb. 19 Soziale Interaktion: Anzahl der Kontakte innerhalb einer Zeitspanne von 600 [s]. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Wildtypen (p=0,38) (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; T-test)	41
Abb. 20 A,B Habituation: A Anzahl und B Zeit [s] der Verhaltensmuster während der Habituation. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede für das Verhalten Inactivity (Anzahl: p=0,334; Zeit: p=0,37) und Rearing (Anzahl: p=0,442; Zeit: p=0,42). Der einzige Unterschied in der Habituation zeigt sich in der Anzahl des Rampage-Verhaltens (p=0,02), die PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> weisen dieses Verhalten gar nicht auf PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; * p<0,05 T-test)	43
Abb. 21 Exposition: A Anzahl und B Zeit [s] der Verhaltensmuster Freezing, Grooming, Jumping und TMT Fear während der Exposition. A Freezing und Grooming zeigen sich in der Anzahl signifikant mit p=0,038 und p=0,023, bei nicht signifikanten Jumping (p=0,4) und TMT-Fear (p=0,67). B In Bezug auf die Zeit zeigen sich keine Signifikanzen beim Freezing (p=0,26), Grooming (p=0,071) und Jumping (p=0,4); (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; * p<0,05 T-test)	45
Abb. 22 Bulbus olfactorius: Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone [n]. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede, aufgegliedert nach den Schichten des OB: gl (p=0,638); mi+gr+pl (p=0,383) und gl+mi+gr+pl (p=0,194); (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; T-test)	48
Abb. 23 Bulbus olfactorius: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 10 bis 26, Bregma 4,445mm A bis 2,745mm B (Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ); (Maßstab: 2mm)	48
Abb. 24 Bulbus olfactorius mit Teilausschnitt der mi, gr und pl Schicht: 40-fache Vergrößerung, coronar level 15, Bregma 4,445mm; A Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> B Maus 89: PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> ; (Maßstab: 50µm)	49
Abb. 25 Septum: Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone [n]. Die PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> zeigen eine signifikant höhere Anzahl (p=0,044), wobei sich der DB als ausschlaggebende	

Region für die Signifikanz zeigt ( $p=0,015$ ), das MS hingegen ergibt keine Signifikanz ( $p=0,143$ ); (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; * $p<0,05$ T-test) .....	49
Abb. 26 Septum: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 44, Bregma 1,045mm (Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ); (Maßstab: 2mm) .....	50
Abb. 27 Septum: 40-fache Vergrößerung, coronar level 44, Bregma 1,045mm; A Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ; B Maus 89: PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> ; (Maßstab: 50µm) .....	50
Abb. 28 Tuberculum Olfactorium: Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone [n]. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,113$ ), (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; T-test).....	51
Abb. 29 Tuberculum Olfactorium: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 35, Bregma 1,946mm (Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ); (Maßstab: 2mm) .....	51
Abb. 30 Tuberculum Olfactorium: 40-fache Vergrößerung, coronar level 41, Bregma 1,315mm; A Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ; B Maus 89: PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> ; (Maßstab: 50µm) .....	52
Abb. 31 Hippocampus: Anzahl der c-Fos aktivierten Neurone [n]. Die PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> zeigen signifikant weniger aktivierte Zellen ( $p=0.001$ ); (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; *** $p<0.001$ T-test) .....	52
Abb. 32 Hippocampus: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 68 bis 81, Bregma -1,355mm A bis -2,70mm B (Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ); (Maßstab: 2mm) .....	53
Abb. 33 Hippocampus: 40-fache Vergrößerung, coronar level 68, Bregma -1,355mm; A Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ; B Maus 89: PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> ; (Maßstab: 50µm) .....	53
Abb. 34 Piriformer Cortex: Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone [n]. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,116$ ); (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; T-test).....	54
Abb. 35 Piriformer Cortex: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 42 bis 78, Bregma 1,245mm A bis -2,355mm B (Maus 59 PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ); (Maßstab: 2mm) .....	54
Abb. 36 Piriformer Cortex: 40-fache Vergrößerung, coronar level 42, Bregma 1,245mm; A Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ; B Maus 89: PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> ; (Maßstab: 50µm).....	54
Abb. 37 Dorsale Taenia Tecta: Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone [n]. Die PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> zeigen signifikant weniger aktivierte Neurone ( $p=0,008$ ); (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; * $p<0,05$ T-test) .....	55
Abb. 38 Dorsale Taenia Tecta: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 31 bis 40, Bregma 2,315mm A bis 1,42mm B (Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ); (Maßstab: 2mm) .....	56
Abb. 39 Dorsale Taenia Tecta: 40-fache Vergrößerung, coronar level 31, Bregma 2,315mm; A Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ; B Maus 89: PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> ; (Maßstab: 50µm) .....	56
Abb. 40 Amygdala (BLA, MeA, CeA): Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone [n]. Die PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> zeigen im Bereich der MeA signifikant weniger aktivierte Neurone ( $p=0,047$ ); (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; * $p<0,05$ T-test) .....	57
Abb. 41 Amygdala: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 66 bis 75, Bregma -0,755mm A bis -2,055mm B (Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ); (Maßstab: 2mm).....	57
Abb. 42 MeA: 40-fache Vergrößerung, coronar level 67, Bregma -1,255mm; A Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ; B Maus 89: PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> ; (Maßstab: 50µm) .....	57
Abb. 43 Mediodorsaler Thalamus: Anzahl der c-Fos immunpositiven Neurone [n]. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,066$ ); (PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> n=10; PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> n=10; T-test).....	58
Abb. 44 Mediodorsaler Thalamus: 10-fache Vergrößerung der Übersichtsfärbung mit Nissl, coronar level 61 bis 74, Bregma -0,655mm A bis -1,955mm B (Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ); (Maßstab: 2mm).....	58
Abb. 45 Mediodorsaler Thalamus: 40-fache Vergrößerung, coronar level 61, Bregma -0,655mm; A Maus 59: PRG1 <sup>+/+</sup> LPA2R <sup>+/+</sup> ; B Maus 89: PRG1 <sup>-/-</sup> LPA2R <sup>-/-</sup> ; (Maßstab: 50µm) .....	59

## 12.3 Protokolle

Die Serien eins und zwei wurden für dreimal zehn Minuten in 0,1M Phosphatpuffer, pH 7,4 gespült und nach Nissl bzw. mit c-Fos-Immunhistochemie angefärbt. Die Serien drei und vier wurden für die spätere Doppelimmunfluoreszenz in Kryoprotektionslösung (150g Saccharose + 300ml Ethylenglycoll + das Volumen von 0,05M Phosphatpuffer für 1 Liter) überführt und bei -20°C im Tiefkühlschrank eingelagert.

### 12.3.1 Nisslfärbung

Die erste Serie wurde als Übersichtsfärbung mit dem Nissl-Schema nach folgendem Ablauf gefärbt: Zu Beginn wurde eine Acetat-Pufferlösung aus einem Teil 2,72%igem Natriumacetat und vier Teilen 1,20%iger Essigsäure hergestellt und anschließend der pH Wert auf 3,8- 4,0 eingestellt. Zu 100ml Acetatpuffer wurde 0,5g Kresylechtviolett gegeben. Danach folgte die zweiminütige Inkubation der Schnitte in der zu Beginn hergestellten und zuvor filtrierten gepufferten Kresylechtviolett-Farblösung. Im weiteren Verlauf wurden die aus der Farblösung entnommenen Schnitte mit Acetatpuffer abgespült und in zwei absoluten Alkohol-Lösungen differenziert und entwässert. Zur vollständigen Entwässerung der Präparate erfolgte zum Abschluss das Spülen in Xylol I und Xylol II. Zur Konservierung wurden die Schnitte schlussendlich mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Deckgläschen eingedeckt.

### 12.3.2 c-Fos Immunhistochemie

Die zweite Serie wurde nach der free floating Methode, mit Hilfe der Avidin-Biotin-Methode immunhistochemisch angefärbt. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte zu Beginn 10 Minuten mit einer Blockierungslösung (9,5ml 0,1M PB, 500µl Methanol und 100µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) behandelt. Im Anschluss an ein dreimal zehnminütiges Spülen mit 0,1M PB erfolgte die Inkubation der Schnitte in 0,1M PB, 10% Rinderserumalbumin, 10% Normal Goat Serum und 0,3% Triton zur Blockierung der unspezifischen Reaktionen bei polyklonalen Antikörpern für 30 Minuten. Im Anschluss inkubierten die Schnitte in der primären Antikörperlösung im Verhältnis 1:5000 mit 0,1M PB, 1% Normal Goat Serum und 0,3% Triton für 2 Tage bei 4°C auf dem Schüttler Stufe 2. Der primäre Antikörper gegen c-Fos ist ein polyklonaler rabbit Antikörper (Abcam, Cambridge, United Kingdom) welcher bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt wurde. Nach dreimal zehnminütigem Spülen mit 0,1M PB wurde im sekundären, biotinylierten anti-rabbit Antikörper (Vector Lab, Burlingame, USA) 1,5 Stunden inkubiert (0,1M PB und sekundärer Antikörper 1:200). Nach einer weiteren dreimal zehnminütigen Waschphase mit 0,1M PB erfolgte die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (Vector Lab, Burlingame, USA). Zur Herstellung dieses Komplexes wurden 1ml 0,1M PB mit 8,8µl der Lösung A und 8,8µl der Lösung B versetzt und eine Stunde zu den Gefrierschnitten gegeben.

Auf dreimal 10 minütiges Spülen folgte die Anfärbung in Diaminobenzidin (20ml 0,1M PB, 1ml steril filtrierte DAB (Sigma, St. Louis, USA) und 220µl von 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Unter mikroskopischer Kontrolle der DAB Reaktion wurde diese nach circa 20 Minuten durch Spülen mit 0,1M PB gestoppt. Im Anschluss wurden die angefärbten Schnitte auf Super frost Plus-Objektträger aufgezogen, über Nacht im Wärmeschrank bei 37°C getrocknet und am Folgetag nach aufsteigender Dehydrierung in der Alkoholreihe mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Deckgläschen zur dauerhaften Fixierung eingedeckt.