

Aus dem Institut für Physiologie der Universität Würzburg
- Lehrstuhl für vegetative Physiologie I -
Vorstand: Professor Dr. med. Michaela Kuhn

**Quantifizierung morphologischer Veränderungen
an Neuronen der lateralen Amygdala in SPRED2-
defizienten Mäusen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Martin Zechner
aus Würselen

Würzburg, Januar 2018



Referent: Prof. Dr. med. Kai Schuh

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Angelika Schmitt-Böhrer

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Philip Tovote

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

13. November 2018

Der Promovend ist Zahnarzt.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Betreuung von

Herrn Prof. Dr. med. Kai Schuh

am Physiologischen Institut
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Teile dieser Dissertation wurden bereits in einer

wissenschaftlichen Publikation

veröffentlicht.

Für meine geliebten Eltern

Eigene Beteiligung

Die folgenden Versuche und Messungen wurden selbstständig und vollständig von mir durchgeführt:

- Morphologische Analyse von Neuronen der Amygdala aus SPRED2-defizienten und Wildtyp-Mäusen mithilfe des NeuroLucida Systems
- Auswertung inklusive statistischer Analyse der gewonnenen Daten im Hinblick auf die Verhaltensstörung der SPRED2-defizienten Mäuse

Von Frau Marion Winnig, Mitarbeiterin der AG von Frau Priv.-Doz. Dr. Angelika Schmitt-Böhler in der Klinik für Psychiatrie in Würzburg, durchgeführte Methoden:

- Imprägnierung der Mäusehirne nach Golgi van der Loos und Herstellung der Schnittpräparate

Die Züchtung und Genotypisierung der verwendeten SPRED2-KO Mäuse wurde von Frau Dr. Melanie Ullrich vom Institut für Physiologie der Universität Würzburg durchgeführt.

Würzburg, Januar 2018

Martin Zechner

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	
Tabellenverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	
1. Einleitung.....	1
1.1. Die Zwangsstörung.....	1
1.1.1. BDNF und TrkB/ NTRK2.....	3
1.1.2. Ras/ERK-MAPK-Signalweg.....	4
1.2. Die Familie der SPRED-Proteine.....	6
1.2.1. SPRED2	9
1.3. Die Amygdala	13
1.3.1. Die Laterale Amygdala	16
1.3.2. Pyramidenzellen in der Amygdala	18
1.4. Elektrophysiologische Messungen im lateralen Kern der Amygdala nach Stimulation der afferenten thalamischen Fasern.....	19
1.5. Fragestellung und Ziel der vorliegenden Dissertation.....	21
2. Material und Methoden	25
2.1. Mäuse als Versuchstiere	25
2.1.1. Generierung der SPRED2-KO-Mäuse.....	25
2.1.2. Zucht- und Haltungsbedingungen der Mäuse.....	26
2.1.3. Genotypisierung der SPRED2-defizienten Mäuse.....	26
2.1.4. Merkmale der verwendeten Mäuse	30
2.1.5. Entnahme der Hirne	32
2.2. Herstellung der Schnittpräparate	32
2.2.1. Golgi-Cox-Imprägnierung nach Glaser und Van der Loos	32
2.2.2. Dehydratisierung	34

2.2.3. Einbettung in Celloidin	34
2.2.4. Herstellung der Schnitte mit anschließender Fixierung	35
2.3. Das Neurolucida-System	36
2.3.1. Hard- und Software	36
2.3.2. Einstellungen	36
2.3.3. Auswahlkriterien der zu analysierenden Neuronen	37
2.3.4. Rekonstruieren der Dendriten und Spines.....	37
2.3.5. Gemessene Parameter	39
2.3.6. Statistik.....	40
3. Ergebnisse	43
3.1. Genotypisierung der SPRED2-KO-Mäuse.....	43
3.2. Lokalisation der lateralen Amygdala und Auswahl der Neuronen.....	44
3.3. Rekonstruktion der Neuronen.....	46
3.4. Quantitative Analyse der Morphologie der Pyramidenzellen der LA	49
3.4.1. Somafläche.....	49
3.4.1. Dendritenlänge	50
3.4.2. Spines	54
3.4.3. Branch points.....	57
3.4.4. Zusammenfassung	58
4. Diskussion	61
4.1. Zusammenhang zwischen SPRED2, Spine-Morphologie und Elektrophysiologie.....	61
4.2. Beeinflussung des CSTC-Regelkreises durch die Amygdala in SPRED2-KO-Mäusen in Bezug auf OCD	64
4.3. Die in SPRED2-KO-Mäusen erhöhte Aktivität des TrkB/BDNF-ERK Signalwegs führt zu OCD-ähnlichem Verhalten.....	65
4.4. SPRED2 als neuer Faktor in der OCD Pathogenese.....	66

4.5. Modifizierung des Modells zur Pathogenese von OCD.....	68
4.6. Biomarker und Tumorthherapie	69
5. Ausblick	75
6. Zusammenfassung.....	77
7. Literaturverzeichnis	81
8. Anhang	
8.1. Danksagung	
8.2. Lebenslauf	

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Durch Bindung von BDNF an TrkB ausgelöste intrazelluläre Signalkaskaden	6
Abbildung 2: Domänenstruktur der SPRED-Proteine	7
Abbildung 3: Darstellung möglicher Angriffspunkte von SPRED2 im BDNF/TrkB-ERK-Signalweg	10
Abbildung 4: Die genomische Spred2-Struktur mit den jeweils für das SPRED2-Protein codierenden Domänen	11
Abbildung 5: Schematischer Aufbau der tiefen Amygdalakerne mit intraamygdaloiden Verbindungen	17
Abbildung 6: Schematischer Hirnschnitt mit Darstellung repräsentativer Positionen der thalamischen Faserstimulierung und der Messung in der lateralen Amygdala.....	19
Abbildung 7: Gene-Trap Vektor, der in das SPRED2-Gen eingefügt wurde.....	25
Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese für die Genotypisierung der Mäuse,	43
Abbildung 9: Übersichtsaufnahme eines koronaren Schnittes des Hirns einer SPRED2-KO-Maus.....	44
Abbildung 10: Basaler und lateraler Kern der Amygdala.	45
Abbildung 11: Ein mit der Neurolucida-Software rekonstruiertes vollständiges pyramidales Neuron der LA einer SPRED2-KO-Maus	46
Abbildung 12: Pyramidales Neuron der LA einer SPRED2-KO-Maus (100x-Objektiv)	47
Abbildung 13: Ein mit der Neurolucida-Software rekonstruiertes pyramidales Neuron der LA einer SPRED2-KO-Maus (100x-Objektiv).	48
Abbildung 14: Mittlere Somafläche der Neuronen amygdaloider Neuronen.....	50
Abbildung 15: Verteilung der Gesamtlänge aller Dendriten nach Branch order 1-4.....	51
Abbildung 16: Verteilung der mittleren Länge der basalen Dendriten nach Branch order 1-4.....	52

Abbildung 17: Verteilung der mittleren Länge des apikalen Dendriten nach Branch order 1-4.....	53
Abbildung 18: Verteilung der aufsummierten Längen der basalen und des apikalen Dendriten und deren Summe.....	54
Abbildung 19: Verteilung der Gesamtzahl der Spines an basalen und apikalen Dendriten.....	55
Abbildung 20: Verteilung der Gesamtzahl der Spines in Branch order 1-4	56
Abbildung 21: Verteilung der Anzahl der Spines/10 μm nach Branch order 1-4.....	57
Abbildung 22: Verteilung der Anzahl der Branch points/100 μm an basalen und apikalen Dendriten.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anatomische Aufteilung der Amygdala in ihre Kerngruppen, Kerne und Unterkerne (Pitkanen et al., 1997)	14
Tabelle 2: Zusammensetzung des alkalischen Lysepuffers (Lösung 1)	27
Tabelle 3: Zusammensetzung der Neutralisationslösung (Lösung 2).....	27
Tabelle 4: PCR-Master-Mix	28
Tabelle 5: PCR-Primer	28
Tabelle 6: PCR-Zyklus	29
Tabelle 7: Merkmale der WT-Mäuse	31
Tabelle 8: Merkmale der KO-Mäuse.....	31
Tabelle 9: Zusammensetzung der Imprägnierlösung.....	33
Tabelle 10: Ethanol-Reihe.....	34
Tabelle 11: Reihe mit Celloidin unterschiedlicher Konzentration	35

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
AB	Akzessorischer basaler Kern der Amygdala
ACC	Anteriorer cingulärer Kortex
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AGM	Aorta-Gonaden-Mesonephros Region
AKT	Proteinkinasen B
B	Basaler Kern der Amygdala
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BLA	Basolateraler Anteil der Amygdala
Bnl	Branchless
bp	Basenpaar
Ca ²⁺	Calcium
CaMK	CaM-abhängige Kinase
CE	Zentraler Kern der Amygdala
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CRH	Corticotropin-releasing hormone
CSTC	Cortico-striato-thalamo-cortical
D ₂	Dopamin 2-Rezeptor
D ₃	Dopamin 3-Rezeptor
dACC	Dorsaler anteriorer cingulärer Kortex
DAG	Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonucleic acid; Desoxyribonukleinsäure
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
ERC1	ELKS/RAB6-Interacting/CAST Family Member 1
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
EtOH	Ethanol

EVH-1	Enabled/VASP homology 1 domain
Ex	Exon
FGF	Fibroblast growth factor; Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3; Fibroblasten Wachstumsfaktor Rezeptor 3
fMRT	Funktionelle Magnetresonanztomographie
GDP	Guanosindiphosphat
GIT	Gastrointestinaltrakt
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
HCC	Hepatocellular carcinoma; Leberzellkarzinom
HET	Heterozygot
HgCl ₂	Quecksilber(II)-chlorid, Sublimat
HHNA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HPC	Hippocampus
IP3	Inositoltrisphosphat
K ₂ Cr ₂ O ₇	Kaliumdichromat
K ₂ CrO ₄	Kaliummonochromat
KBD	c-Kit bindende Domäne
KO	Knockout
LA	Lateraler Kern der Amygdala
Ldl	Lateraler Kern der Amygdala, dorsolaterale Division
Lm	Lateraler Kern der Amygdala, mediale Division
Lvl	Lateraler Kern der Amygdala, ventrolaterale Division
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MD	Medio-dorsaler Kern des Thalamus
MDD	Major Depressive Disorder

MEK	Dual specificity mitogen-activated protein kinase
mEPSP	Mini-exzitatorisches postsynaptisches Potential
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
mRNA	messenger ribo nucleic acid; Boten-Ribonukleinsäure
NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase Typ 2
OCD	Obsessive-compulsive Disorder; Zwangsstörung
OFC	Orbitofrontal cortex; Orbitofrontaler Kortex
P	Pyrophosphat
pA	Polyadenylierungssequenz
PCR	Polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phosphoinositid-Phospholipase C- γ
PPI	Präpulsinhibition
PSD95	Postsynaptic density protein 95
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonucleic acid; Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SA	Splice acceptor
SAPAP3	SAP90/PSD95-associated protein 3
SHC	Src homology 2 domain containing
SLITRK5	SLIT and NTRK-like family member 5
SOS	Son of Sevenless
SPR	Sprouty-Domäne
SPRED	Sprouty-related protein with EVH1 domain
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitor; selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAN	Tonically active neuron
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Die Zwangsstörung

Die Zwangsstörung, oder in der englischen Sprache auch Obsessive-compulsive Disorder (OCD) genannt, ist eine weit verbreitete neuropsychologische Erkrankung. Zwischen 2-3 % der Bevölkerung (Doshi, 2011; Flores Alves dos Santos and Mallet, 2013) leiden an dieser Krankheit, die durch immer wiederkehrende zwanghafte Gedanken (*obsessions*) und deren Kompensation durch zwanghafte Tätigkeiten, die immer wieder durchgeführt werden (*compulsions*), charakterisiert ist. Jedoch findet die betroffene Person keine befriedigende Kompensation, sodass erneut Zwangsgedanken und somit auch Zwangshandlungen folgen. Abgesehen davon, dass diese Tätigkeiten oft sehr zeitaufwendig sind, wissen die Patienten in den meisten Fällen, dass Sie krank sind, was in Kombination eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität bedeuten kann. Nicht selten ist OCD mit Depressionen oder Angstzuständen vergesellschaftet (Miguel et al., 2005). Durch Studien wurden bisher vier verschiedene Subtypen der OCD definiert: die Angst der Verunreinigung in Verbindung mit einem Putz- oder Reinigungszwang, der Sucht zur Symmetrie und damit zusammenhängende Ordnungszwänge, der Drang zur Anhäufung von Dingen mit der daraus resultierenden exzessiven Sammlung dieser und zuletzt aggressive/sexuelle/religiöse/somatische Manien mit Überprüfungszwängen (Leckman et al., 1997). Obwohl die Krankheit sowohl in ihren Ängsten, als auch in ihren Zwängen sehr variieren kann, zeigen alle Subtypen Gemeinsamkeiten, welche sich im klinischen Phänotyp und der zugrundeliegenden Pathophysiologie finden lassen (Miguel et al., 2005). Des Weiteren gibt es eine Reihe von Erkrankungen, die mit OCD in Verbindung gebracht werden, da sie viele gemeinsame Eigenschaften aufweisen (Browne et al., 2014), wie zum Beispiel die Trichotillomanie und Skin Picking Disorder (Dermatillomanie), die Ticstörung, wie das Tourette-Syndrom und auch autistische Störungen.

Wie bei vielen anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen auch, ist der neurobiologische Ursprung der OCD immer noch unklar. Zahlreiche

Untersuchungen und Studien mit funktionellem Neuroimaging haben eine Beziehung zwischen den OCD Symptomen und einer Veränderung in der Aktivität des kortiko-striato-thalamo-kortikalen (CSTC)-Regelkreises ergeben (Aouizerate et al., 2004; Graybiel and Rauch, 2000). Für die Pathogenese der OCD scheint eine Hyperaktivität im orbitofrontalen Cortex (OFC) und ventromedialen Striatum eine große Rolle zu spielen. Auch wenn eine akute Stimulierung (deep brain stimulation) dieser Region in der Maus keine zwanghaften, sich wiederholende Tätigkeiten hervorruft, kann eine Stimulierung über einen längeren Zeitraum dies sehr wohl (Ahmari et al., 2013). Außerdem wurde herausgefunden, dass OCD mit einer verminderten Verfügbarkeit von Dopamin 2 (D2) Rezeptoren im Striatum zusammenhängt (Schneier et al., 2008). D2 ist für die intrazelluläre Signalübermittlung zuständig und aktiviert Kalium-Kanäle, welche das Ruhepotential von Nervenzellen stabilisieren. Somit kann eine verminderte Aktivierung dieser Kanäle zu einer vermehrten Entstehung von Aktionspotentialen in Nervenzellen führen. Zusätzlich wird aktuell eine Beteiligung der Amygdala bei der Entwicklung und Ausprägung einer OCD diskutiert und bleibt zu überprüfen (Milad and Rauch, 2012). OCD ist durch eine Beeinträchtigung des sensorischen Gatings, eine Unterdrückung von Reizen während der Verarbeitung eines anderen spezifischen Reizes, charakterisiert. Gemessen wird dies via Präpulsinhibition (PPI), eine Methode, bei der eine Reizamplitude geringer ausfällt, wenn ihr ein schwächerer Reiz vorausgeht. Nun ist es so, dass bestimmte Serotoninrezeptoren, wie zum Beispiel 5-HT_{1B}, über Agonisten die PPI beeinträchtigen können und OCD-ähnliche Symptome hervorrufen können. Dieser Zusammenhang zwischen dem 5-HT_{1B}-Rezeptor und der PPI tritt in der Form nur in zwei Regionen auf: im OFC und der Amygdala (Pittenger et al., 2016). Hinzu kommt, dass die Amygdala das einheitliche Zentrum für Emotionen und emotionales Verhalten darstellt und nach aktuellen Ergebnissen zugleich für die Entstehung und Übermittlung von Angst verantwortlich ist (Davis and Whalen, 2001; Janak and Tye, 2015).

Auch wenn einige Familien- und Zwillingsstudien eine signifikante genetische Komponente für OCD und verwandte Erkrankungen aufzeigen (Black et al.,

1992; van Grootheest et al., 2005), konnte bisher noch kein spezifisches Gen als definitives Risiko-Gen eingestuft werden (Browne et al., 2014). Zudem wurde durch diese Studien mit Hilfe der sogenannten Yale-Brown Obsessive-Compulsive Scale symptom checklist (Goodman et al., 1989) herausgefunden, dass sich einige Subtypen der OCD, wie zum Beispiel die Sucht zur Symmetrie und der Ordnungszwang, oder aggressive/sexuelle Manien mit Überprüfungszwängen, häufiger als andere in der Familie manifestieren (Pauls and Alsobrook, 1999). Seitdem entdeckt wurde, dass OCD mit selektiven Serotonin Reuptake Inhibitoren (SSRIs), wie zum Beispiel Fluoxetin, behandelt werden kann, werden Mutationen in Genen, die für Serotonintransporter codieren, als ein möglicher Ursprung der Krankheitsentstehung gesehen (Taylor, 2013).

1.1.1. BDNF und TrkB/ NTRK2

In der Metaanalyse von Taylor aus dem Jahr 2013 wurden sämtliche Gene auf einen Bezug zu OCD untersucht. Zusätzlich zu den besagten für die Serotonintransporter codierenden Genen wurde eine Beteiligung von glutamatergen und dopaminergen Neurotransmittersystemen, ebenso wie dem Wachstumsfaktor brain-derived neurotrophic factor (BDNF) und seinem Rezeptor tropomyosin receptor kinase B/neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (TrkB/NTRK2) nachgewiesen (Taylor, 2013). Die beiden zuletzt genannten sind Teil eines zerebralen Signalwegs und spielen eine große Rolle bei der Regulierung der Transkription von neuronalen Genen, der Neurogenese und der neuronalen Differenzierung. Es wurde bereits gezeigt, dass beide Faktoren im adulten Nervensystem die Plastizität der Synapsen, sowie deren Übertragungsfähigkeit regulieren (Huang and Reichardt, 2001, 2003). BDNF gehört zur Familie der Neurotrophine und ist im zentralen Nervensystem der vorherrschende Ligand für den zugehörigen Rezeptor TrkB, an den er mit einer sehr hohen Affinität bindet. Dieser Rezeptor ist eine transmembranäre Rezeptor-Tyrosinkinase, welche an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert werden kann (Guiton et al., 1994). Dadurch, dass BDNF eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des Hirns und seiner Plastizität einnimmt, ist es naheliegend, dass

mengenmäßige Veränderungen mitverantwortlich für zahlreiche psychiatrische Erkrankungen sind, wie unter anderem Major Depressive Disorder (MDD), bipolare- und neuronale Entwicklungsstörungen, aber auch neurodegenerative Leiden (Autry and Monteggia, 2012; Zuccato and Cattaneo, 2009). Bei Patienten mit Erkrankungen dieser Art wurden erniedrigte BDNF-Plasmaspiegel festgestellt, was in vielen Fällen mit einer beobachteten gesteigerten DNA-Methylierung in den spezifischen BDNF-Promotoren zusammenhängt. Wichtig ist, dass DNA-Methylierungs-Veränderungen gewebeübergreifend einheitlich sind, einschließlich des Hirns und peripheren Blutes, was potenziell nützlich sein kann, da sie zukünftig als Biomarker für psychiatrische Erkrankungen dienlich werden können (Ikegame et al., 2013). Mehrere Studien belegen einen Zusammenhang zwischen BDNF und OCD, jedoch zeigen die Ergebnisse nicht eindeutig, ob BDNF-Sequenzvarianzen, wie der häufige Val66Met Polymorphismus, eine vor OCD schützende Wirkung haben, oder ob sie sogar für eine sichere Vorhersage für die Entstehung von OCD verwendet werden können (Hall et al., 2003; Hemmings et al., 2008). Veränderungen im vom NTRK2-Gen codierten Rezeptor TrkB tragen höchstwahrscheinlich zu einer Manifestierung einer OCD im Menschen bei, allerdings ist hierbei der Pathomechanismus weitestgehend unbekannt (Alonso et al., 2008). Für mit Angst verbundene psychiatrische Erkrankungen wurde in Mausversuchen untersucht, wie sich der Einfluss von BDNF und seinem Rezeptor TrkB auf ebendiese auswirkt, was teilweise zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt hat (Olsen et al., 2013).

1.1.2. Ras/ERK-MAPK-Signalweg

Es ist bereits erwiesen, dass BDNF über den Rezeptor TrkB den Ras/ERK (*extracellular-regulated kinase*)-MAPK-Signalweg aktiviert (Liu et al., 2013) und somit über die Konzentration die Aktivität des nachfolgenden Signalwegs regulieren kann. Dies ist eine der wichtigsten intrazellulären Signalkaskaden einer Zelle (Huang and Reichardt, 2001, 2003). In Abbildung 1 sind die intrazellulären Signalkaskaden dargestellt, die durch die Bindung von BDNF an TrkB aktiviert werden können. Der Ras/ERK-MAPK-Signalweg ist für diese Arbeit

von entscheidender Relevanz, daher wird nachfolgend lediglich dieser beschrieben. Nach der Aktivierung durch Phosphorylierung von TrkB, wird das als Adapter fungierende SHC (Src homology 2 domain containing) -transforming-protein ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert. SHC bindet nun an ein weiteres Adapter-Protein namens GRB2 (growth factor receptor-bound protein 2), welches im Anschluss einen Komplex mit dem prolinreichen SOS-Molekül (Son of Sevenless) bildet. SOS katalysiert bei der GTPase Ras den Austausch von gebundenem GDP zu GTP und aktiviert diese (Chardin et al., 1993). Anschließend wird das Signal weitergeleitet und die Kaskade wiederum durch Phosphorylierungen und Aktivierung von sequentiellen Kinasen, wie Raf, MEK1/2 und ERK1/2, weitergeführt. Schließlich führt die Aktivierung von ERK ein weiteres Mal zu Phosphorylierungen von Transkriptionsfaktoren und regulatorischen Proteinen (Zhang and Liu, 2002), welche u.a. das Überleben von Neuronen, die Langzeit-Potenzierung (LTP), Transkription, synaptische Plastizität und Verhaltensplastizität (Liu et al., 2013) regulieren. Die durch fehlende Inhibition verstärkte Aktivierung dieses Signalweges hat in Mausversuchen OCD-ähnliches zwanghaftes Putzverhalten hervorgerufen (Ullrich et al., 2017).

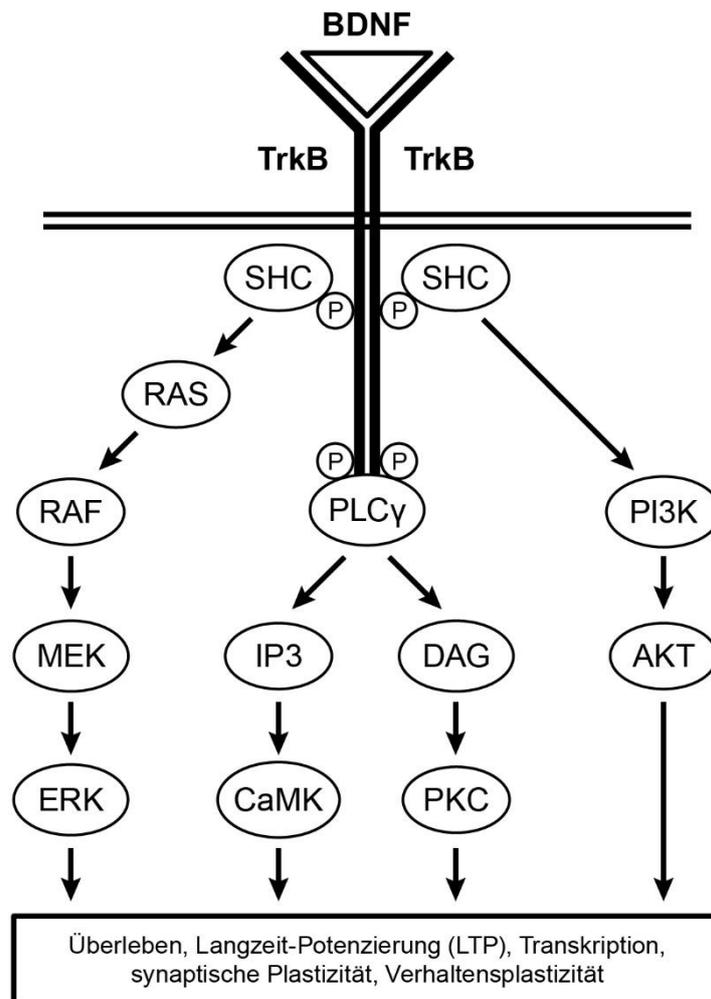


Abbildung 1: Durch Bindung von BDNF an TrkB ausgelöste intrazelluläre Signalkaskaden (modifiziert nach Andero et al. (2014))
 BDNF: Brain-derived neurotrophic factor; TrkB: Tropomyosin receptor kinase B; SHC: Src homology 2 domain containing; RAS: Rat sarcoma; RAF: Rapidly accelerated fibrosarcoma; MEK: Dual specificity mitogen-activated protein kinase; ERK: Extracellular-signal regulated kinase; PLCγ: Phosphoinositid-Phospholipase C-γ; IP3: Inositoltrisphosphat; CaMK: CaM-abhängige Kinase; DAG: Diacylglycerol; PKC: Proteinkinase C; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; AKT: Proteinkinasen-B, P: Pyrophosphat

1.2. Die Familie der SPRED-Proteine

SPREDs (**S**prouty-related protein with **EVH1** domain) bilden eine Familie von drei membranassoziierten Proteinen (SPRED1, 2 und 3) und sind physiologische Inhibitoren des Ras/ERK-MAPK-Signalwegs, welcher von diversen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen aktiviert werden kann (Miyoshi et al., 2004; Nonami et al., 2004). Die *Sprouty*- (und später auch die SPRED-) Proteine wurden erstmals in *Drosophila melanogaster* entdeckt und haben ihren

Namen durch ihre inhibierende Wirkung auf den Branchless (Bnl) Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF) während der Entwicklung des trachealen Systems (Hacohen et al., 1998). Die hemmende Wirkung der SPRED-Proteine entsteht durch Interaktion mit Ras und der darauffolgenden behinderten Aktivierung von Raf-1 (siehe Abbildung 1) (Wakioka et al., 2001). Sie nehmen eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Proliferation und Differenzierung vieler Zelltypen ein. Der genaue biochemische Mechanismus ist allerdings bisher noch weitestgehend unbekannt. SPRED Proteine kommen ubiquitär in Säugetieren vor und bestehen aus einer N-terminalen, dem VASP (**V**asodilator-**s**timulated **p**hosphoprotein) ähnlichen EVH1- (**E**nabled/**V**ASP **h**omology **1** domain), einer zentralen c-Kit bindenden (KBD) und einer sich C-terminal befindlichen Cystein-reichen Sprouty- (SPR) Domäne (siehe Abbildung 2). Letztere haben die SPREDS mit allen Proteinen der Sprouty-Familie gemeinsam (Kato et al., 2003; Wakioka et al., 2001).

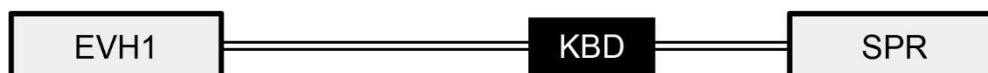


Abbildung 2: Domänenstruktur der SPRED-Proteine (modifiziert nach Bundschu (2005))
 EVH1: Enabled/VASP homology 1 domain; KBD: c-Kit bindende Domäne; SPR: Cystein-reiche Sprouty-Domäne

Die EVH1-Domäne bindet an prolinreiche Sequenzen und ist essenziell für den biochemischen inhibitorischen Effekt auf den Ras/ERK-MAPK-Signalweg. Dagegen ist die SPR-Domäne für die Lokalisierung an der Zellmembran und der Bildung von Homo- und Heterodimeren zuständig (King et al., 2005; Sasaki et al., 2003). Die c-Kit bindende Domäne (KBD) ist zwar in die inhibierende Wirkung involviert, jedoch nicht ausschlaggebend für ihre Funktionalität. SPREDS werden als mögliche Tumor-Suppressoren gehandelt und ihnen werden anti-metastatische Wirkungen zugesagt (Miyoshi et al., 2004). So wurde in Patienten, die an einem Leberzellkarzinom leiden, eine vermehrte Phosphorylierung von ERK festgestellt, während gleichzeitig die Expression von SPREDS erniedrigt war. Zudem neigten Patienten mit verminderter Expression von SPREDS zu vermehrter Tumordinvasion und Metastasierungen, was auf eine inverse

Korrelation zwischen SPRED-Expression und Tumorgenese schließen lässt (Yoshida et al., 2006). Ebenfalls interessant ist, dass die SPRED-Expression durch Gabe von anti-tumorgenetischen Pharmazeutika (z.B. Silibinin bei Leberzellkarzinom) gesteigert werden kann und dadurch dessen Wirkungen verstärkt werden können (Momeny et al., 2008). Diverse Knockout-Studien haben gezeigt, dass SPREDs in der Knochenentwicklung (Bundschu et al., 2005), der Hämatopoese (Nobuhisa et al., 2004), der Allergen-induzierten Atemwegs-Eosinophilie und bei Überempfindlichkeitsreaktionen involviert sind (Inoue et al., 2005). SPRED1 wird hauptsächlich im Hirn, aber auch in den meisten Organen exprimiert, SPRED2 wurde vor allem in Hirn-, Drüsen und Nierengewebe, aber auch mit geringerem Vorkommen in anderen Organen wie dem Herzen, der Lunge, dem Gastrointestinaltrakt (GIT), oder dem Urogenitaltrakt nachgewiesen. SPRED3 hingegen wird ausschließlich im Hirngewebe exprimiert (Engelhardt et al., 2004; Kato et al., 2003; Tuduce et al., 2010). Alle Subtypen spielen in der Entwicklung vom frühen Lebensalter bis hin zum Erwachsenenalter eine Rolle. Für die beiden Proteine SPRED1 und SPRED2 lässt sich eine sich überlagernde und ergänzend, kompensatorische Funktion vermuten, da im Mausversuch Tiere, bei denen lediglich eines der beiden für das entsprechende Protein codierende Gen (Spred1/Spred2) ausgeschaltet war, in einem gewissen Ausmaß überlebensfähig und fruchtbar waren (Bundschu et al., 2005; Nobuhisa et al., 2004; Nonami et al., 2004). Beim gleichzeitigen Knockout der für beide Proteine codierenden Gene, starben die Tiere im Mausversuch zwischen Embryonalstadium E12.5 und E15.5 und zeigten massive Blutungen, Ödeme und erweiterte, mit Erythrozyten gefüllte Lymphgefäße (Taniguchi et al., 2007). Der alleinige Verlust der Funktion von SPRED1 führt im Menschen beispielsweise zu dem Neurofibromatose Typ 1-ähnlichen Legius-Syndrom, welches mit Lernbehinderungen, Entwicklungsverzögerungen und Makrozephalie vergesellschaftet ist (Brems et al., 2007; Pasmant et al., 2009; Spurlock et al., 2009).

1.2.1. SPRED2

Obwohl SPRED1 und SPRED2 in ihrer Aminosäuren-Sequenz zu über 60% übereinstimmen und beide membranständige Proteine sind, unterscheiden sich ihre Expressionsmuster in verschiedenen Geweben und Zelltypen dennoch (Bundschu et al., 2007; Wakioka et al., 2001). Das Spred2-Gen ist in Mäusen in frühen Entwicklungsstadien hochaktiv in ekto- und mesodermalem und später in neuronalem, Herz-, Lungen- und Intestinalgewebe, sowie im Urogenitaltrakt (Tuduce et al., 2010). Die höchste Expressions-Aktivität wurde in Regionen des Großhirns, wie beispielsweise dem fronto-parietalen Cortex und dem Hippocampus, sowie in Teilen des Kleinhirns, speziell im Cortex und in Purkinje-Zellen festgestellt. Eine starke Expression des Spred2-Gens findet sich in Drüsengeweben, der Prostata, der Niere (vorwiegend in der Nierenrinde), sowie in glatten Muskelzellen der Gefäße, des GIT und der Gebärmutter (Bundschu et al., 2006). Des Weiteren wurde über eine Bestimmung des SPRED2-Proteinspiegels via Western Blot eine ubiquitäre Expression in Hirn, Drüsen und Nieren erwiesen (Engelhardt et al., 2004; Kato et al., 2003). Die posttranslationale Modifikation des Proteins, in Form von Phosphorylierung und Ubiquitylierung, spielt eine große Rolle bei der Regulierung der Funktion von SPRED2. Das Maus-SPRED2 wird als Antwort auf eine Stimulierung durch diverse Wachstumsfaktoren tyrosinphosphoryliert und somit seine inhibitorische Wirkung auf den Ras/ERK-MAPK-Signalweg freigesetzt (Wakioka et al., 2001). Es bindet an den Ras-Raf-Komplex, zwar kann es dort nicht die Aktivierung von Ras verhindern, jedoch ist Raf während der Bindung an das SPRED2-Protein nicht für seine Kinase zugänglich, was die inhibitorische Wirkung bedingt (siehe Abbildung 3).

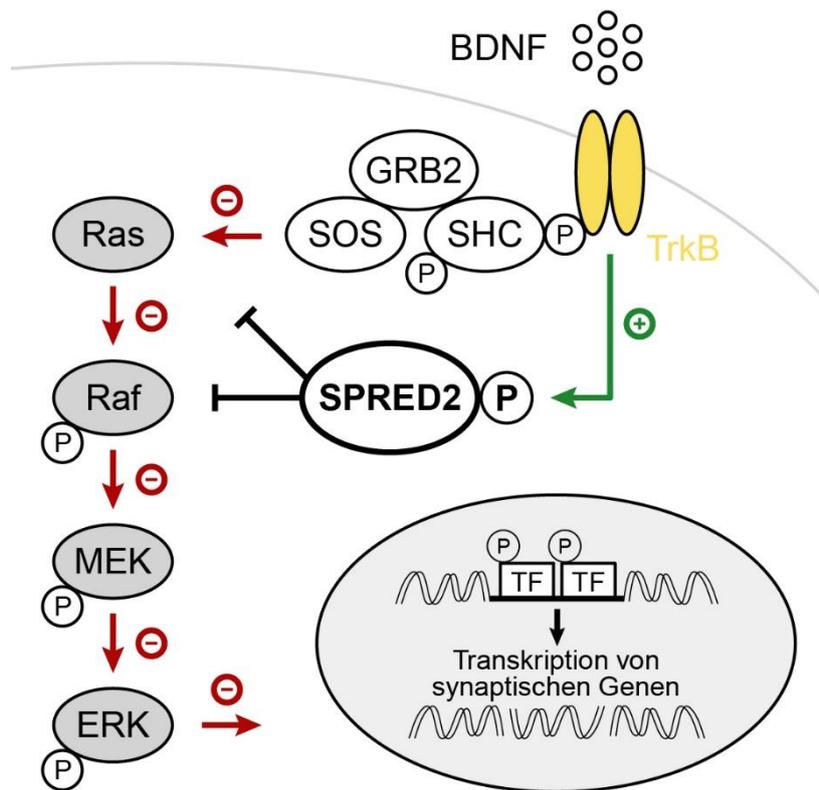


Abbildung 3: Darstellung möglicher Angriffspunkte von SPRED2 im BDNF/TrkB-ERK-Signalweg (nach Ullrich (2014))
 BDNF: Brain-derived neurotrophic factor; TrkB: Tropomyosin receptor kinase B; SHC: Src homology 2 domain containing; GRB2: Growth factor receptor-bound protein 2; SOS: Son of Sevenless; Ras: Rat sarcoma; Raf: Rapidly accelerated fibrosarcoma; MEK: Dual specificity mitogen-activated protein kinase; ERK: Extracellular-signal regulated kinase; P: Pyrophosphat; TF: Transkriptionsfaktoren; SPRED2: Sprouty-related protein with EVH1 domain 2

In der Vergangenheit wurden im Maus-SPRED2-Protein bereits zwei Tyrosinreste (Y377 und Y420) im SPR-Bereich entdeckt, die durch ihre Phosphorylierung entscheidend für die hemmende Wirkung des Proteins sind (Quintanar-Audelo et al., 2011). Umgekehrt hat eine Interaktion der Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2 mit der EVH1/KBD-Region in SPRED2 eine Dephosphorylierung des Tyrosinrests Y420 zur Folge, was wiederum die hemmende Wirkung auf den Ras/ERK-MAPK-Signalweg dämpft (Quintanar-Audelo et al., 2011). Im Menschen konnte bisher nicht nachgewiesen werden, dass es in SPRED2 ebendiese Tyrosinphosphorylierung gibt, die in Verbindung mit der inhibitorischen Wirkung steht. Allerdings wurden Phosphorylierungen von Serin- und Threoninresten an SPRED2 entdeckt, die für die hemmende Wirkung

des Proteins im Menschen verantwortlich sind (King et al., 2005). Abbildung 4 zeigt welche Teile des Spred2-Gens für welche Domäne im SPRED2-Protein codieren.

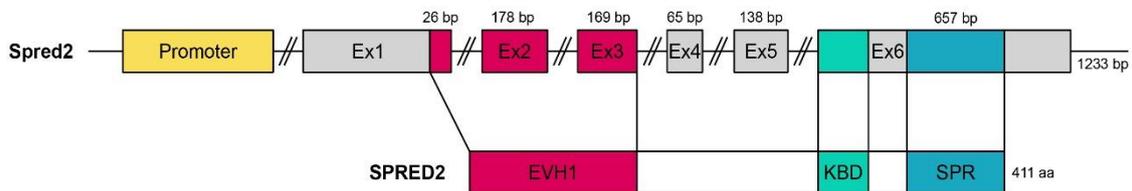


Abbildung 4: Die genomische Spred2-Struktur mit den jeweils für das SPRED2-Protein codierenden Domänen (nach Ullrich (2014))
 Ex: Exon; bp: Basenpaare; EVH1: Enabled/VASP homology 1 domain; KBD: c-Kit bindende Domäne; SPR: Cystein-reiche Sprouty-Domäne

Die erste entdeckte Funktion der SPREDs war die Beteiligung an der Regulierung der Hämatopoese. In Maus-Embryos wird SPRED2 in der AGM (aorta-gonad-mesonephros) Region exprimiert, welche eine Rolle in der embryonalen Hämatopoese spielt. In SPRED2-Knockout-Mäusen ist die Produktion von hämatopoetischen Vorläuferzellen der Leukozyten (CD45⁺) und die Koloniebildung gegenüber Wildtyp Kontrolltieren erhöht, wohingegen erhöhte Expression von SPRED2 eine signifikant verminderte Phosphorylierung von ERK und eine reduzierte Anzahl von CD45⁺-Zellen in der AGM-Kultur zur Folge hatte (Nobuhisa et al., 2004). Aufgrund der Beeinflussung der ERK-abhängigen Zellproliferation und -differenzierung, besitzt SPRED2 eine inhibitorische Wirkung auf die embryonale Regulierung der Hämatopoese. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass das Protein eine Rolle bei der Regulierung von sekretorischen Signalwegen in Drüsengewebe spielt (Engelhardt et al., 2004) und in Chondrozyten (Bundschu et al., 2005) exprimiert wird. Durch die Beeinflussung des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor-3 (FGFR3) vermittelten Signalwegs hat SPRED2 Auswirkungen auf das Knochenwachstum. SPRED2 reguliert durch Hemmung der Fibroblasten-Wachstumsfaktor- (FGF)-abhängigen ERK-Aktivierung im FGFR3/Ras/ERK-MAPK-Signalweg das Längenwachstum der Knochen. Ein Knockout des Proteins in Mäusen zeigte eine frühere und erhöhte Phosphorylierung von ERK in FGF-stimulierten Chondrozyten, welche bei der chondralen Ossifikation essentiell sind.

Resultierend zeigte sich bei einer SPRED2-Defizienz phänotypisch ein Achondroplasie-ähnlicher Kleinwuchs der Tiere (Bundschu et al., 2005).

In Prostatakarzinomen wird SPRED2 nachweislich weniger, SPRED1 hingegen in unveränderter Menge exprimiert. Dies lässt auf eine besondere Rolle von SPRED2 in dieser Art von Tumoren schließen (Kachroo et al., 2013). Zwar konnte bisher nicht gezeigt werden, dass eine SPRED2-Mutation oder -Defizienz als Ursache für Tumorentstehung und -wachstum in Frage kommt, allerdings kann das Protein bei verminderter Expression ein prognostischer Faktor und eine mögliche Angriffsstelle für Krebstherapien sein. In einer neueren Untersuchung wurde nun sogar festgestellt, dass das zur Krebstherapie eingesetzte Arzneimittel Imatinib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor, die Expression von SPRED2 steigert und eine Art kooperativen Effekt zwischen dem Wirkstoff und dem Protein hervorruft. Das folglich erhöhte Vorkommen von SPRED2 führt in CML-Zellen (chronisch myeloische Leukämie) zur Apoptose und/oder zu einem Wachstumsstillstand (Liu et al., 2010).

Nicht zuletzt sind die Auswirkungen von SPRED2 auf die Niere und den Wasser- bzw. Mineralhaushalt zu nennen. SPRED2-defiziente Mäuse zeigten Nierenschäden, wie Hydronephrose und Atrophie. Ferner führte der Verlust der SPRED2-Funktion zur Dysregulation des Hormons Aldosteron, welches für die Homöostase im Wasser- und Mineralhaushalt verantwortlich ist. Eine weitere Hormondysregulation findet auf der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHNA) statt, hier werden vermehrt die Stresshormone CRH, ACTH und Kortikosteron ausgeschüttet. Diese überschießende Ausschüttung steht in Verbindung mit dem bei SPRED2-defizienten Mäusen beobachteten zwanghaften Putzverhalten (Ullrich, 2014; Ullrich et al., 2011).

1.3. Die Amygdala

Das Gehirn dient als Teil des zentralen Nervensystems unter anderem als Instrument für Lernvorgänge, Angstepfinden und emotionales Verhalten, wobei alle diese drei miteinander verbunden sein können. Die Amygdala spielt in dieser Beziehung eine zentrale Rolle. Sie bildet zusammen mit dem Gyrus cinguli, dem Gyrus parahippocampalis und dem Hippocampus das limbische System (Rolls, 1992), welches paarig im ventralen anteriomedialen Teil des jeweiligen Temporallappens liegt. Für die Unterteilung der Amygdala existieren zwei Klassifikationsschemata. Zum einen kann sie in drei Kerngebiete, jeweils ein tiefes, ein oberflächliches und ein zusätzliches, mit insgesamt 13 Kernen und entsprechenden Unterkernen, bzw. Divisionen unterteilt werden (Pitkanen et al., 1997). Zuvor wurde im Jahr 1987 die Amygdala in einen basolateralen, einen kortexähnlichen und einen zentromedialen Teil eingeteilt (Price et al., 1987), wobei die basolaterale Kerngruppe den tiefen und die kortexähnliche den oberflächlichen Kernen entspricht. Eine Aufzählung aller Kerngruppen, Kerne und Unterkerne der Amygdala findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Anatomische Aufteilung der Amygdala in ihre Kerngruppen, Kerne und Unterkerne (Pitkanen et al., 1997)

Kerngruppe	Kerne	Unterkerne, Divisionen
Tiefe Kerne	Lateraler Kern (LA)	Dorsolaterale Division (L _{dl}) Ventrolaterale Division (L _{vl}) Mediale Division (L _m)
	Basaler Kern (B)	Magnozelluläre Division (B _{mc}) Intermediäre Division (B _i) Parvizelluläre Division (B _{pc})
	Akzessorischer basaler Kern (AB)	Magnozelluläre Division (B _{mc}) Parvizelluläre Division (B _{pc})
Oberflächliche Kerne	Kern des lateralen olfaktorischen Traktes (NLOT)	
	Bed nucleus des akzessorischen olfaktorischen Traktres (BAOT)	
	Anteriorer kortikaler Kern (CO _p)	
	Medialer Kern (M)	Rostrale Division Zentrale Division Dorsaler Teil (M _{cd}) Ventraler Teil (M _{cv}) Kaudale Division (M _c)
	Periamygdaloider Kortex	Periamygdaloider Kortex Mediale Division (PAC _m) Sulcale Division (PAC _s)
	Posteriorer kortikaler Kern (CO _p)	
Andere amygdaloide Regionen	Anteriore amygdaloide region (AAA)	
	Zentraler Kern (CE)	Kapsuläre Division (CD _c) Laterale Division (CE _i) Intermediäre Division Mediale Division
	Amygdalohippokampale Region (AHA)	Mediale Division (AHA _m) Laterale Division (AHA _i)
	Interkalierte Kerne (I)	

Die Amygdala erhält über den sensorischen Thalamus Informationen aus externen Reizen der Umwelt und nimmt diese über den basolateralen Anteil, welcher sich aus dem basalen und dem lateralen Kern zusammensetzt, auf. Von dort aus wird die Information an den zentralen Kern und schließlich an weitere außerhalb der Amygdala liegende Hirnregionen weitergeleitet (Davis, 1999). In diesem Zusammenhang sind vor allem die reziproken Verbindungen zum Nucleus accumbens und OFC zu nennen. Ersterer wird auch als Belohnungszentrum bezeichnet, wohingegen der OFC eine wichtige Rolle bei der Entscheidungsfindung spielt (Baxter and Murray, 2002; Everitt et al., 1999; Koob, 1999). Ebenfalls bestehen Verbindungen zwischen Amygdala und dem anterioren cingulären Kortex (ACC), dem ventralen Striatum und dem Hippocampus (HPC). Diese Beziehungen und Interaktionen mit verschiedenen Hirnarealen machen die Amygdala zu einem wichtigen Dreh- und Angelpunkt für die Entstehung von Emotionen und Angst, die Entscheidungsfindung, Motivation und Lernprozesse. Treten Dysfunktionen in diesen Bereichen auf, können diverse neuropsychiatrische Erkrankungen, wie zum Beispiel Angststörungen oder OCD die Folge sein. Mithilfe einer funktionellen Magnetresonanztomographie (fMRT), konnte bei Provokationstests an OCD-Patienten eine bilaterale Aktivierung des OFC, des anterioren cingulären Kortex, des Nucleus caudatus und der Amygdala nachgewiesen werden (Adler et al., 2000; Breiter et al., 1996), was diese Theorie bestätigt. Weitere Funktionen der Amygdala wurden durch verschiedene Arbeiten aufgedeckt. Dazu gehören die klassische Reizkonditionierung (Adolphs, 2008; LeDoux, 2000; Ohman, 2009), die soziale Wahrnehmung (Adolphs, 2010; Bzdok et al., 2012), wie zum Beispiel Gesichtsausdrücke deuten und die Gedächtnisbildung (Packard and Cahill, 2001). OCD überschneiden sich in vielerlei Hinsicht in ihren Symptomen mit Angststörungen, daher sind jegliche Vorgänge der Entwicklung und Empfindung von Angst oder Furcht, sowie die Wiedererkennung von Gefahren (Angstkonditionierung) von fundamentaler Bedeutung für Erkrankungen wie OCD. 2004 wurde im Mausversuch gezeigt, dass eine gezielte Hemmung bzw. komplette Deaktivierung des BDNF-TrkB-Signalwegs (siehe 1.1.1) in der Amygdala in einem Verlust der Ausbildung des Angstgedächtnisses resultiert und

somit keine Angstkonditionierung mehr möglich ist (Rattiner et al., 2004). Da die SPRED-Proteine in ebendiesem Signalweg eingreifen und ihn inhibieren (siehe 1.2), wird auf diese Weise die Verbindung zwischen den SPREDS und der Amygdala hergestellt. In den kortikalen Hirnarealen und so auch in der Amygdala verändern sich an den Neuronen beim Vorgang der Angstkonditionierung die Morphologie und Verzweigungen der Dendriten und die Dichte der *Spines*, kleine Vorwölbungen an Dendriten, welche die Mehrheit der exzitatorischen Synapsen bilden (Lai et al., 2012; Quirk and Mueller, 2008; Trabalza et al., 2012; Vetere et al., 2011). Da die Amygdala aus vielen Kernen und Untereinheiten besteht, wurden zur weiteren Eingrenzung des für diese Arbeit zu untersuchenden Bereichs im Vorfeld an SPRED2-Knockout-Mäusen im Rahmen anderer Versuchsreihen elektrophysiologische Messungen an Neuronen (siehe 1.4) durchgeführt. Diese identifizieren den lateralen Kern als einen in die Pathogenese von OCD involvierten Bereich (Ullrich et al., 2017).

1.3.1. Die Laterale Amygdala

Die Amygdala ist anatomisch sehr heterogen aufgebaut, wie in Tabelle 1 deutlich wird. Die verschiedenen Areale dienen als sensorische Ein- und Ausgänge (Pitkanen et al., 1997), auch untereinander ist die Vernetzung der Gebiete sehr komplex, sodass die Amygdala nicht nur ein Teil eines Signalübertragungssystems im Gehirn ist, sondern auch eigenständig innerhalb der eigenen Grenzen Reize überträgt und verarbeitet. Der basolaterale Anteil, davon insbesondere der laterale, ist bei der Verarbeitung von Afferenzen von großer Bedeutung. Dabei gelangen beispielsweise bei der Angstkonditionierung afferente Reize mit auditorischem Inhalt über den medialen Corpus geniculatum des Thalamus zum lateralen Kern der Amygdala und terminieren an die dort vorzufindenden Neuronen (Quirk et al., 1997). Weitere thalamische Strukturen, die zur LA projizieren, sind der Nucleus suprageniculatum und der posteriore intralaminare Kern, welche Afferenzen vom inferioren Colliculus und dem Rückenmark erhalten (Bordi and LeDoux, 1994). Ebenso übertragen die Neuronen aus dem auditorischen Kortex ihre sensorischen Informationen in diese Region (Romanski and LeDoux, 1992). Eine wesentliche intraamygdaloide

Verbindung der LA besteht zum zentralen Kern (CE). Dieser verarbeitet die von dort und ebenso die vom basalen (B) und akzessorischen basalen Kern (AB) kommenden Informationen und leitet diese als Hauptausgangsstelle aus der Amygdala hinaus zum Hirnstamm und Hypothalamus (Jolkkonen and Pitkanen, 1998). Zusätzlich sendet der laterale Kern Informationen zum basalen und akzessorischen basalen Kern, siehe dazu Abbildung 5. Zusammengefasst lässt sich über die tiefen Kerne der Amygdala sagen, dass der laterale Kern (LA) als Eingangskomplex bezeichnet werden kann und Afferenzen aufnimmt. Diese werden über den basalen (B) und akzessorischen basalen Kern (AB) moduliert und schließlich über den Ausgangskomplex, in Form des zentralen Kerns (CE), abgegeben (Pitkanen et al., 2000).

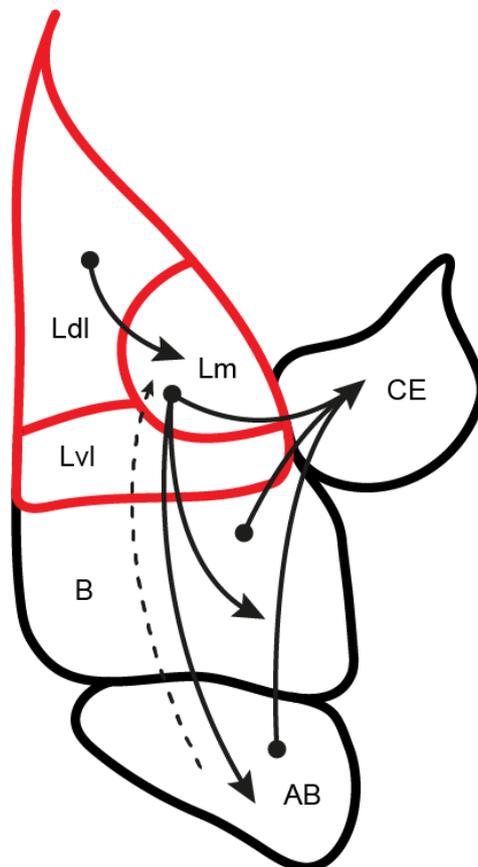


Abbildung 5: Schematischer Aufbau der tiefen Amygdalakerne mit intraamygdaloiden Verbindungen, lateraler Kern mit Subdivisionen rot markiert (modifiziert nach Kaschel (2010))
Ldl: Dorsolaterale Division; Lm: Mediale Division; Lvl: Ventrolaterale Division; B: Basaler Kern; AB: Akzessorischer basaler Kern; CE: Zentraler Kern

Die Verarbeitung und Übertragung von Informationen und Reizen wird von Neuronen übernommen. Es gibt verschiedene Typen von Neuronen in der basolateralen Amygdala (BLA), die von McDonald (1982) in drei Klassen eingeteilt wurden. Auf die Klasse 1-Neuronen wird in 1.3.2 weiter eingegangen. Klasse 2-Neuronen machen nur rund 5% der Gesamtzahl an Neuronen in der BLA aus. Sie zeichnen sich durch *Spine*-arme Dendriten aus und haben einen kleinen Zellkörper (9-12 μm Durchmesser). Sie haben ein sehr heterogenes Erscheinungsbild, denn ihre Zellkörper können viele verschiedene Formen annehmen und ihre Dendriten haben kein einheitliches Verzweigungsschema. Klasse 3-Neuronen kommen noch seltener vor und zeichnen sich durch einen sphärischen ebenso kleinen Zellkörper (10-12 μm Durchmesser) aus. Zudem besitzen sie sechs bis zehn in alle Richtungen abgehende aderige Dendriten, welche den Neuronen ein Neuroglia-ähnliches Aussehen verleihen.

1.3.2. Pyramidenzellen in der Amygdala

Die in der BLA mit Abstand am häufigsten vertretenden nachweisbaren Neuronen sind die von McDonald (1982) benannten Klasse 1-Neuronen. Mit ihren 15-18 μm langen und 10-15 μm breiten pyramidenförmigen Zellkörpern und einem Anteil von über 90% bilden sie die Mehrheit der Neuronen in diesem Hirnareal. Die *Spine*-Dichte an den Dendriten ist insgesamt sehr hoch, jedoch ist sie an den fünf bis sieben primären Dendriten (direkt vom Soma abgehend) vergleichsweise niedrig und steigt erst an den sekundären stark an. Klasse 1-Neuronen weisen einen bis zwei dickere (3-4 μm) Dendriten auf, die von den Spitzen des pyramidenförmigen Zellkörpers abgehen. Diese prominenten, sich bis zu 300-400 μm vom Zellkörper weg erstreckenden Dendriten, ähneln sehr den apikalen Dendriten von kortikalen pyramidalen Neuronen. Die restlichen drei bis fünf kleineren und schmaleren (1,5-2,5 μm) Dendriten, die sich nur bis etwa 150-200 μm vom Zellkörper weg erstrecken, ähneln wiederum den basalen Dendriten. Aufgrund dieser morphologischen Analogie werden die apikalen und die basalen Dendriten in dieser Arbeit nachfolgend auch als solche bezeichnet. Es liegt nahe, bei einer Untersuchung der Neuronen der LA zuerst die am häufigsten vertretenen zu betrachten, daher

wurden die Klasse 1-Neuronen für diese Arbeit zur morphologischen Analyse ausgewählt. Ein Beispiel eines solchen Neurons zeigt Abbildung 11 (siehe 3.3). Der pyramidale Zellkörper und die wenigen *Spines* (rot) an den primären Dendriten werden hier besonders deutlich.

1.4. Elektrophysiologische Messungen im lateralen Kern der Amygdala nach Stimulation der afferenten thalamischen Fasern

Im Vorfeld wurden elektrophysiologische Messungen bei SPRED2-KO- und Wildtyp-Mäusen im Alter zwischen sechs bis acht Monaten durchgeführt (Ullrich et al., 2017). Dabei wurden die afferenten thalamischen Bahnen, die zur LA führen, stimuliert. Das ankommende Signal wurde an Neuronen des LA gemessen. In Abbildung 6 ist ein schematischer Hirnschnitt dargestellt, in dem die Orte der Stimulierung der thalamischen Fasern und der anschließenden Messung des ankommenden Signals an Neuronen in der LA markiert sind.

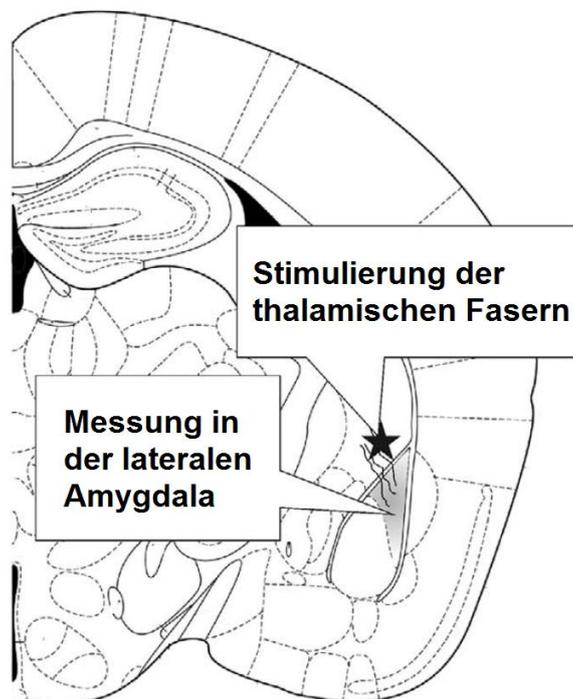


Abbildung 6: Schematischer Hirnschnitt mit Darstellung repräsentativer Positionen der thalamischen Faserstimulierung und der Messung in der lateralen Amygdala (modifiziert nach Paxinos and Franklin (2001))

Festgestellt wurden eine erhöhte synaptische Übertragung und eine erniedrigte Reizschwelle, also eine erhöhte Erregbarkeit an thalamo-amygdaloiden Synapsen bei SPRED2-KO-Mäusen. Zudem wurde eine verringerte Paired-Pulse Facilitation entdeckt, was auf eine Veränderung bei der präsynaptischen Vesikelfreisetzung-Wahrscheinlichkeit an amygdaloiden Synapsen hindeutet. Die Paired-Pulse Facilitation ist die Verstärkung eines postsynaptischen Reizes, durch zwei schnell innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls aufeinander folgende gesetzte präsynaptische Reize. Wie ausgeprägt diese Verstärkung ist, hängt von der Vesikelfreisetzung und ihrer Wiederaufnahme in die präsynaptische Endigung ab. Anschließend wurde die Häufigkeit des Auftretens und die Größe von spontanen mini-Exzitatorischen postsynaptischen Potentialen (mEPSPs) in Neuronen der LA in SPRED2-KO-Mäusen gemessen (Ullrich et al., 2017). Das Ergebnis war eine verminderte Häufigkeit des Auftretens der mEPSPs. Außerdem war die Größe der mEPSPs verringert, was entweder durch Veränderungen der postsynaptischen Sensibilität, oder der Transmitterladung/-menge in präsynaptischen Vesikeln ausgelöst werden kann. Zusätzlich wurde eine dysregulierte Expression der Proteine Bassoon, ERC1, PSD95 und der Glutamatrezeptoren mGluR2 und mGluR5 festgestellt (Ullrich et al., 2017). Diese Proteine bzw. Rezeptoren werden prä- oder postsynaptisch exprimiert und haben Einfluss auf die Anzahl, bzw. Dichte und Morphologie von *Spines* und somit auch auf die Übertragungsfähigkeit und Erregbarkeit von Synapsen (Benarroch, 2008). Auch der TrkB/ERK-MAPK-Signalweg steht, hauptsächlich im Hippocampus (Alonso et al., 2004; Chakravarthy et al., 2006; Steiner et al., 2008; Vanderklish and Edelman, 2002), aber auch in der Amygdala (Bennett and Lagopoulos, 2014), mit der *Spine*-Morphologie in Verbindung und ist vermutlich die Ursache für die oben beschriebene Fehlregulation synaptischer Proteine. Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass es bei SPRED2-KO-Mäusen an Neuronen der LA sowohl zu prä-, als auch zu postsynaptischen Veränderungen kommt, welche sich durch die Veränderung in der Expression der Proteine auch auf die Morphologie der Neuronen, speziell der *Spines* auswirken kann. Nun ist durch eine morphologische Analyse der Neuronen zu untersuchen, ob die Anzahl und/oder Morphologie der *Spines* bei einem Knockout des SPRED2-Proteins in

Analogie zur gesteigerten Erregbarkeit amygdaloider Synapsen verändert ist. Deshalb wurden in dieser Arbeit insbesondere die Anzahl und Dichte der *Spines* an den Dendriten untersucht.

1.5. Fragestellung und Ziel der vorliegenden Dissertation

In dieser Arbeit soll die Morphologie der Pyramidenzellen der LA in SPRED2-KO- mit der in Wildtyp-Mäusen verglichen werden. Auch im Hinblick auf die Entstehung von OCD sind folgende Fragen von zentraler Bedeutung:

- Weicht die Morphologie, wie Dendritenlänge, *Spine*-Anzahl und -Dichte, oder die Somafläche der Pyramidenzellen der lateralen Amygdala bei SPRED2-KO-Mäusen gegenüber Wildtyp-Kontrollmäusen signifikant ab?
- Falls dies der Fall sein sollte, lässt sich ein nachvollziehbarer Zusammenhang zwischen abnormer Morphologie und veränderter Elektrophysiologie herleiten?
- Kann das Protein SPRED2 in der lateralen Amygdala als zusätzlich zu beachtender Faktor für die Entstehung von OCD angesehen werden?
- Muss das Modell zur Entstehung von OCD überarbeitet oder erweitert werden?
- Sind komorbide Angststörungen und/oder psychiatrische Erkrankungen betroffen?
- Sollten eventuell zusätzlich Neuronen anderer Hirnregionen analysiert werden, um zu prüfen, ob diese ebenfalls durch einen SPRED2-Knockout betroffen sind?

Diese Fragen sollen im Anschluss an den Ergebnisteil beantwortet und diskutiert werden. Ziel der Arbeit soll es sein, einen guten Überblick über die Auswirkungen des SPRED2-Proteins in der lateralen Amygdala zu verschaffen und einen Ausblick auf zukünftige Diagnose- und Therapiemöglichkeiten bei verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen zu geben.

2. Material und Methoden

2.1. Mäuse als Versuchstiere

2.1.1. Generierung der SPRED2-KO-Mäuse

Das genaue Verfahren der Generierung von SPRED2-defizienten Mäusen mittels der *gene-trap* Methode wurde bereits in vorigen Arbeiten beschrieben (Bundschu, 2005; Bundschu et al., 2005; Ullrich and Schuh, 2009). Um es dennoch kurz zu beschreiben: Die SPRED2-KO-Mäuse wurden aus der embryonalen Stammzelllinie XB228 generiert, welche von BayGenomics, was heute zu International Gene Trap Consortium (IGTC, Davis, CA, USA) gehört, erhalten wurden. Die Stammzellen stammen von 129P2/OlaHsd-Mäusen und beinhalteten den pGT0 Gene-Trap Vektor (siehe Abbildung 7), welcher zufällig zwischen Exon 4 und 5 in das Spred2-Gen inseriert hat. Das in dem Gene-Trap Vektor enthaltene Reporter-Gen β -geo kann mithilfe einer X-Gal Färbung zur Genexpressionsanalyse herangezogen werden. Der Gene-Trap Vektor verhindert eine korrekte Translation des SPRED2-Proteins, stattdessen wird entweder nur das β -geo-Protein, oder eine Fusion aus der EVH1-Domäne des SPRED2-Proteins und dem β -geo-Protein exprimiert, was in einem nicht mehr funktionsfähigen SPRED2 resultiert. Die XB228-Zellen mit dem in das Spred2-Gen inserierten Gene-Trap Vektor wurden in isolierte Blastozysten aus superovulierten und befruchteten weiblichen C57BL/6-Mäusen injiziert. Pseudoschwangere Weibchen, welche vorher mit vasktomierten männlichen Mäusen verpaart wurden, wurden für die Reimplantation der Blastozysten verwendet. Um die SPRED2-KO-Mauslinie zu etablieren, wurde der chimäre männliche Nachwuchs wiederum mit weiblichen C57BL/6-Mäusen gepaart. Damit konnten die Keimbahntransmission getestet und gleichzeitig die ersten heterozygoten (HET) SPRED2-Mäuse generiert werden.

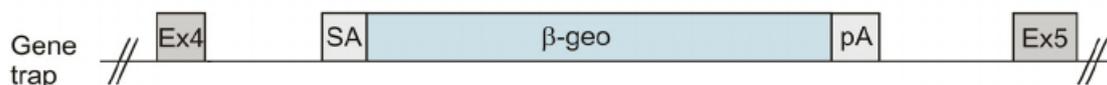


Abbildung 7: Gene-Trap Vektor, der in das SPRED2-Gen eingefügt wurde. (nach Ullrich et al. (2011))
Ex: Exon; SA: Splice acceptor; β -geo: Reporter Gen; pA: SV40 Polyadenylierungssequenz

2.1.2. Zucht- und Haltungsbedingungen der Mäuse

Die Mäuse wurden in Standard Kunststoffkäfigen gehalten, entweder alleine, oder in Gruppen von bis zu vier Tieren. Dies hing einerseits von ihrem Geschlecht und andererseits von der Anzahl ihrer Wurfgeschwister ab. Sie wurden bei einem konstanten 12 h Tag und 12 h Nacht Zyklus und einer Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten. Trinkwasser und Standard-Mausfutter standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Um Nachwuchs von allen Genotypen (SPRED2-KO, WT und HET) mit gleichem Alter von einem Wurf zu erhalten, wurde für gewöhnlich eine männliche SPRED2-HET-Maus mit zwei weiblichen SPRED2-HET-Mäusen verpaart. Um mögliche Inzucht-Effekte möglichst gering zu halten, wurden die Mäuse auf einem gemischten 129P2/OlaHsd x C57Bl/6 genetischen Hintergrund gezüchtet.

2.1.3. Genotypisierung der SPRED2-defizienten Mäuse

Der Nachwuchs der Mäuse wurde mittels PCR-Analyse genotypisiert. Dazu wurde alkalische Lyse für die die DNA-Extraktion und RED Taq DNA Polymerase Master Mix (Genaxxon) für die PCR verwendet. Dem Protokoll folgend wurde den Mäusen ein kleines Gewebestück in Form einer etwa 0,2 cm großen Biopsie der Schwanzspitze entnommen und anschließend im Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 50 µl des alkalischen Lysepuffers (Lösung 1, siehe Tabelle 2) bedeckt, wobei die Schnittseite der Biopsie nach unten ausgerichtet wurde. Nachdem die Proben für 20 min bei 95 °C und 450 rpm auf einem Thermomixer inkubiert wurden, wurde 50 µl Neutralisationslösung (Lösung 2, siehe Tabelle 3) zu jeder Probe gegeben.

Tabelle 2: Zusammensetzung des alkalischen Lysepuffers (Lösung 1)

Bestandteil	Konzentration	Finale Konzentration	Volumen
NaOH	10 M	25 mM	62,5 µl
EDTA-Na	0,5 M	0,2 mM	10 µl
H ₂ O	-	-	24,9275 ml
Gesamtvolumen	-	-	25 ml

Für die 10 M NaOH-Stocklösung wurden 40 g NaOH in 100 ml H₂O und für die 0,5 M EDTA-Na-Lösung 18,6 g EDTA-Na in 100 ml H₂O gelöst und der pH-Wert 8,0 eingestellt. Der endgültige pH-Wert der Lösung 1 (Tabelle 2) betrug ~12 und bedurfte keiner weiteren Einstellung. Die Lösung musste bei RT gelagert und alle sechs Monate frisch angesetzt werden.

Als Stocklösung für Lösung 2 wurde eine 1 M Tris-HCl-Lösung (molare Masse: 157,6 g/mol) verwendet. Der endgültige pH-Wert der Lösung 2 (Tabelle 3) betrug ~5 und bedurfte keiner weiteren Einstellung. Die Lösung musste bei RT gelagert werden.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Neutralisationslösung (Lösung 2)

Bestandteil	Konzentration	Finale Konzentration	Volumen
Tris-HCl	1 M	40 mM	1 ml
H ₂ O	-	-	24 ml
Gesamtvolumen	-	-	25 ml

Anschließend wurden die Proben in einem Reagenzglasschüttler gründlich durchmischt und bei 4 °C gelagert. In der Zwischenzeit wurde der PCR-Master-Mix hergestellt, die Bestandteile lassen sich in Tabelle 4 ablesen. Für jede Probe wurde eine Menge von 20 µl hergestellt.

Tabelle 4: PCR-Master-Mix

Bestandteil	Konzentration	Finale Konzentration	Volumen
2 x Red-Mastermix	2 x	1 x	12,5 µl
Primer: Geno_S2_fw	10 µM	400 nM	1 µl
Primer: Geno_S2_rev3_wt	10 µM	400 nM	1 µl
Primer: Geno_S2_revPB_ko	10 µM	400 nM	1 µl
Betain	5 M	900 nM	4,5 µl
Gesamtvolumen	-	-	20 µl

Die Sequenzen der *Primer* für den PCR-Master-Mix lassen sich in Tabelle 5 ablesen.

Tabelle 5: PCR-Primer

Primer	Sequenz
Geno_S2_fw	5'- GCTTGACCGGCACCCCGGTGAG -3'
Geno_S2_rev3_wt	5'- CCCCCACACACTGGCTTGGTT -3'
Geno_S2_revPB_ko	5'- CGGATCTCAAACCTCTCCTCC -3'

Nachdem jeweils 20 µl des PCR-Master-Mix in die Reaktionsgefäße vorgelegt wurden, wurden 5 µl Maus-DNA zugegeben. Mithilfe der PCR wurden nun kleine Abschnitte der isolierten genomischen DNA amplifiziert. Der verwendete Zyklus ist nachfolgend in Tabelle 6 beschrieben.

Tabelle 6: PCR-Zyklus

Vorgang	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initialdenaturierung	94 °C	3 min	1 x
Denaturierung	94 °C	1 min	
Tempern	61 °C	1 min	30 x
Extension	72 °C	1 min	
Abschlussexension	72 °C	10 min	1 x
Stopp	15 °C	∞	1 x

Zur Auftrennung der amplifizierten Fragmente, wurde ein Agarosegel hergestellt, welches aus 1% Agarose, gelöst in 1 x TAE-Puffer (1 x Tris-Acetat-EDTA Puffer: 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid) bestand und mit 1 µl Nancy-520/100 ml Gel versetzt wurde. Das ausgehärtete Gel wurde nun in die Laufkammer gesetzt, Kämme gezogen und mit 1 x TAE-Puffer bedeckt. 10 µl der Proben wurden direkt geladen, wobei die Zugabe von DNA-Ladepuffer nicht nötig war. Die WT- und KO-Fragmente wurden per Gelelektrophorese (45-60 min bei 80 V) aufgetrennt und anschließend mit UV-Licht detektiert (Kodak Gel Logic 100). Die sichtbargemachten PCR-Produkte wurden fotografiert (siehe 3.1, Abbildung 8) und die Größe der PCR-Fragmente mit einer DNA-Leiter (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Thermo Scientific; Katalog Nr. SM0331) bestimmt.

2.1.4. Merkmale der verwendeten Mäuse

Für das Herstellen der Schnittpräparate wurden insgesamt 16 Mäuse verwendet, davon waren 7 Wildtyp-Mäuse und 9 SPRED2-KO-Mäuse. Alle Tiere waren männlich, da bei Weibchen die durch den Menstruationszyklus bedingten hormonellen Schwankungen ungleiche Versuchsbedingungen zur Folge haben können. Am Tag der Hirnentnahme waren die WT-Mäuse durchschnittlich 10,55 Monate und die KO-Mäuse 11,17 Monate alt. Das jüngste Tier im WT-Genotyp war 4,87 und das älteste 19,67 Monate alt. Das Alter der jüngsten KO-Maus betrug 5,49 und das der ältesten 21,35 Monate. Die Fellfarbe der Versuchstiere war entweder braun oder schwarz, die Aufteilung war bei den Wildtyp-Mäusen 3:4 und bei den KO-Mäusen 5:4. Zusätzlich konnten die Mäuse an der vierstelligen Nummer auf ihrer Ohrmarke identifiziert werden. Drei der KO Mäuse zeigten offene Wunden durch ihren Putzzwang. Der Grad dieses Zwanges wurde durch Beobachtungen auf einen Wert zwischen 1 und 3 klassifiziert. Alle Einzelheiten finden sich in Tabelle 7 und Tabelle 8. Die SPRED2-KO-Mäuse zeigten in Standardtests keine erhöhte Angstepfindung, jedoch waren andere Parameter der Angstepfindung, wie erhöhte Spiegel von Stresshormonen, sehr wohl auffällig (Ullrich et al., 2011; Ullrich et al., 2017).

Tabelle 7: Merkmale der WT-Mäuse

Nr.	Farbe	♂/♀	Geb. Datum	Alter/Monate	Putzzwang	Wunde
1645	schwarz	♂	01.02.14	19,67	-	-
1838	braun	♂	25.09.14	11,91	-	-
1850	braun	♂	07.10.14	11,51	-	-
1885	schwarz	♂	11.12.14	9,38	-	-
1903	braun	♂	14.01.15	8,26	-	-
1905	schwarz	♂	14.01.15	8,26	-	-
1990	schwarz	♂	27.04.15	4,87	-	-

Tabelle 8: Merkmale der KO-Mäuse

Nr.	Farbe	♂/♀	Geb. Datum	Alter/Monate	Putzzwang	Wunde
1523	braun	♂	12.12.13	21,35	3	ja
1742	schwarz	♂	18.06.14	15,16	1	-
1839	braun	♂	25.09.14	11,91	1	-
1851	schwarz	♂	07.10.14	11,51	3	ja
1865	braun	♂	02.12.14	9,67	2	-
1886	schwarz	♂	11.12.14	9,38	1	-
1904	braun	♂	14.01.15	8,26	1	-
1913	braun	♂	27.01.15	7,83	2	-
1977	schwarz	♂	08.04.15	5,49	3	ja

2.1.5. Entnahme der Hirne

Die Hirne wurden am 22.09.2015 im Labor der Klinik für Psychiatrie in Würzburg unter der Leitung von Frau PD Dr. Dipl. biol. A. Schmitt-Böhler entnommen. Dazu wurden die Mäuse zunächst in ihren Käfigen in das Labor transportiert, wo sie nacheinander in einen Glasbehälter gesetzt wurden. Zur Sedierung der Tiere wurden Papiertücher, beträufelt mit 2-3 Tropfen Isofluran 1 ml/ml (CP-Pharma, Art.-Nr. 1234), in den Behälter gelegt. Sobald die Sedierung eintrat, wurden sie aus dem Behälter entnommen und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde mit einer Schere der Schädel abgetrennt und das Gehirn als Ganzes vorsichtig präpariert. Ab diesem Zeitpunkt musste darauf geachtet werden, dass keine Metallinstrumente unnötig das Hirn berührten, da dies die Golgi-Cox-Imprägnierung (siehe 2.2.1) beeinträchtigen konnte. Jedes einzelne Gehirn wurde in einem eigenen Reagenzglas mit der vorher hergestellten Imprägnierlösung (siehe unten) inkubiert.

2.2. Herstellung der Schnittpräparate

2.2.1. Golgi-Cox-Imprägnierung nach Glaser und Van der Loos

Die Hirne wurden mit einer modifizierten Golgi-Cox Methode (Corsi, 1987; Ramon-Moliner, 1970) imprägniert. Glaser und Van der Loos beschrieben diese Imprägnierungsmethode in Ihrer Arbeit aus dem Jahr 1981 (Glaser and Van der Loos, 1981). Die herzustellende Imprägnierflüssigkeit besteht aus einer Mischung aus Lösung A, B und C. Lösung A besteht aus 5% Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$) (10 g in 200 ml A. bidest), Lösung B aus 5% Sublimat ($HgCl_2$) (10 g in 200 ml A. bidest) und Lösung C aus 5% Kaliummonochromat (K_2CrO_4) (8 g in 160 ml A. bidest). Ein Schütteln der Lösungen und der Kontakt mit metallischen Instrumenten sollte möglichst vermieden werden.

Die Zusammensetzung der finalen Gebrauchslösung kann aus Tabelle 9 entnommen werden. Zunächst wurde Lösung A mit Lösung B im Verhältnis 1:2 (=1 + 1) gemischt. Anschließend wurde Lösung C mit A. bidest im Verhältnis 1:2,5 (=1 + 1,5) verdünnt. Daraufhin konnte das AB-Gemisch langsam unter Rühren mit einem Glasstab in die verdünnte Lösung C gegossen werden. Die fertige Mischung sollte in einem lichtundurchlässigen Gefäß gelagert werden, da sie dann länger verwendet werden kann. Zudem sollte sie vor Gebrauch fünf Tage ruhen, sodass sich an der Oberfläche und am Boden des Gefäßes Präzipitate bilden können. Die mittlere Phase, die frei von Präzipitaten ist, wurde dann vorsichtig mit einer Pipette in ein frisches Gefäß überführt und für die Imprägnierung der Hirne verwendet. Diese Imprägnierlösung wurde nach 48 Stunden ausgetauscht. Die Hirne verblieben nun für 28-32 Tage bei Raumtemperatur und lichtgeschützt in der Imprägnierlösung. Die dabei stattfindende Reaktion kann durch Temperaturerniedrigung auf 4°C gestoppt werden, z.B. durch Überführung der Gefäße in einen Kühlschrank.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Imprägnierlösung

Bestandteil	Menge
Lösung A: 5% K₂Cr₂O₇	200 ml
Lösung B: 5% HgCl₂	200 ml
Lösung C: 5% K₂CrO₄	160 ml
A. bidest	400 ml
Gesamtvolumen	960 ml

2.2.2. Dehydratisierung

Nachdem das Hirngewebe 3 x 5 min in A. bidest gespült wurde, wurde es im nächsten Schritt mit einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert. Dieser Schritt ist im Rahmen der Vorbereitung auf das Einbetten in Celloidin (siehe 2.2.3) und das Schneiden notwendig. Eine detaillierte Beschreibung findet sich in Tabelle 10.

Tabelle 10: Ethanol-Reihe

Lösung	Dauer	Bemerkungen
A. dest.	3 x 5 min	
50% EtOH	4-5 h	unter leichtem Schütteln, bei 4°C
70% EtOH	über Nacht	unter leichtem Schütteln, bei 4°C
96% EtOH	8 h	unter leichtem Schütteln, bei 4°C
96% EtOH	über Nacht	unter leichtem Schütteln, bei 4°C
abs. EtOH	8 h	unter leichtem Schütteln, bei 4°C
abs. EtOH	über Nacht	unter leichtem Schütteln, bei 4°C
Ether/abs. EtOH 1:1	8 h	im Dunkeln, bei RT.

Diese Schritte wurden der Reihe nach durchgeführt. Wichtig dabei war, dass bis auf den letzten Schritt alle bei 4°C auf einem Schüttler durchgeführt wurden. Im letzten Schritt wurde das Gewebe im Dunkeln und bei RT in der Lösung inkubiert.

2.2.3. Einbettung in Celloidin

Nach der Golgi-Cox-Imprägnierung und Dehydratisierung wurden die Hirne mit einer Lösung aus Celloidin, Ether und Ethanol durchtränkt. Sie wurden in einer Celloidin-Reihe mit aufsteigender Konzentration eingelegt. Die Flüssigkeit sollte

die Präparate jeweils um 2-3 mm übersteigen. Ein Färbekasten mit Deckel ist ein geeignetes Mittel um jedes Hirn direkt mit einer angemessenen Menge Celloidin zu umgeben und die Masse nach oben hin abzudecken. Der Kasten wurde für die Dauer der Schritte in einem Exsikkator mit Chloroform als Trocknungsmittel begast. Die Reihenfolge, Konzentrationen und Dauer der einzelnen Schritte ist in Tabelle 11 abzulesen.

Tabelle 11: Reihe mit Celloidin unterschiedlicher Konzentration

Lösung	Dauer	Bemerkungen
2% Celloidin, Ether/abs. EtOH 1:1	1 Tag	im Dunkeln, bei RT.
4% Celloidin, Ether/abs. EtOH 1:1	3 Tage	im Dunkeln, bei RT
8% Celloidin, Ether/abs. EtOH 1:1	4 Tage	im Dunkeln, bei RT

War der letzte Schritt vollzogen, wurde abgewartet bis die Celloidinmasse eine gummiartige Konsistenz erreicht hatte, dies dauerte 3-4 Wochen.

2.2.4. Herstellung der Schnitte mit anschließender Fixierung

Die Schnittpräparate wurden mit einem Schlittenmikrotom (pfm Slide 2003, pfm medical), welches mit einem Kohlenstoff-Messer ausgestattet war, angefertigt und auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnittdicke betrug 150 µm. Beim Schneiden durfte nun eine Pinzette aus Metall verwendet werden, da die Imprägnierung abgeschlossen war. Die Celloidin-Blöcke wurden während des Schneidens immer wieder mit 70% Ethanol befeuchtet und die fertigen Schnitte im Kühlschrank in 96% Ethanol gelagert. Nach 24 h Lagerung im Kühlschrank in einem luftdichten Gefäß wurden die Schnitte zuerst in eine Petrischale mit 96% Ethanol auf die dort ebenfalls gelagerten Objektträger gelegt. Anschließend wurden die Objektträger herausgenommen, die Schnitte ausgerichtet und mit Filterpapier abgetupft. Danach wurden die Objektträger in

eine Petrischale mit einem 1:1 Ether/Ethanol Gemisch gelegt, sodass sich das Celloidin aufzulösen begann. Bevor es sich vollständig aufgelöst hatte, wurden die Objektträger wiederum entnommen, mit Filterpapier vorsichtig abgetupft und für 10 min in Isopropanol eingelegt. Daran schloss sich eine Xylol-Reihe an, bei der die Objektträger dreimal für je 40 min in Xylol lagen. Nun folgte das Eindecken der Schnitte, bei dem das Einbettmedium Permout™ (Fisher Chemical™, Katalognr. SP15-500) mit einer Pipette auf die Objektträger gegeben wurde. Mit Deckgläsern, die von einer Seite zur anderen vorsichtig abgesenkt wurden, wurden die Schnitte letztendlich fixiert. Nach einer Kontrolle auf Blasenfreiheit, wurde das restliche Permout™ mit einem feinen Stofftuch abgewischt. Die Objektträger wurden zum Trocknen im Dunkeln gelagert.

2.3. Das Neurolucida-System

2.3.1. Hard- und Software

Zur Analyse der Neuronen wurde das Neurolucida-System (v11.01.2, MBF Bioscience) verwendet. Die Hardware bestand aus einem Hellfeld-Mikroskop (BX51, Olympus) inklusive Kamera (CX9000, MBF Bioscience) und Objektiv (U-CMAD3, Olympus), verbunden mit einem Computer mit dem Microsoft Windows 7 Professional Betriebssystem. Bei der maximalen Vergrößerung (100x-Objektiv) wurde Immersionsöl verwendet.

2.3.2. Einstellungen

Während des Rekonstruierens der Neuronen und ihrer Dendriten wurden die Standardeinstellungen der Neurolucida-Software verwendet, allerdings musste immer darauf geachtet werden, dass beim ersten Untersuchen eines Schnittes die Vergrößerung auf „4x1600“ eingestellt war, bzw. dass die Vergrößerung in der Neurolucida-Software der des verwendeten Objektivs entsprach. Des Weiteren war der Beobachtungsmodus auf „*live image*“ eingestellt, um das *Live*-Bild der Mikroskopkamera auf dem Computerbildschirm sehen zu können.

2.3.3. Auswahlkriterien der zu analysierenden Neuronen

Sämtliche für die Messungen verwendeten Neuronen stammten aus der LA der Mäusehirne. Die Grenzen dieser Region wurden zuvor beschrieben (Paxinos and Franklin, 2001; Swanson and Petrovich, 1998). Mithilfe des von Paxinos und Franklin 2001 verfassten Atlas des Mäusehirns, wurde die Region aufgesucht. Neuronen, die deutlich sichtbar im Grenzbereich zu einer benachbarten Hirnregion lagen sowie jene, die durch äußere Einflüsse, wie z.B. das Schneiden sichtlich beschädigt waren, wurden nicht verwendet. Ein weiteres Ausschlusskriterium war eine Überlappung der Zellkörper oder Dendriten mit einem zweiten Neuron, die eine eindeutige Nachverfolgung der Dendriten oder das Erkennen der *Spines* unmöglich machte. Untersucht wurden die pyramidenförmigen Neuronen (siehe 1.3.2), deren Somata in der Regel eine pyramidale Form haben (siehe 3.3, Abbildung 12). Von den Zellkörpern gehen für gewöhnlich etwa 3-6 Dendriten ab, die sich distal weiter aufzweigen. Pyramidale Neuronen besitzen immer einen sogenannten apikalen Dendriten, der länger als die anderen ist und einen sehr geraden Verlauf nimmt (McDonald, 1982).

2.3.4. Rekonstruieren der Dendriten und Spines

Unter Verwendung eines 4x-Objektivs wurde zunächst die laterale Amygdala aufgesucht (siehe Abbildung 10). Nachdem der Referenzpunkt mittig in dieser Region positioniert wurde, konnte zu dem nächststärkeren 10x-Objektiv gewechselt werden. Nachdem nun ein Neuron, das die vorher genannten Kriterien (siehe 2.3.3) erfüllte, gefunden wurde, wurde ein Referenzpunkt mittig in den Zellkörper des Neurons gesetzt. Dieser Schritt musste bei jeder der folgenden Veränderungen der Vergrößerung durchgeführt werden. Das 100x-Objektiv war ein Öl-Objektiv und konnte nur unter Einsatz von Immersionsöl verwendet werden. Während der Verwendung musste es stets mit Öl benetzt sein. Standardmäßig standen die Einstellungen auf „*Cell body*“, daher wurde mit dem Nachzeichnen der Außenkonturen des Zellkörpers begonnen. Mit einem Rechtsklick konnte man über „*finish cell body*“ das Nachzeichnen des Zellkörpers abschließen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass der Fokus so

eingestellt war, dass der Großteil des Somas scharf abgrenzbar war. Die Einstellung wurde in „*Dendrite*“ geändert, sodass als nächstes die basalen Dendriten rekonstruiert werden konnten. Der apikale Dendrit wurde im Anschluss rekonstruiert und hatte dabei die Einstellung: „*Apical dendrite*“. Beim Rekonstruieren wurde unter ständigem Verstellen des Fokus jeder Dendrit auch in der Z-Achse nachverfolgt. Traf man auf eine Gabelung, wurde mit einem Rechtsklick „*Bifurcation/Trifurcation*“ ausgewählt, so konnten beide Äste des Dendriten nacheinander rekonstruiert werden. War ein Dendrit vollständig rekonstruiert, wurde nach einem Rechtsklick „*Ending*“ ausgewählt. Sobald der apikale und alle basalen Dendriten abgearbeitet waren, wurde in der *Spine Toolbar* die „*thin spines*“ ausgewählt. In diesem Projekt wurde nicht zwischen den verschiedenen Arten der *Spines* (Risher et al., 2014) unterschieden, sondern nur die Gesamtzahl der *Spines* bestimmt. Diese sind als kleine Auswüchse aus dem Dendriten zu erkennen und wurden durch einfaches Anklicken markiert. Für ein Beispiel eines rekonstruierten Neurons (siehe 3.3, Abbildung 13). Schließlich wurde das rekonstruierte Neuron in Form einer .DAT Datei abgespeichert. Folgendes Format wurde für die Neuronen beim Abspeichern der NeuroLucida-Datei, als auch bei der späteren Analyse mithilfe des Microsoft Excel-Programms verwendet:

- Nummer der Maus_Nummer des Schnittes R/L_Nummer des Neurons

Dabei steht R/L für die rechte oder linke Hirnhälfte im jeweiligen Schnitt.

2.3.5. Gemessene Parameter

Mit dem Neurolucida-Explorer wurde die abgespeicherte Datei mit den Daten jedes einzelnen Neurons geöffnet und analysiert. Verschiedene messbare Parameter stehen zur Auswahl, für dieses Projekt wurden die folgenden analysiert:

- Gesamtlänge aller Dendriten (μm)
- Länge des apikalen Dendriten (μm)
- Länge der basalen Dendriten (μm)
- Anzahl der *Spines* an allen Dendriten
- Anzahl der *Spines* am apikalen Dendriten
- Anzahl der *Spines* an den basalen Dendriten
- Fläche des Somas (μm^2)
- Gesamtlänge aller Dendriten nach *Branch order* 1-4 (μm)
- \emptyset Länge des apikalen Dendriten nach *Branch order* 1-4 (μm)
- \emptyset Länge der basalen Dendriten nach *Branch order* 1-4 (μm)
- Anzahl der *Spines* an allen Dendriten für *Branch order* 1-4
- Anzahl der *Spines* am apikalen Dendriten für *Branch order* 1-4
- Anzahl der *Spines* an basalen Dendriten für *Branch order* 1-4
- Anzahl der *Spines*/10 μm an allen Dendriten für *Branch order* 1-4
- Anzahl der *Spines*/10 μm am apikalen Dendriten für *Branch order* 1-4
- Anzahl der *Spines*/10 μm an basalen Dendriten für *Branch order* 1-4
- Anzahl der *Branch points*/100 μm an allen Dendriten
- Anzahl der *Branch points*/100 μm an basalen Dendriten
- Anzahl der *Branch points*/100 μm am apikalen Dendriten

Es wurden jeweils nur die *Branch order* 1-4 betrachtet, da die Mehrheit der Dendriten keine fünfte *Branch order* besaß und daher die Messergebnisse durch zu viele Nullwerte verfälscht worden wären.

2.3.6. Statistik

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel ausgewertet. Alle dargestellten Diagramme wurden ebenso mit dieser Software erstellt. Mit dem Neurolucida-Explorer wurde für jeden Parameter eine Tabelle erstellt, welche anschließend in Microsoft Excel übertragen wurde. Die Analysen wurden zunächst für jedes Neuron separat innerhalb eines Genotyps erstellt, anschließend auf eine Maus, und im letzten Schritt für die beiden Genotypen zusammengefasst. Es wurde von jedem Parameter das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und der Standardfehler bestimmt. Für die Statistik wurde in Microsoft Excel mit den auf eine Maus zusammengefassten Durchschnittswerten der KO- und WT-Mäusen ein zweiseitiger t-Test mit homoskedastischer und heteroskedastischer Varianz und einem Signifikanzlevel von $p \leq 0,05$ durchgeführt. Alle signifikanten Abweichungen sind mit einem Stern versehen. Insgesamt wurden 22 Neuronen aus SPRED2-defizienten und 26 aus Wildtyp-Mäusen untersucht. Alle in den Abbildungen angegebenen Werte sind Medianwerte aus der Berechnung für die Boxplot-Diagramme.

3. Ergebnisse

3.1. Genotypisierung der SPRED2-KO-Mäuse

Um den Genotyp der Mäuse für die weiteren Versuche eindeutig identifizieren zu können, wurden sie mithilfe einer PCR genotypisiert. Hierbei wurden WT- und KO-DNA-Fragmente mit spezifischen Primern amplifiziert. Die Bande für den WT-Genotyp liegt bei 677 bp, die des KO-Genotyps bei 461 bp und der HET-Genotyp zeigt beide Banden. Durch die verschiedenen Fragmentgrößen der amplifizierten DNA konnten WT, HET und KO-Mäuse eindeutig identifiziert werden (siehe Abbildung 8).

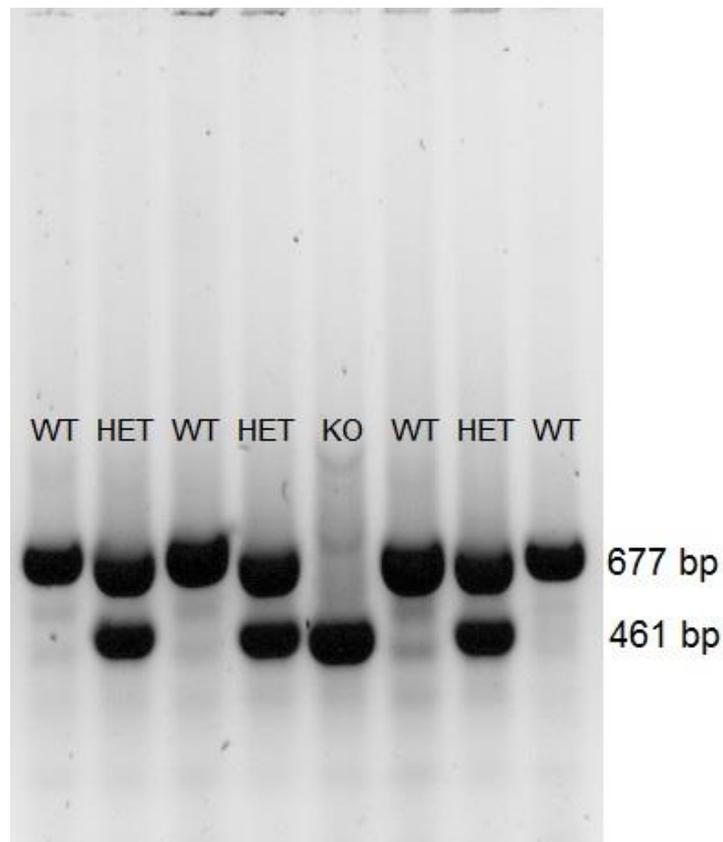


Abbildung 8: Agarose-Gelelektrophorese für die Genotypisierung der Mäuse, (WT=677 bp, KO=461 bp, HET zeigt beide Banden)
WT: Wildtyp; HET: Heterozygot, KO: Knockout; bp: Basenpaare

3.2. Lokalisation der lateralen Amygdala und Auswahl der Neuronen

Um die Lokalisation der BLA zu zeigen, wurden Übersichtsaufnahmen von koronaren Schnitten des Hirns einer SPRED2-KO-Maus angefertigt. Sie wurden mithilfe der Neurolucida-Software aus mehreren Ausschnitten bei 4x-Vergrößerung zusammengesetzt. Die Schnitte wurden mit der Golgi-Cox Methode nach Glaser und Van der Loos (siehe 2.2.1) gefärbt und nach dem Einbetten in Celloidin (siehe 2.2.3) hergestellt. Die BLA ist bilateral vorhanden und in diesem Schnitt mit einer dünnen durchgezogenen Linie umrandet. Der kaudalere basale Anteil hat eine ovale Form und der laterale Kern schließt sich mit seiner spitzen dreieckigen Form kranial an. Die weiße gestrichelte Linie trennt in dieser Abbildung den basalen vom lateralen Anteil (siehe Abbildung 9). Sehr dunkle bis schwarze Verfärbungen können bei starken Überlagerungen von Gewebe bzw. Neuronen entstanden sein.



Abbildung 9: Übersichtsaufnahme eines koronaren Schnittes des Hirns einer SPRED2-KO-Maus. Die BLA ist bilateral sichtbar und mit einer durchgezogenen weißen Linie umrandet. Der basale und der laterale Anteil sind durch eine gestrichelte weiße Linie voneinander getrennt. B: basaler Kern der Amygdala; LA: lateraler Kern der Amygdala

Zur genaueren Eingrenzung des zu untersuchenden Hirnareals in SPRED2-KO-Mäusen wurden Schnitte im Bereich der BLA mit einem 10x-Objektiv angefertigt. Die BLA ist mit einer durchgezogenen weißen Linie umrandet und der basale (B) und laterale Kern (LA) sind durch eine gestrichelte weiße Linie getrennt. Hier werden sehr gut die runde Form des basalen und die dreieckige des lateralen Kerns deutlich (siehe Abbildung 10). Die beiden Kernregionen grenzen an das Putamen (innen), den piriformen Kortex (kranial außen) und den perihirnalnalen Kortex (kaudal außen). Viele Neuronen sind nicht scharf dargestellt, da die Schnitte mit 150 μm sehr dick sind und der Fokus daher nicht immer alle Neuronen gleichzeitig scharf erscheinen lässt. Für diese Arbeit wurden die Pyramidenzellen der LA analysiert.

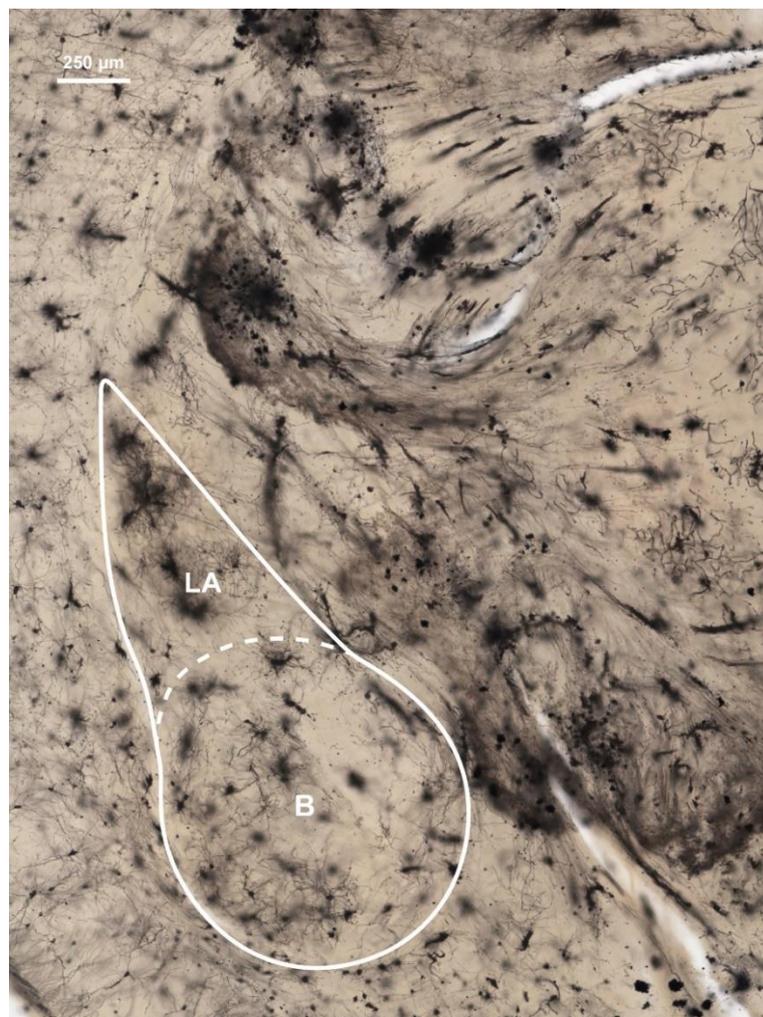


Abbildung 10: Basaler (B) und lateraler (LA) Kern der Amygdala (weiß umrandeter Bereich) im Hirn einer SPRED2-KO-Maus (10x-Objektiv), getrennt durch die gestrichelte Linie.

3.3. Rekonstruktion der Neuronen

Um die Morphologie von einzelnen Neuronen in der Amygdala zu untersuchen wurden die Neuronen mit Hilfe der Neurolucida-Software rekonstruiert. Bei der Auswahl wurden die in 2.3.3 beschriebenen Charakteristika berücksichtigt. Das hier gezeigte Beispiel eines rekonstruierten Neurons zeigt die charakteristischen Merkmale, wie dem pyramidenförmigen Zellkörper, oder dem prominenten apikalen Dendriten, der bei diesem Neuron von der oberen Spitze des Zellkörpers abgeht. Zudem sind drei weitere basale Dendriten, die weniger dominant erscheinen, vorhanden. Die mit roter Farbe entlang der Dendriten eingezeichneten *Spines* sind an primären Dendriten wenig bis gar nicht vorhanden, wohingegen die Anzahl und Dichte nach peripher zunimmt (siehe Abbildung 11).

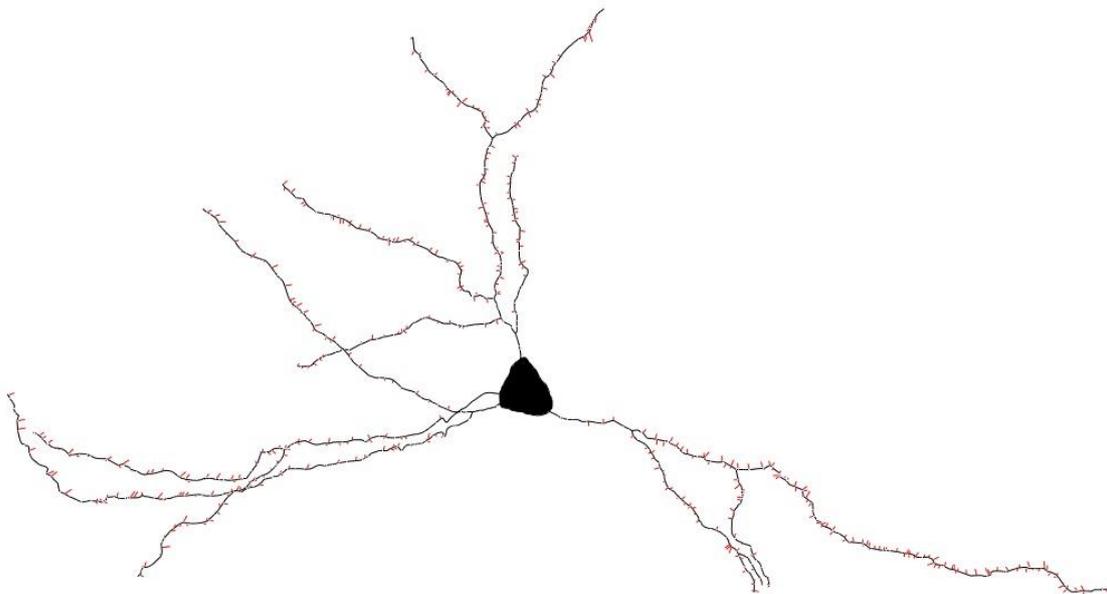


Abbildung 11: Ein mit der Neurolucida-Software rekonstruiertes vollständiges pyramidales Neuron der LA einer SPRED2-KO-Maus. Der apikale Dendrit befindet sich an der oberen Spitze des Neurons, die restlichen drei Dendriten sind basale. Die roten Striche an den Dendriten sind rekonstruierte *Spines* (Mit den verwendeten Softwares war es leider nicht möglich, einen Maßstabsbalken einzufügen)

Damit die Neuronen der LA mit der Neurolucida-Software rekonstruiert werden konnten, mussten sie vorher bei maximaler Vergrößerung (100x-Objektiv) aufgesucht und fokussiert werden. Dabei musste das Objektiv stets in Immersionsöl getaucht sein. Die ausgewählten Neuronen sollten deutlich die gewünschten Charakteristika (siehe 2.3.3), wie in diesem Beispiel den pyramidalen Zellkörper und den von der linken Spitze nach schräg links unten abgehenden apikalen Dendriten. Die Größe des gezeigten Neurons liegt bei etwa $18 \times 12 \mu\text{m}$ (siehe Abbildung 12)

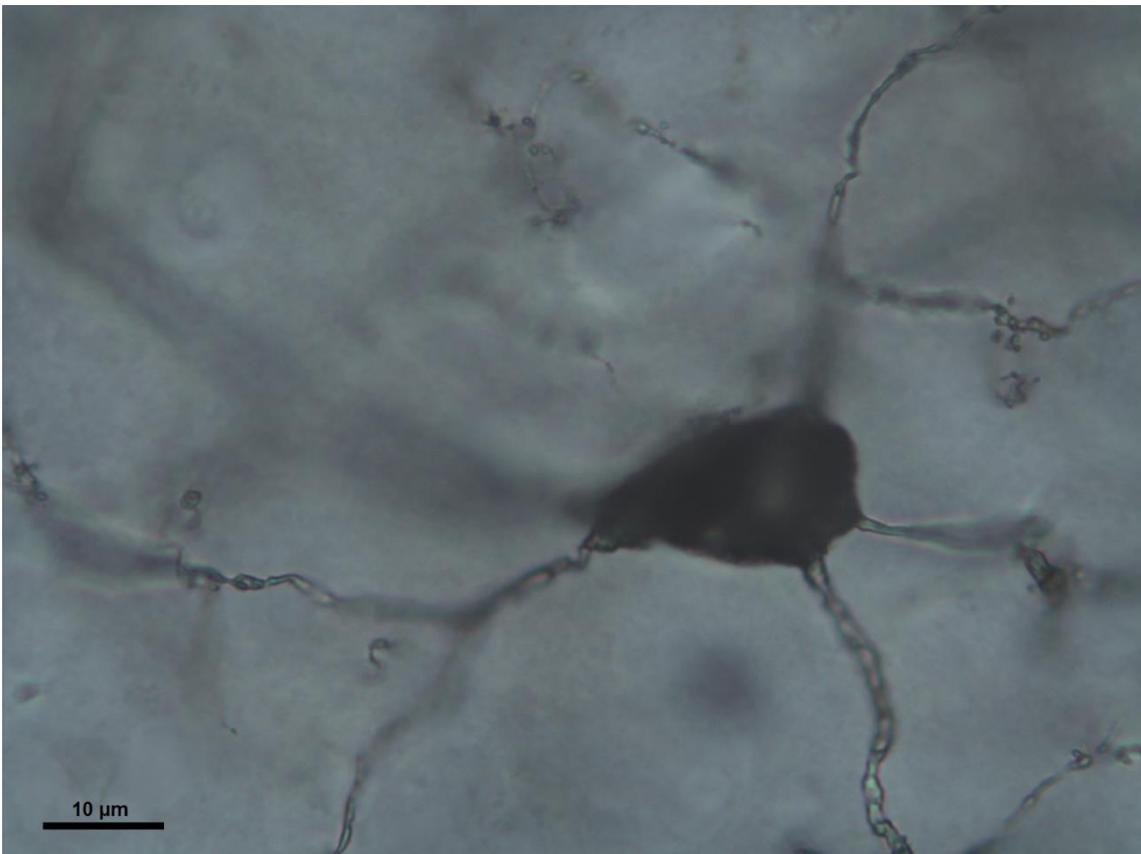


Abbildung 12: Pyramidales Neuron der LA einer SPRED2-KO-Maus (100x-Objektiv)

Für die Analyse und Auswertung der Neuronen der LA, wurden diese mit der Neurolucida-Software bei Betrachtung durch ein 100x-Objektiv rekonstruiert. Im hier gezeigten Beispiel dient der kleine Kreis in der Mitte des Zellkörpers der Positionierung der imaginären Schablone, die mit der Neurolucida-Software über das Neuron gelegt und auf der gezeichnet wird. Er muss zu Anfang manuell positioniert werden und sollte möglichst in der Mitte des Zellkörpers liegen. Die Neuronen werden, um später besser unterschieden werden zu können, mit unterschiedlichen Farben rekonstruiert. Die *Spines* sind als rote Striche dargestellt. In Zellkörpernähe befinden sich deutlich weniger Dendriten als im weiteren Verlauf der Dendriten. Der apikale Dendrit ist hier der nach links oben abgehende (siehe Abbildung 13).

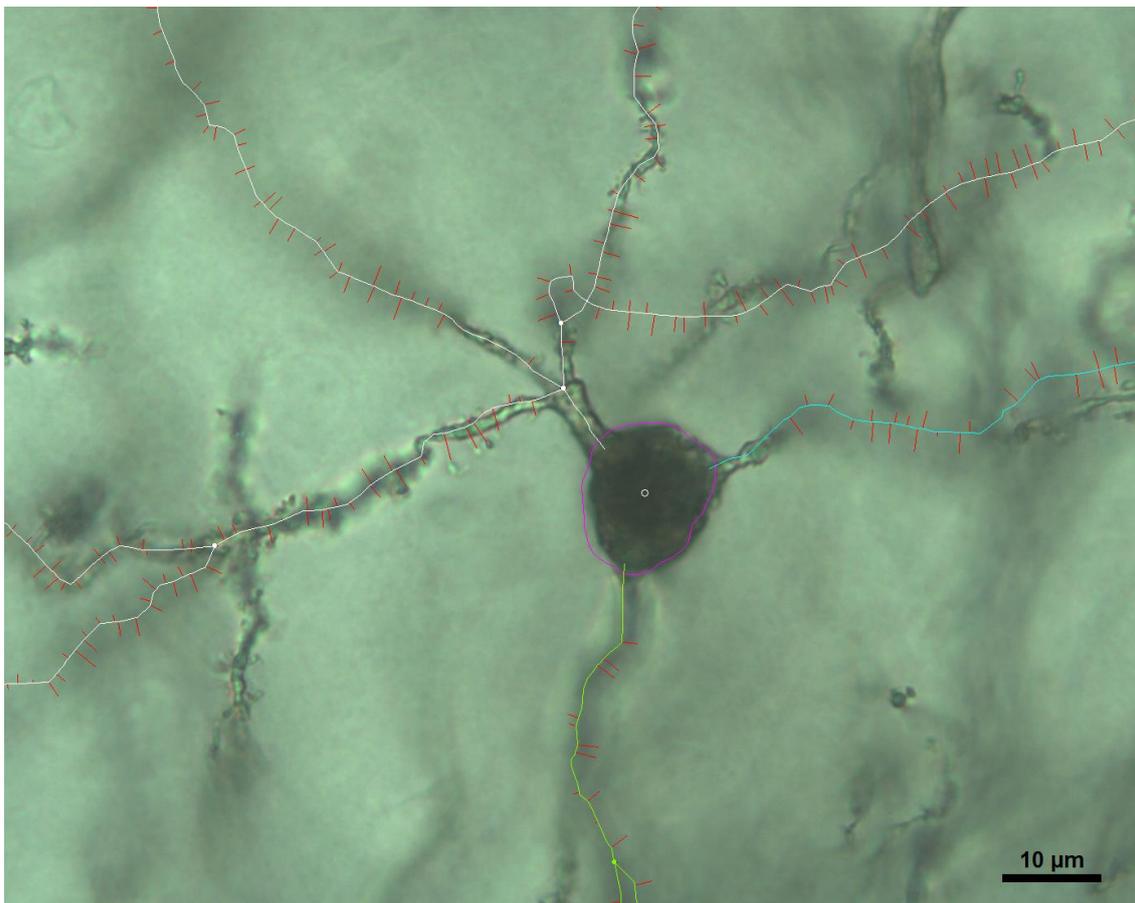


Abbildung 13: Ein mit der Neurolucida-Software rekonstruiertes pyramidales Neuron der LA einer SPRED2-KO-Maus (100x-Objektiv). Die lilafarbene Linie begrenzt das Soma, die grüne und die türkisfarbene Linie markieren die basalen und die weiße Linie den apikalen Dendriten. Die *Spines* wurden mit roten kurzen Strichen eingezeichnet.

3.4. Quantitative Analyse der Morphologie der Pyramidenzellen der LA

Durch die Rekonstruktion der Neuronen konnten sämtliche Parameter, wie Somafläche, Dendriten, *Spines* und *Branch points* zahlenmäßig erfasst und analysiert werden. Die morphologischen Unterschiede zwischen LA-Neuronen in SPRED2-KOs und WT-Kontrollen werden im Folgenden gezeigt. Alle im Text angegebenen Werte sind Medianwerte.

3.4.1. Somafläche

Die Somata der analysierten Neuronen der LA zeigten eine pyramidale Form und wurden ausgewertet, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Somafläche und der verstärkten Erregbarkeit und Übertragung an Synapsen der LA bei SPRED2-KO-Mäusen herzustellen. Das Software Neurolucida, die Umstände der Herstellung der Schnittpräparate und das verwendete Mikroskop ließen eine zweidimensionale Analyse der Somata zu. Die Fläche wurde von dem Neurolucida-Explorer mit Hilfe des übertragenen Maßstabs errechnet. Nachfolgend ist die mittlere Fläche der Somata der amygdaloiden Neuronen in WT und SPRED2-KO-Mäusen gegenübergestellt (siehe Abbildung 14). Zwischen den beiden Genotypen ist nahezu kein Unterschied festzustellen. Die Neuronen sind also in zweidimensionaler Ansicht in Bezug auf ihre Zellkörper Fläche nicht zu unterscheiden, was einen Bezug zu der erhöhten Erregbarkeit und Übertragung ausschließen lässt.

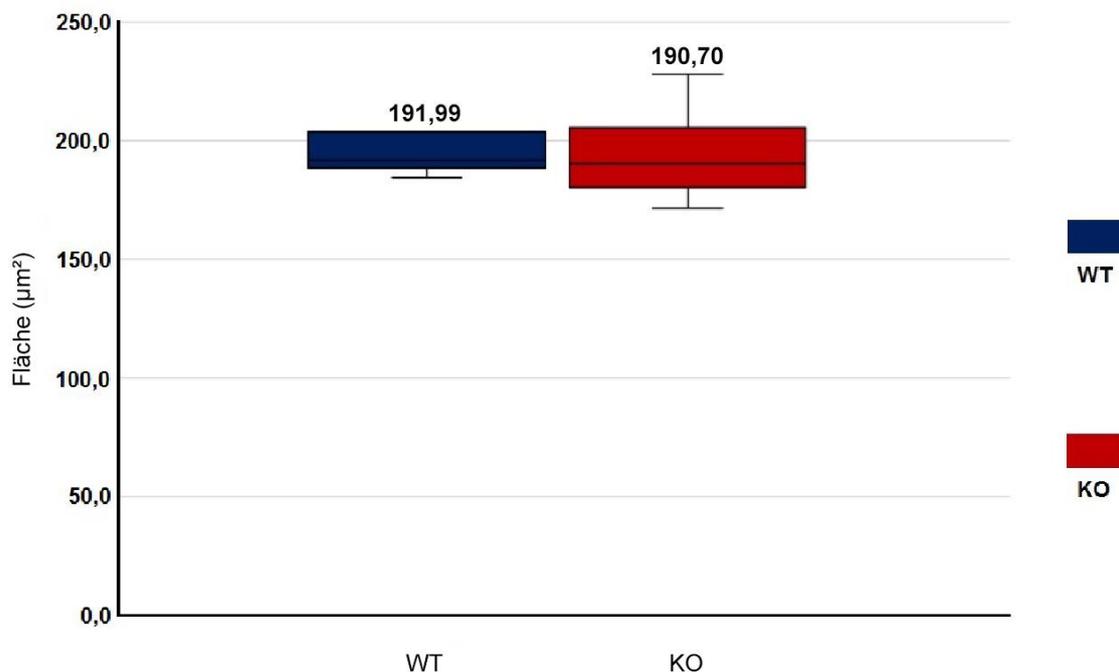


Abbildung 14: Mittlere Somafläche der Neuronen amygdaloider Neuronen. Mit einem zweiseitigen t-Test und einem Signifikanzlevel von $p \leq 0,05$ wurden jeweils 22 Neuronen aus SPRED2-defizienten und 26 aus Wildtyp-Mäusen analysiert. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern („*“) kenntlich gemacht.

3.4.1. Dendritenlänge

Die Dendriten der Neuronen der LA, vor allem der apikale, sind oft mehrfach verzweigt und können im Zusammenhang mit einer verstärkten Übertragung an Synapsen stehen. Eine stärkere Vernetzung der Neuronen könnte derartige Messungen erklären. Zudem finden sich an einem längeren Dendriten in der Regel auch mehr *Spines*, was wiederum die verstärkte Erregbarkeit teilweise erklären könnte. Die Dendriten wurden mit Hilfe der NeuroLucida-Software rekonstruiert und die entsprechenden Längen mit dem NeuroLucida-Explorer berechnet. Nachstehend wurden die Gesamtlängen aller Dendriten nach *Branch order* 1-4 miteinander verglichen (siehe Abbildung 15). Die Aufteilung in die verschiedenen *Branch order* wurde deshalb vorgenommen, da die Längen der Dendriten an Gesamtneuronen keine Veränderungen zeigten. Dabei ist zu erkennen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen WT und SPRED2-KO besteht. Eine kleine Differenz ist lediglich in *Branch order* 3 zu erkennen.

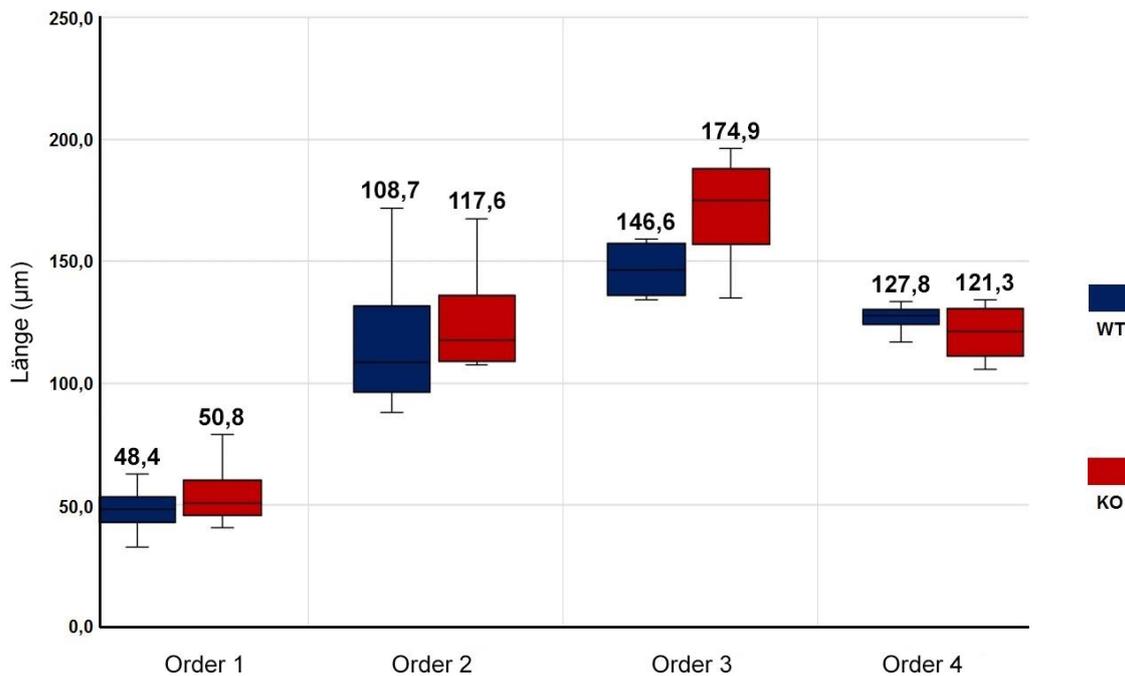


Abbildung 15: Verteilung der Gesamtlänge aller Dendriten nach *Branch order* 1-4. Mit einem zweiseitigen t-Test und einem Signifikanzlevel von $p \leq 0,05$ wurden jeweils 22 Neuronen aus SPRED2-defizienten und 26 aus Wildtyp-Mäusen analysiert. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern („**“) kenntlich gemacht.

In den nächsten Analysen wurde weiter zwischen apikalem und basalen Dendriten unterschieden, um herauszufiltern, ob eventuell dort der entscheidende Unterschied liegt, der die Veränderungen in der Übertragung und der Erregbarkeit der Synapsen bedingt. Weiter unten sind zunächst die mittleren Längen der basalen Dendriten nach *Branch order* 1-4 für WT und SPRED2-KO zu sehen (siehe Abbildung 16). Auch diese Analyse blieb ohne signifikante Unterschiede.

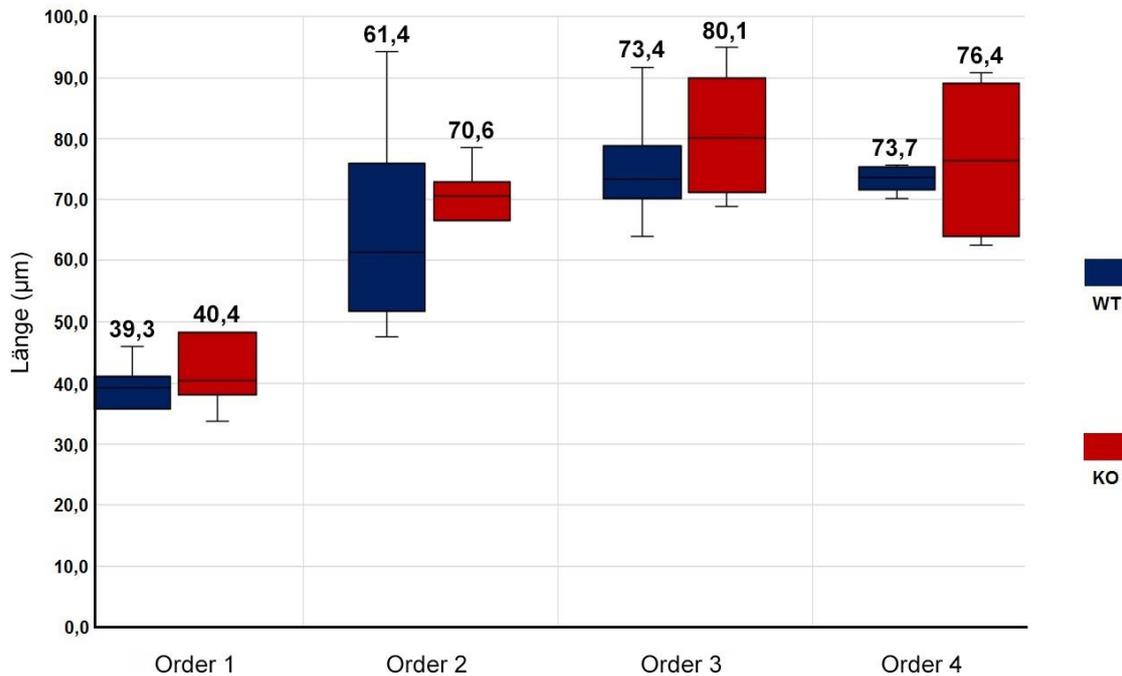


Abbildung 16: Verteilung der mittleren Länge der basalen Dendriten nach *Branch order* 1-4. Mit einem zweiseitigen t-Test und einem Signifikanzlevel von $p \leq 0,05$ wurden jeweils 22 Neuronen aus SPRED2-defizienten und 26 aus Wildtyp-Mäusen analysiert. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern („*“) kenntlich gemacht.

Ebenso wurde die mittlere Länge des apikalen Dendriten nach *Branch order* 1-4 analysiert und weiter unten gegeneinander aufgetragen (siehe Abbildung 17). Die Verteilung der Daten für WT und SPRED2-KO zeigten eine signifikante Abweichung in *Branch order* 3. Die anderen drei *Branch orders* hingegen blieben ohne signifikante Abweichungen. Eine deutlich veränderte Länge der apikalen Dendriten könnte in Verbindung mit der verstärkten Übertragung der Synapsen stehen.

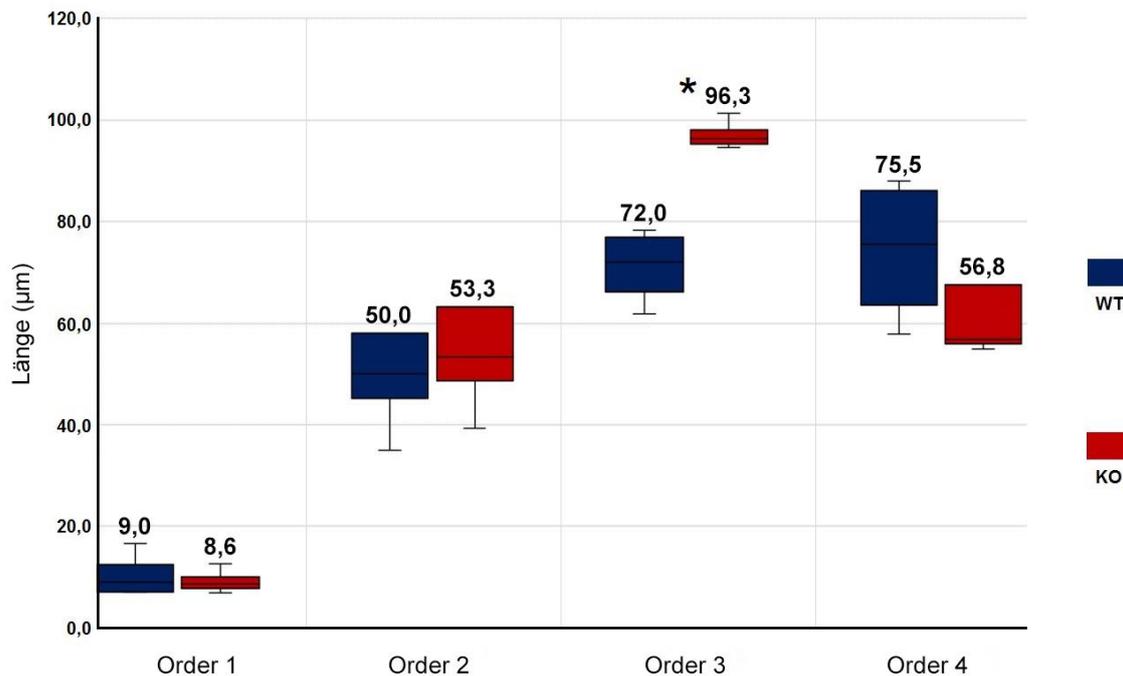


Abbildung 17: Verteilung der mittleren Länge des apikalen Dendriten nach *Branch order* 1-4. Mit einem zweiseitigen t-Test und einem Signifikanzlevel von $p \leq 0,05$ wurden jeweils 22 Neuronen aus SPRED2-defizienten und 26 aus Wildtyp-Mäusen analysiert. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern („*“) kenntlich gemacht.

Da zu diesem Zeitpunkt nur wenige signifikante Unterschiede festzustellen waren, wurden zusätzlich die Gesamtlängen aller basalen Dendriten, die Gesamtlänge des apikalen Dendriten und die Summe aller Dendriten miteinander verglichen. Die Daten der Analyse sind im nachfolgenden Diagramm abgebildet (siehe Abbildung 18). Die Messwerte von WT und SPRED2-KO zeigten erneut keine deutliche Abweichung. Die Gesamtlängen der basalen und apikalen Dendriten und deren Summe, gibt somit auch keinen Anhaltspunkt für eine Verbindung zur verstärkten Erregbarkeit und Übertragung an den Synapsen der LA.

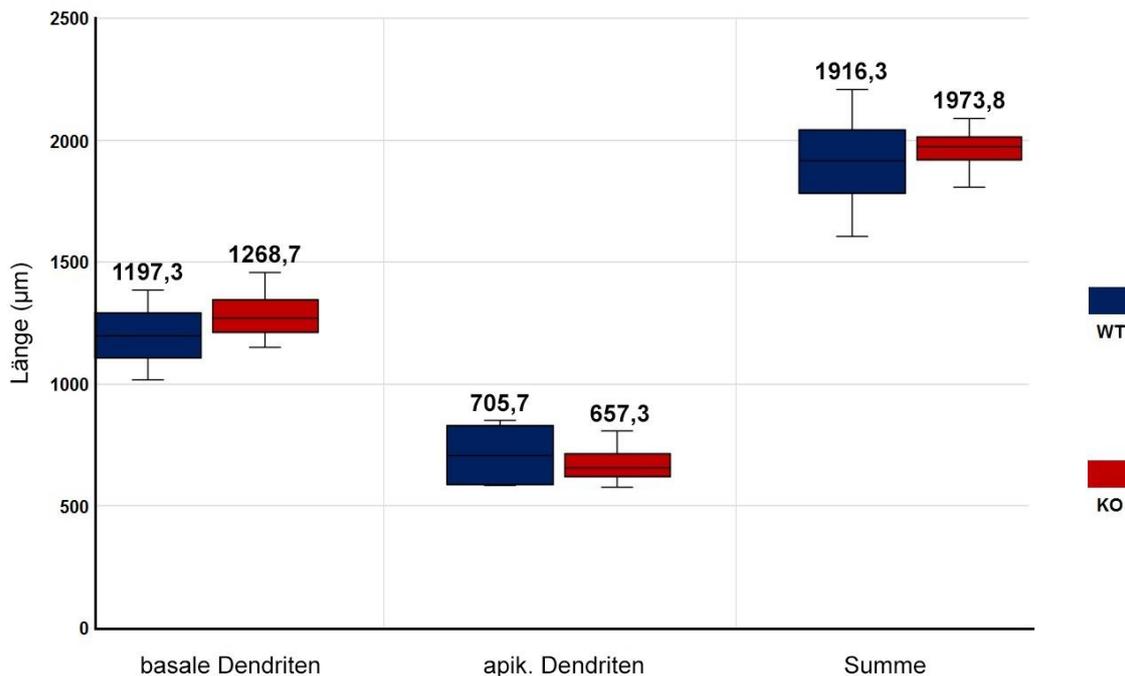


Abbildung 18: Verteilung der aufsummierten Längen der basalen und des apikalen Dendriten und deren Summe. Mit einem zweiseitigen t-Test und einem Signifikanzlevel von $p \leq 0,05$ wurden jeweils 22 Neuronen aus SPRED2-defizienten und 26 aus Wildtyp-Mäusen analysiert. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern („**“) kenntlich gemacht.

3.4.2. Spines

Spines sind Fortsätze an Dendriten, die die Signalübertragung an Synapsen beeinflussen. Sie sind Ausstülpungen der Postsynapse, welche die Erregung von vorgeschalteten Neuronen mit einer präsynaptischen Axonendigung weiterleiten. Die *Spines* wurden mit der NeuroLucida-Software rekonstruiert, und mit Hilfe des NeuroLucida-Explorers ausgezählt. Um zu überprüfen, ob die verstärkte Erregbarkeit amygdaloider Synapsen mit einer Veränderung der *Spine*-Anzahl korreliert, wurde zunächst die Gesamtzahl analysiert. Hierzu wurden die basalen und die apikalen Dendriten zunächst voneinander getrennt betrachtet, im Anschluss zusätzlich deren Summe (siehe Abbildung 19). Die beiden Genotypen WT und SPRED2-KO blieben jedoch ohne signifikante Differenz. So konnte ein Bezug zwischen *Spine*-Anzahl und der verstärkten Erregbarkeit und Übertragung ausgeschlossen werden.

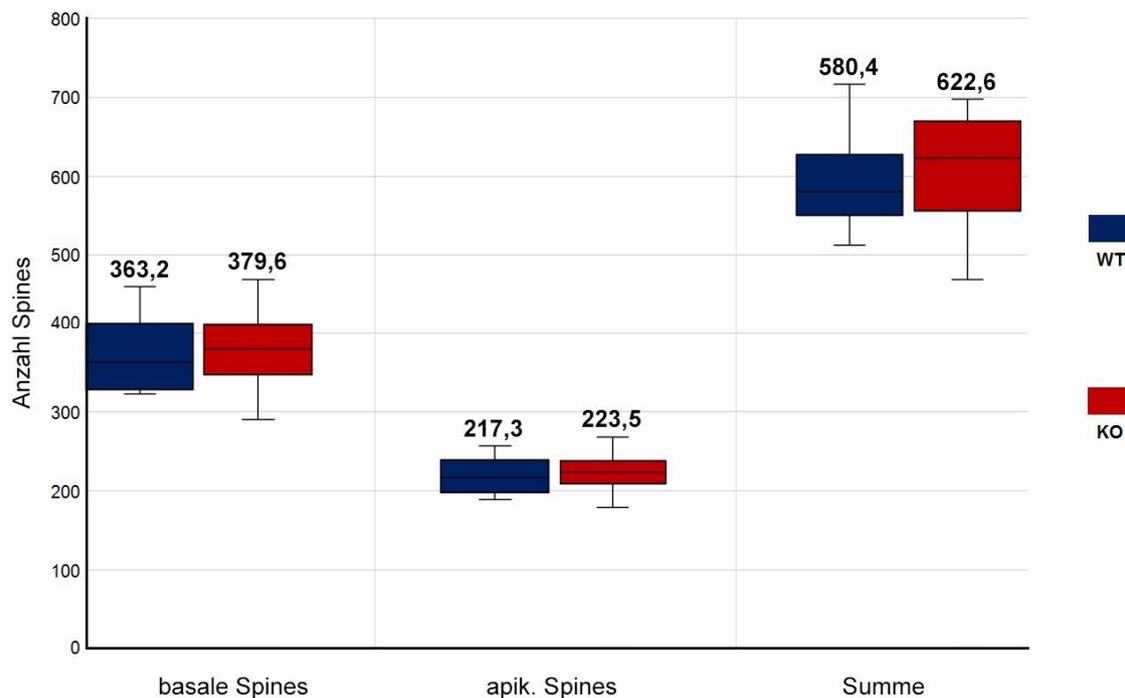


Abbildung 19: Verteilung der Gesamtzahl der *Spines* an basalen und apikalen Dendriten. Mit einem zweiseitigen t-Test und einem Signifikanzlevel von $p \leq 0,05$ wurden jeweils 22 Neuronen aus SPRED2-defizienten und 26 aus Wildtyp-Mäusen analysiert. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern („*“) kenntlich gemacht.

Eine detailliertere Analyse war durch die Betrachtung der Gesamtzahl der *Spines* in Bezug auf die *Branch order* der Dendriten möglich. In dieser Auswertung wurde nicht nach basalen und apikalen Dendriten unterschieden. Die Werte wurden unter Einsatz des NeuroLucida-Explorers mit der *Branch order*-Analyse ermittelt. Die Werte für WT und SPRED2-KO zeigten zwar keinen signifikanten Unterschied, jedoch ist eine tendenzielle Erhöhung der Anzahl der *Spines* in *Branch order* 1-3 zu sehen (siehe Abbildung 20). Dieser wird besonders in *Branch order* 2 und 3 deutlich. Das bedeutet, dass zwar nicht die Gesamtzahl der *Spines*, aber die Anzahl in den *Branch orders* 1-3 eine Rolle bei der verstärkten Erregbarkeit und Übertragung an amygdaloiden Synapsen spielen könnte.

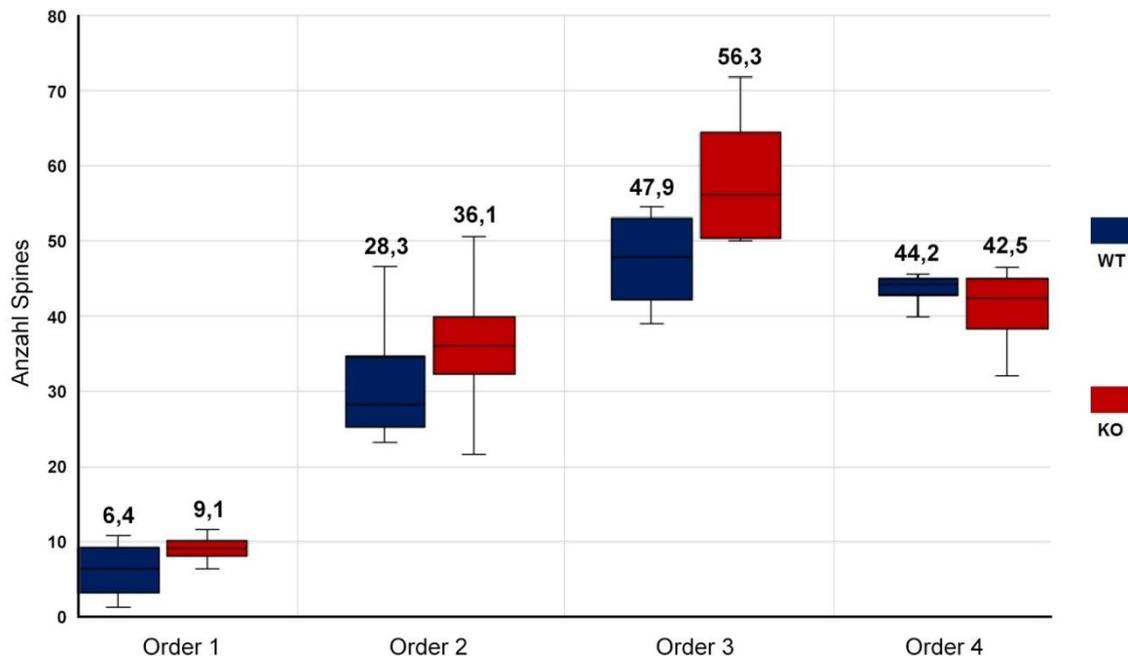


Abbildung 20: Verteilung der Gesamtzahl der *Spines* in *Branch order* 1-4. Mit einem zweiseitigen t-Test und einem Signifikanzlevel von $p \leq 0,05$ wurden jeweils 22 Neuronen aus SPRED2-defizienten und 26 aus Wildtyp-Mäusen analysiert. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern („*“) kenntlich gemacht.

Zum Abschluss der *Spine*-Analyse wurde die Dichte der *Spines* (Anzahl/10 μm Dendritenlänge) in Bezug auf die *Branch order* ausgewertet, da bei einer Veränderung der Erregbarkeit und Übertragung an Synapsen nicht nur die absolute Anzahl, sondern auch die Dichte der *Spines* von Bedeutung sein kann. Die Betrachtung der *Branch orders* wurde in diesem Zusammenhang deshalb vorgenommen, da dies bei der Gesamtzahl der *Spines* bereits tendenzielle Unterschiede hervorbrachte. Die Werte für WT und SPRED2-KO zeigten in dieser Analyse allerdings nahezu keine Differenzen in allen *Branch orders* (siehe Abbildung 21). Daraus lässt sich schließen, dass die Dichte der *Spines* an den Dendriten in SPRED2-KO-Mäusen wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Erregung und Übertragung an amygdaloiden Synapsen hat.

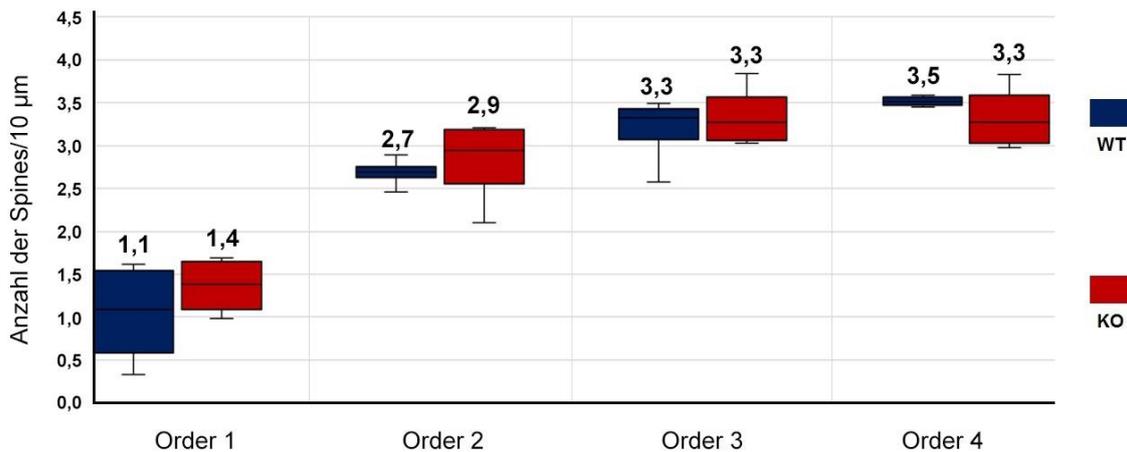


Abbildung 21: Verteilung der Anzahl der *Spines*/10 μm nach *Branch order* 1-4. Mit einem zweiseitigen t-Test und einem Signifikanzlevel von $p \leq 0,05$ wurden jeweils 22 Neuronen aus SPRED2-defizienten und 26 aus Wildtyp-Mäusen analysiert. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern („*“) kenntlich gemacht.

3.4.3. Branch points

Die *Branch points* sind die Verzweigungsstellen der Dendriten, wie sie z.B. in Abbildung 13 (siehe 3.3) zu sehen sind. Von ihnen können zwei oder drei Äste abgehen. In seltenen Fällen auch mehr, jedoch kam dies bei den 48 in dieser Arbeit untersuchten Neuronen kein einziges Mal vor. Sie wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht, da ein besser verzweigtes Neuron eine bessere Übertragung als ein weniger gut verzweigtes gewährleisten kann. Es wurde die *Branch point*-Dichte/100 μm für basale und apikale Dendriten und deren Summe betrachtet (siehe Abbildung 22). Die Daten für SPRED2-KO zeigten lediglich an apikalen Dendriten eine signifikante Abweichung nach unten gegenüber denen für WT. Die basalen, bzw. die Summe aus basalen und apikalen weisen keine signifikante Abweichung auf. Somit scheint eine erniedrigte *Branch point*-Dichte am apikalen Dendriten ebenfalls einen Teil zur verstärkten Übertragung an amygdaloiden Synapsen beizutragen. Eine verringerte Verzweigung am Hauptdendriten könnte durch eine gleichbleibende Anzahl der *Branch points* bei gleichzeitiger erhöhter Dendritenlänge erklärt werden.

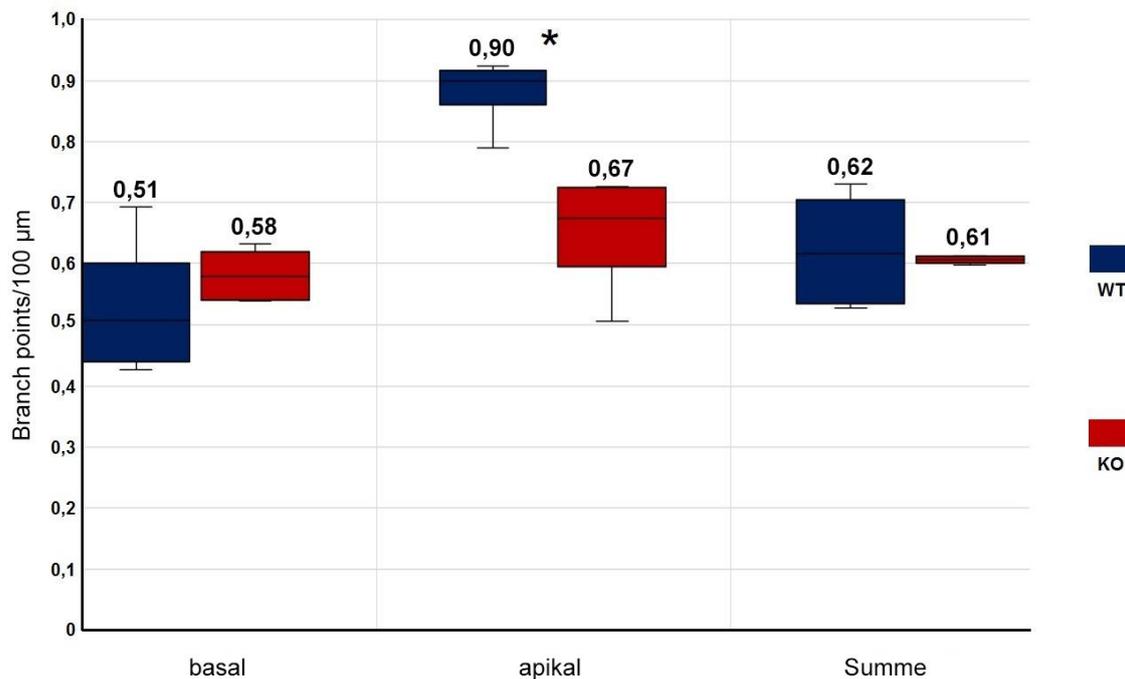


Abbildung 22: Verteilung der Anzahl der *Branch points*/100 µm an basalen und apikalen Dendriten. Mit einem zweiseitigen t-Test und einem Signifikanzlevel von $p \leq 0,05$ wurden jeweils 22 Neuronen aus SPRED2-defizienten und 26 aus Wildtyp-Mäusen analysiert. Signifikante Abweichungen sind mit einem Stern („*“) kenntlich gemacht.

3.4.4. Zusammenfassung

Eine signifikante Erhöhung der mittleren Länge des apikalen Dendriten in *Branch order* 3 und eine tendenzielle Erhöhung der Anzahl der *Spines* in *Branch order* 1-3 können als logische Zusammenhänge zur verstärkten Erregbarkeit und Übertragung an amygdaloiden Neuronen in SPRED2-KO-Mäusen angesehen werden. Mehr *Spines* können auf beides einen Einfluss haben, der verlängerte apikale Dendrit vermutlich lediglich auf Übertragung. Eine Verringerung der *Branch point*-Dichte/100 µm kann durch eine gleichbleibende Anzahl an *Branch points* bei vergrößerter Dendritenlänge erklärt werden.

4. Diskussion

4.1. Zusammenhang zwischen SPRED2, Spine-Morphologie und Elektrophysiologie

In der Einleitung wurde bereits erwähnt (siehe 1.4), dass der TrkB/ERK-MAPK-Signalweg einen Einfluss auf die Morphologie der *Spines* der Neuronen in der LA haben kann. Zuvor wurde belegt, dass das SPRED2-Protein ebendiesen Signalweg inhibiert (Wakioka et al., 2001) (siehe 1.2.1). Zudem wurde in SPRED2-defizienten Mäusen eine erhöhte Erregbarkeit der Synapsen, eine verminderte *Paired-Pulse Facilitation* und eine dysregulierte Expression der Proteine Bassoon, ERC1 und PSD95 festgestellt (Ullrich et al., 2017). Diese Proteine werden ebenfalls mit der *Spine*-Morphologie in Verbindung gebracht. Die beiden erstgenannten Proteine kommen hauptsächlich in der aktiven Zone der präsynaptischen Membran vor und sind essentiell für die Integrität der Strukturen dieser Zone (Sudhof, 2012) und die Freisetzung von präsynaptischen Neurotransmittern in den synaptischen Spalt (Davydova et al., 2014; Kittel et al., 2006). ERC1 ist ein Pendant des Bruchpilot-Proteins der *Drosophila*, dessen Aufgabe es ist, die Ca^{2+} -Kanaldichte und somit die synaptische Transmission nach ausgelösten Stimuli aufrecht zu erhalten (Kittel et al., 2006). Mit einer erhöhten Expression von ERC1, wie in SPRED2-KO-Mäusen der Fall, nimmt also auch die Ca^{2+} -Kanaldichte zu, was wiederum die erhöhte Erregbarkeit der Synapsen der LA erklärt. Die Expression der Glutamatrezeptoren mGluR2 und mGluR5 ist in SPRED2-KO-Mäusen ebenso erhöht (Ullrich et al., 2017). mGluR2 wird sowohl prä-, als auch postsynaptisch exprimiert und seine Funktion besteht darin, die neuronale Erregbarkeit zu senken. Der Rezeptor mGluR5 hingegen ist ausschließlich postsynaptisch zu finden und führt im Gegensatz zu mGluR2 zu einer Erhöhung der neuronalen Erregbarkeit (Benarroch, 2008). Einige Studien weisen darauf hin, dass eine Dysregulation der mGluR-Rezeptoren mit verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen und Angststörungen in Verbindung steht, und dass spezifische mGluR5-Antagonisten und mGluR2-Agonisten vielversprechend als Psychopharmaka zur Behandlung derartiger Erkrankungen eingesetzt werden können (Niswender and Conn, 2010). Die

beobachtete erhöhte Expression von mGluR5 in SPRED2-KO-Mäusen könnte u.a. zu dem OCD-ähnlichen Verhalten und der erhöhten synaptischen Übertragung geführt haben. Auf der anderen Seite ist die ebenfalls erhöhte Expression des mGluR2-Rezeptors möglicherweise bereits ein kompensatorischer Mechanismus als Reaktion auf die Dysregulation von mGluR5. PSD95 ist das Haupt-Gerüstprotein auf der postsynaptischen Seite an glutamatergen Synapsen und bildet Cluster mit ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren (Tu et al., 1999). Diese Clusterbildung erklärt das gleichzeitige erhöhte Vorkommen der mGluR-Rezeptoren und PSD95 im amygdaloiden postsynaptischen Bereich. Veränderungen der Expression von PSD95 werden beim Menschen nachgewiesenermaßen mit einigen Arten von depressivem Verhalten in Zusammenhang gebracht (Keith and El-Husseini, 2008). Bei Mäusen wurden sogar OCD-ähnliche Verhaltensmuster, wie beispielsweise im SAPAP3-KO-Mausmodell, beobachtet (Welch et al., 2007). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hauptsächlich präsynaptisch auftretenden Anomalien an den Synapsen der LA durch eine Dysregulation der Expression von Proteinen und Rezeptoren, welche die präsynaptische aktive Zone und die Freisetzung von Neurotransmittern beeinflussen, wie Bassoon, ERC1 und mGluR2, verursacht werden. Die Dysregulation von postsynaptischen Proteinen und Rezeptoren, wie PSD95 und mGluR5, könnte möglicherweise im Zusammenhang mit der beobachteten tendenziell erhöhten *Branch order*-abhängigen Anzahl der *Spines* an Neuronen der LA in SPRED2-KO-Mäusen stehen. Der TrkB/ERK-MAPK-Signalweg muss in diesem Zusammenhang ebenfalls genannt werden, da durch seine veränderte Aktivität die Dysregulation der oben genannten Proteine erst ausgelöst wird. So hat dieser Signalweg auch an amygdaloiden Neuronen Einfluss auf die *Spine*-Morphologie (Bennett and Lagopoulos, 2014).

Spines übernehmen eine Schlüsselrolle bei der Aufnahme und Weiterleitung von exzitatorischen Reizen an Neuronen. Da in SPRED2-KO-Mäusen die synaptische Übertragung zwischen thalamischen und amygdaloiden Neuronen erhöht und die Erregungsschwelle erniedrigt ist, kann vermutet werden, dass die

tendenziell erhöhte *Spine*-Anzahl und deren Dichte eine morphologische Manifestation der gesteigerten Erregbarkeit darstellen könnte. Dies könnte ebenfalls der Grund für die allgemeine Hyperaktivität der Amygdala sein, welche bei OCD und auch bei Angststörungen auftritt (Breiter et al., 1996; Menzies et al., 2008; Wood and Ahmari, 2015). Auch wenn die SPRED2-KO-Mäuse in Standardtests nicht das erwartete vermehrte Angstempfinden gezeigt haben, zeigten sie sehr wohl andere Symptome, die mit angstbezogenem Verhalten in Verbindung gebracht werden. Darunter fallen durch die Hyperaktivität der HHNA erhöhte Stresshormon-Spiegel (Ullrich et al., 2011) und eine beobachtete Antriebslosigkeit der Mäuse.

Abgesehen von den leichten Veränderungen bei der *Spine*-Anzahl, zeigten Neuronen der LA bei SPRED2-KO-Mäusen bei der morphologischen Analyse zusätzlich Abweichungen bei der mittleren Länge des apikalen Dendriten in höherer *Branch order* und der *Branch point*-Dichte (/100 μm) am apikalen Dendriten. Ersteres manifestierte sich in einer Vergrößerung, wohingegen die *Branch point*-dichte sank. Diese Anomalien können durch einen erhöhten Stresshormonspiegel während der Entwicklungsphase der Neuronen bedingt sein und zeigen sich häufiger in männlichen Tieren (Murmu et al., 2006). Wie weiter oben beschrieben, geht die SPRED2-Defizienz im Mausmodell mit einer Hyperaktivität der HHNA einher, welche ebendiese vermehrte Ausschüttung an Stresshormonen auslöst. Die vergrößerte mittlere Länge des apikalen Dendriten in höherer *Branch order* lässt sich sehr gut mit der erhöhten Erregbarkeit der thalamo-amygdaloiden Neuronen vereinbaren und steht womöglich in kausalem Zusammenhang mit der verminderten *Branch point*-Dichte, da diese bei gleichbleibender Anzahl der *Branch points* und gleichzeitig steigender Dendritenlänge sinkt. Dass ausschließlich der apikale Dendrit betroffen ist, kann eventuell an einem im Gegensatz zu den basalen Dendriten unterschiedlichen Ansprechen auf aktivierte Wachstumsfaktoren und/oder Rezeptoren in der Entwicklungsphase bzw. an der zeitlich getrennten Ausbildung von apikalem und basalen Dendriten liegen. Möglicherweise ist auch hier der die neuronale Morphologie beeinflussende BDNF/TrkB-ERK-Signalweg involviert. Dies bleibt

zu überprüfen, da belegt ist, dass erhöhte Stresshormonspiegel an pyramidalen Neuronen im Hippocampus zu einer Atrophie und verminderten Verzweigung des apikalen Dendriten führen (McKittrick et al., 2000; Reith, 2000).

Die veränderte synaptische Erregbarkeit trägt in der Amygdala als Folge von prä- und postsynaptischen Anomalien zu dem OCD-ähnlichen Verhalten bei SPRED2-KO-Mäusen bei. Aufgrund der Dysregulation von Proteinexpressionen, die durch eine veränderte Gentranskription als Folge der SPRED2-Defizienz und der damit verbundenen erhöhten Aktivität des Ras/ERK-MAPK-Signalwegs entstehen, kommt es zu einer tendenziellen Erhöhung der *Spine*-Anzahl, was der Auslöser für die veränderte synaptische Übertragung zwischen Thalamus und Amygdala sein könnte.

4.2. Beeinflussung des CSTC-Regelkreises durch die Amygdala in SPRED2-KO-Mäusen in Bezug auf OCD

In vorangegangenen Studien wurden Veränderungen von Proteinexpressionen nicht nur an thalamo-amygdaloiden, sondern auch an kortiko-striatalen Synapsen entdeckt. In mutierten Mäusen (SAPAP3/SLITRK5), sowie in Menschen (Aouizerate et al., 2004; Graybiel and Rauch, 2000) mit OCD-Symptomen bzw. OCD-ähnlichem Verhalten wurde eine Dysregulation innerhalb des CSTC-Regelkreises festgestellt. In SPRED2-KO-Mäusen konnte nach elektrophysiologischen Messungen eine erhöhte synaptische Übertragung an kortiko-striatalen Synapsen nachgewiesen werden (Ullrich et al., 2017). Nach kortiko-striataler Stimulation konnte an Mäusen das OCD-ähnliche, zwanghafte Putzverhalten beobachtet werden (Ahmari et al., 2013), woraus sich schließen lässt, dass eine Hyperaktivität dieser Region kausal mit OCD-ähnlichem Verhalten zusammenhängt. Nach aktuellem Wissen, ist eine anomale Funktion des CSTC-Regelkreises die am weitesten verbreitete neurobiologische Erklärung für die Entstehung von OCD. Jedoch zeigen die Ergebnisse der vorliegenden und anderer Arbeiten, dass der Pathomechanismus von OCD über die orbitofronto-striatalen Regionen hinaus bis in die limbischen Regionen, wie dem

Hippocampus, dem anterioren Gyrus cinguli und eben auch der Amygdala reicht (Menzies et al., 2008; Milad and Rauch, 2012; Wood and Ahmari, 2015). Des Weiteren projiziert die BLA, die unter anderem für die Verarbeitung von Emotionen und wichtigen Aspekten der Wahrnehmung zuständig ist, in das ventrale Striatum. Diese Übertragungsprozesse sind bei OCD beeinträchtigt, woraus sich schließen lässt, dass eine abweichende Funktionalität in der Verbindung der beiden Hirnareale ein zwanghaftes Verhalten hervorrufen kann. Die Dysregulation der Aktivität der Amygdala kann dadurch, dass sie das Verhalten affektiv beeinflusst, zusätzlich zu einem zwanghaften Verhalten führen. Daraus kann man schlussfolgern, dass die bei OCD beobachteten Anomalien innerhalb des CSTC-Regelkreises ihren Entstehungsort wahrscheinlich schon in der vorgeschalteten Amygdala haben, was die Regelkreise im nachgeschalteten Hirnareal beeinflusst.

4.3. Die in SPRED2-KO-Mäusen erhöhte Aktivität des TrkB/BDNF-ERK Signalwegs führt zu OCD-ähnlichem Verhalten

Im SPRED2-KO-Mausversuch wurde in Tieren mit OCD-ähnlichem Verhalten eine Hyperaktivität des TrkB/ERK-MAPK-Signalwegs nachgewiesen (Ullrich et al., 2017). In der Amygdala wird der Rezeptor TrkB dabei nicht nur vermehrt exprimiert, auch seine Phosphorylierung ist erhöht, besonders an dem Tyrosinrest 515 (Y515), welche den Ras/ERK-MAPK-Signalwegs aktiviert (Huang and Reichardt, 2003). Dies belegt, dass die erhöhte Aktivität durch TrkB bedingt ist und nachfolgend die Aktivität von Ras und die Phosphorylierung von ERK ansteigt. Gleichbleibende Spiegel an BDNF in der Amygdala zeigen (Ullrich et al., 2017), dass die Hyperaktivität des Signalwegs nicht durch BDNF, sondern vielmehr durch die nicht vorhandene Inhibition aufgrund des SPRED2-Knockouts zu erklären ist. Ferner wurde festgestellt, dass nicht nur der Signalweg durch die BDNF-stimulierte TrkB-Aktivierung ausgelöst, sondern auch SPRED2 phosphoryliert wird (Ullrich et al., 2017), was bei einem hemmenden Effekt von SPRED2 auf den Signalweg einer Autoregulation gleicht. Es bleibt zu

untersuchen, ob die Phosphorylierung essentiell für die Aktivierung von SPRED2 und dessen inhibitorischen Effekt ist (Meng et al., 2012; Quintanar-Audelo et al., 2011). Belegt ist jedoch, dass sie als Schutz vor dem proteolytischen Abbau bestimmter Proteine dienen kann (Meng et al., 2012). Dieser Schutzmechanismus kann die inhibitorische Funktion des SPRED2-Proteins auf den Ras/ERK-Signalweg ermöglichen (siehe dazu 1.2.1, Abbildung 3). Dieser komplexe Regulierungsmechanismus dient vermutlich der Einstellung von physiologischen SPRED2-Spiegeln und der Erhaltung einer normalen Funktion des TrkB/BDNF-ERK-Signalwegs und sorgt schließlich für ein normales Verhalten des Individuums. Der BDNF/TrkB-ERK-Signalweg ist in nahezu allen Phasen der Entwicklung von Neuronen und neuronalen Schaltkreisen involviert und wird mit mehreren neuropsychiatrischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Autry and Monteggia, 2012; Huang and Reichardt, 2001, 2003; Zuccato and Cattaneo, 2009). Jedoch existieren zurzeit nur wenige Studien, die das BDNF/TrkB-System mit OCD in Verbindung bringen (Hall et al., 2003; Hemmings et al., 2008). Die Beteiligung des BDNF/TrkB-ERK-Signalwegs an OCD wurde erst kürzlich durch einen Einsatz des Pharmazeutikums Selumetinib, ein MEK1/2-Inhibitor und spezifischer Inhibitor für die Ras/ERK-MAPK Aktivität, experimentell gezeigt. Es linderte die durch exzessives zwanghaftes Putzverhalten selbst zugefügten Läsionen bei SPRED2-KO-Mäusen (Ullrich et al., 2017). Das Medikament wird normalerweise bei der Tumorbehandlung in Mausmodellversuchen, und aktuell in klinischen Studien am Menschen eingesetzt (Bartholomeusz et al., 2015; Carvajal et al., 2014).

4.4. SPRED2 als neuer Faktor in der OCD Pathogenese

Obwohl SPRED2-KO-Mäuse nicht durch ein gesteigertes Angstempfinden auffallen, kann dennoch davon ausgegangen werden, dass SPRED2 wesentlich an der Pathogenese von OCD beteiligt ist, da sich die Mäuse durch zwanghaftes Putzverhalten selbst Wunden zufügen, obwohl ihre Hautsensibilität und das Schmerzempfinden unverändert ist (Ullrich et al., 2017). Ebenso dafür sprechen

eine Antriebslosigkeit und verminderte Neugier der Mäuse, was als Symptome einer Depression gedeutet werden kann. Es bleibt noch zu zeigen, ob SPRED2-KO-Mäuse ähnliche Lernschwierigkeiten wie Mäuse (Denayer et al., 2008) und Menschen (Brems et al., 2007) mit SPRED1-Defizienz aufweisen. Zusammengenommen können diese Beeinträchtigungen die entsprechende als normal angesehene Reaktion auf angstausslösende Stimuli beeinflussen. Das ist sehr wichtig, da OCD beim Menschen in einem direkten Bezug zu Angst steht. Die geschätzte Komorbidität zwischen OCD und Angststörungen reicht von knapp unter 20% bis nahezu 76% (Bartz and Hollander, 2006; Ruscio et al., 2010) und zwischen OCD und der MDD sind es laut identischer Quellen etwa 40-65%. Diese Kombination aus Zwangsstörung und depressivem Verhalten wird vermutlich auch in den SPRED2-KO-Mäusen ausgeprägt sein und erklärt die Antriebs- und Lustlosigkeit der Tiere. Da Angststörungen in ihren Symptomen und auch in der Neuronenbeschaffenheit und der Verarbeitung von Emotionen teilweise stark von OCD abweichen (Stein et al., 2010), ist OCD laut DSM-5 (5. Auflage des Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) nicht länger den Angststörungen zuzuordnen. Jedoch gibt es auch viele überlappende Aspekte, weswegen man sich im Bereich der psychiatrischen Erkrankungen selten völlig auf eine einzeln auftretende Krankheit einigen kann, seien es Angststörungen, depressive Störungen oder OCD. Ein zweites wichtiges Merkmal von OCD ist die Stressanfälligkeit, die dabei auftretende Verschlimmerung von OCD-Symptomen unter der Einwirkung von Stress, sowie erhöhte Plasmaspiegel an Stresshormonen, wie CRH, ACTH und Kortikosteron. All diese Punkte werden meistens bei OCD-Patienten beobachtet (Altemus et al., 1992; Kluge et al., 2007). Dieser Umstand findet sich in SPRED2-KO-Mäusen in der Hyperaktivität der HHNA, welche zu einer vermehrten Ausschüttung der genannten Stresshormone führt (Ullrich et al., 2011). Als dritter und letzter Punkt ist zu nennen, dass SPRED2-KO-Mäuse auf die Gabe des Pharmazeutikums Fluoxetin ansprechen. Diese Behandlung vermindert effektiv den OCD-ähnlichen Putzzwang (Ahmari et al., 2013; Huang et al., 2008; Shmelkov et al., 2010; Welch et al., 2007). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass SPRED2 durchaus als neuer Faktor für die Pathogenese von OCD oder OCD-ähnlichen Störungen in

Frage kommt und SPRED2-KO-Mäuse zukünftig für die weitere Erforschung von OCD und dessen Verhaltensarten dienlich sein können.

4.5. Modifizierung des Modells zur Pathogenese von OCD

OCD wird schon seit geraumer Zeit erforscht, insbesondere in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wurde der Erkrankung immer mehr Aufmerksamkeit gewidmet. Bis heute wurden mehrere Modelle zur Entstehung von OCD entwickelt, die immer wieder abgeändert, oder neu definiert werden mussten. Zu den älteren zählen die Modelle von Modell, Baxter und Schwartz. Ersteres unterstützt die Hypothese, dass der Erkrankung eine Dysregulation der Basalganglien (Nucleus caudatus, Putamen und Pallidum) bzw. des striatalen Regelkreises zugrunde liegt, welche die neuronale Verbindungsaktivität zwischen OFC und dem medio-dorsalen Kern (MD) des Thalamus moduliert. Diese Dysregulation wird durch fehlgesteuerte dopaminerge und serotoninerge Projektionen von der Substantia nigra und der Raphe-Kerne in das Pallidum und das Striatum ausgelöst (Modell et al., 1989). Im Baxter Modell entsteht OCD einerseits durch Hyperaktivität des orbitofrontalen und cingulären Regelkreises und andererseits durch eine unzureichende Funktion des dorsolateralen-präfrontalen Regelkreises, verursacht durch eine erhöhte Stimulierung der Basalganglien durch Striosome des Striatums (Baxter, 1999). Das Schwartz Modell sieht den Grund für die Pathogenese von OCD in einer Hyperaktivität des Fehlererkennungssystems des Hirns, welches hauptsächlich im Striatum und Nucleus caudatus liegt. Eine große Rolle spielen dabei die cholinergen Interneuronen des Striatums, die TANs (tonically active neurons), dessen Aktivität durch jegliche Information, die für das jeweilige Individuum relevant scheint, moduliert wird (Schwartz, 1999). Diese Modelle sind alle mehr oder weniger präzise und keines von ihnen implementiert die Beteiligung der Amygdala. Auch in neueren Erklärungen für die Pathogenese von OCD wird der Amygdala zunächst wenig Beachtung geschenkt. So wurde der Fokus weiter auf dopaminerge und serotoninerge Neuronen gerichtet. Eine verminderte serotoninerge Aktivität führt zu den klinisch beobachteten zwanghaften,

repetitiven Handlungen und die pharmakologische Behandlung mit SSRIs bessert die Symptome von OCD (Kalivas, 1993; Kapur and Remington, 1996). Im Gegensatz dazu verschlimmert die Medikation mit dem Dopamin D₂/D₃-Rezeptor Agonist Quinpirole das OCD-ähnliche Verhalten bei Ratten, was auch für eine Beteiligung von dopaminergen Neuronen spricht (Eagle et al., 2014). Mit der Erforschung anderer psychiatrischer Erkrankungen und durch das immer besser werdende Verständnis der Regelkreise des Hirns, steht heute fest, dass der CSTC-Regelkreis maßgeblich an der Entstehung von OCD beteiligt ist (Saxena et al., 1998; Saxena and Rauch, 2000). Auch der OFC mit seinem dorsalen anterioren cingulären Kortex (dACC) nimmt Anteil daran, da dieses Areal für Fehlererkennung und Angstkonditionierung mitverantwortlich ist (Milad and Rauch, 2012). Mit den vorliegenden Forschungsergebnissen kann nun auch die Amygdala zu den Hirnarealen gezählt werden, die für die Pathogenese von OCD von Bedeutung sind. Die Dysregulation der Expression von einigen Proteinen und die Entgleisung des Stresshormonspiegels durch die Hyperaktivität der HHNA haben Auswirkungen auf die Morphologie und Funktionsweise der thalamo-amygdaloiden Neuronen und lösen beim Individuum OCD-ähnliche Verhaltensmuster aus. SPRED2 kann hier als eine Art Schlüsselprotein angesehen werden, da dieses den für die Neurogenese wichtigen BDNF/TrkB-ERK-Signalweg inhibiert und der Knockout die Pathogenese der Erkrankung auslöst (Ullrich et al., 2017). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass das Modell der Entstehung von OCD mit den Erkenntnissen dieser Arbeit erweitert wird, es allerdings nach wie vor ein sehr komplexer Mechanismus ist und sehr viele Faktoren beteiligt sind. Nicht nur auf anatomisch-histologischer, sondern auch auf der physiologischen und biochemischen Ebene gibt es viele Aspekte, die noch zu erforschen bleiben.

4.6. Biomarker und Tumorthherapie

Dass der BDNF/TrkB-ERK-Signalweg mit anderen psychiatrischen Erkrankungen, wie z.B. Angststörungen in Verbindung steht, ist bereits etwas länger erwiesen. Individuen, die an Angststörungen oder Depressionen leiden,

zeigen erniedrigte BDNF-Spiegel (Duman and Monteggia, 2006) und einen veränderten Hippocampus (Sheline et al., 1996) mit atrophischen pyramidalen Neuronen (Liu and Zhou, 2012). Eine hippocampale Infusion von BDNF bei Individuen mit depressivem Verhalten löst dagegen Antidepressivum-ähnliche Effekte aus (Shirayama et al., 2002). Aufgrund dieser Ergebnisse kann BDNF für einige Erkrankungen bereits als eine Art Biomarker angesehen werden (Suliman et al., 2013). Bei der Untersuchung der SPRED2-KO-Mäuse konnte kein veränderter BDNF-Spiegel festgestellt werden, obwohl ebenfalls eine morphologische Anomalie an den pyramidalen Neuronen vorliegt, woraus sich schließen lässt, dass BDNF zunächst nicht als Biomarker für OCD in Frage kommt. Dass auf jeden Fall ein Zusammenhang besteht, belegt beispielsweise der Val66Met-Polymorphismus, eine Sequenzvarianz des BDNF-Proteins, der mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von OCD (Hall et al., 2003) einhergeht. Andere Ergebnisse zeigen, dass diese Sequenzvarianz ein Risiko-Allel für die Pathogenese von OCD ist und eventuell sogar mit dem Geschlecht des Individuums zusammenhängt (Hemmings et al., 2008; Katerberg et al., 2009). Die genaue Rolle des Proteins bei der Erkrankung bleibt noch zu erforschen. Die offensichtlich vielfältigen Funktionen von SPRED2 sind ebenfalls noch weitestgehend unbekannt, jedoch kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit von einer Beteiligung des Proteins an der Ausbildung von OCD-ähnlichem Verhalten ausgegangen werden. Allerdings kann hier keinesfalls von einem Biomarker für eine sichere Diagnose oder Prognose gesprochen werden. Sicherlich spielen bei OCD noch weitere Faktoren eine Rolle, doch die Hemmung des BDNF/TrkB-ERK-Signalwegs ist von zentraler Bedeutung und kann auch für die Erforschung komorbider Rasopathien genutzt werden.

Im Gegensatz zu SPRED1 und SPRED3 wird SPRED2 nicht nur in einigen wenigen Organen, sondern fast im ganzen Körper exprimiert (Bundschu et al., 2006; Engelhardt et al., 2004; Kato et al., 2003). Für die Erforschung einiger Erkrankungen kann sich dies zunutze gemacht werden, da SPRED2 mit seiner Wirkung auf den BDNF/TrkB-ERK-Signalweg neben psychiatrischen Erkrankungen auch für die Pathogenese von Tumoren und die Ausbildung von

Metastasen mitverantwortlich sein kann und in dieser Hinsicht bereits als diagnostischer und prognostischer Faktor gehandelt wird (Yoshida et al., 2006) (Jiang et al., 2016; Kachroo et al., 2013). Viele Komponenten des genannten Signalwegs wurden bereits als Protoonkogene identifiziert, welche durch Hyperaktivität oder Mutation fehlregulierte Proteine synthetisieren können, was eine Tumorentwicklung begünstigen kann. Hierunter fallen beispielsweise die Proteine Ras (Chang et al., 1982a; Chang et al., 1982b) und Raf (Rapp et al., 1983) des Signalwegs, interessanterweise mögliche Angriffspunkte der SPRED2-Inhibition. SPRED2 wird u.a. vermehrt in Drüsengeweben exprimiert (Engelhardt et al., 2004), woraus sich die Vermutung ableiten lässt, dass sich im Falle einer Defizienz oder eines Knockouts vermehrt Tumore oder Metastasen in derartigen Geweben bilden. Der zuerst entdeckte Zusammenhang zwischen SPRED2 und einer Tumorerkrankung besteht jedoch beim Leberzellkarzinom (HCC) (Yoshida et al., 2006). Im Menschen fördert eine Hyperaktivität des Ras/Raf-1/ERK-Signalwegs die Ausbildung von Tumoren in der Leber und zusätzlich wurde entdeckt, dass die Expression von SPRED2 im HCC nicht nur erniedrigt ist, sondern sogar eine inverse Korrelation zwischen SPRED2-Expression und Tumorinvasion und Metastasierung besteht (Yoshida et al., 2006). Eine ähnliche Beziehung zeigt sich in Prostatakarzinomen, in denen die Expression von SPRED2 im Gegensatz zu gutartigen Drüsen ebenfalls herabgesetzt ist (Kachroo et al., 2013). Des Weiteren scheint SPRED2 auch bei gastrointestinalen Tumoren beteiligt zu sein, da Mäuse mit Tumoren im GIT eine erhöhte Methylierung des miR-210 Promotors, ein Inhibitor der SPRED2-Expression, zeigen, was in einem erniedrigten SPRED2-Spiegel resultiert (Chen et al., 2015). Erst vor kurzem wurde herausgefunden, dass der MAPK-Signalweg als Marker für Brustkrebs Metastasen dienlich sein kann und dass MEK-Inhibitoren Brustkrebszellen inhibieren (Bartholomeusz et al., 2015). Allgemein lässt sich mittlerweile sagen, dass SPRED2 den Tumorzelltod begünstigt (Jiang et al., 2016). Über eine gesteigerte Reifung von Autophagosomen wird eine Verstärkung des autophagischen Abbaus von Tumorzellen erreicht. Zusammen mit der entdeckten Interaktion und Kollokalisierung mit dem für den Autophagie Mechanismus wichtigen Protein p62 (Jiang et al., 2016), kann dem SPRED2-

Protein mittlerweile durchaus eine Funktion als Tumorsuppressor zugeschrieben werden. Interessant werden diese Fakten in der Therapie von Tumorerkrankungen, da nun mögliche Angriffspunkte und einige Auswirkungen von SPRED2 bekannt sind. Es gibt bereits verschiedene Pharmazeutika, die beispielsweise die Expression von SPRED2 erhöhen, wie den Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib (Liu et al., 2010). Der Signalweg kann auch direkt mit dem MEK1/2-Inhibitor Selumetinib gehemmt werden, wie bei der experimentellen Behandlung von OCD-ähnlichem Putzzwang in Mäusen gezeigt werden konnte (Ullrich et al., 2017). Dies sind jedoch nur erste Schritte in der medikamentösen Therapie von bösartigen Tumorerkrankungen, die in der Zukunft vermutlich und hoffentlich noch um einiges zahlreicher werden.

5. Ausblick

Das SPRED2-Protein nimmt im Körper viele Funktionen ein und einige wichtige sind in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Es ist nicht überlebenswichtig, jedoch bringt eine Defizienz bzw. ein Knockout schwerwiegende Folgen mit sich. Fehlt seine hemmende Funktion auf den BDNF/TrkB-ERK-Signalweg, führt dies in der Amygdala zu morphologischen und elektrophysiologischen Veränderungen der Neuronen. Ob dies auch in anderen Hirnregionen der Fall ist, die womöglich an derartigen Krankheiten beteiligt sind, wie dem Hippocampus, dem Striatum, oder dem Putamen, bleibt zu überprüfen. Jedenfalls ist diese Anomalie mit OCD-ähnlichem Verhalten verbunden. Das Modell zur Pathogenese von OCD sagte bisher im Wesentlichen aus, dass der CSTC-Regelkreis verantwortlich ist. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit und der Forschung an SPRED2-KO-Mäusen kann nun bestätigt werden, dass eine Fehlregulation von Regelkreisen in der Amygdala zur Entstehung von OCD beitragen kann. Ein Knockout des SPRED2-Proteins hat jedoch noch mehr Folgen, wie die Entgleisung der HHNA mit infolgedessen erhöhten Stresshormonspiegeln, eine Dysregulation des für den Wasser- und Mineralhaushalt zuständigen Hormons Aldosteron und der weniger gehemmten Aktivität des BDNF-TrkB-ERK-Signalwegs. Die SPRED2-Defizienz kann zudem zu verringerter autophagischer Aktivität führen und es bleibt zu zeigen, ob dies das Tumorwachstum in Drüsen- und Leberzellen begünstigt. SPRED2 ist daher nicht nur bei der Erforschung psychiatrischer Erkrankungen unentbehrlich, auch in der Onkologie wird das Wissen um das Protein zukünftig eine immer wichtigere Rolle spielen, nicht zuletzt, da die Ergebnisse einen wichtigen Angriffspunkt für pharmakologische Therapien liefern und SPRED2 als diagnostischer und prognostischer Biomarker genutzt werden kann.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden die Folgen einer SPRED2-Defizienz in einem Knockout Mausmodell untersucht. Dabei wurde insbesondere die mögliche Verbindung zur Zwangsstörung, einer psychiatrischen Erkrankung beleuchtet. Das SPRED2-Protein kommt im menschlichen Körper in zahlreichen Geweben vor, besonders im Hirn wurde eine ubiquitäre Expression nachgewiesen und ein Zusammenhang mit der Neurogenese und neuronaler Differenzierung vermutet. Seine regulatorische Funktion besteht in einer inhibitorischen Wirkung auf den BDNF/TrkB-ERK-Signalweg, welcher u.a. für die Transkription neuronaler Gene verantwortlich ist. Die verwendeten SPRED2-defizienten Mäuse wurden durch Insertion eines Gene-Trap Vektors in das *Spred2*-Gen generiert. Die Insertion verhindert letztendlich die korrekte Translation des Proteins. Von der durch weitere Verpaarung entstehenden SPRED2-Knockout Mauslinie wurden ausschließlich männliche Tiere verwendet. Im Rahmen einer SPRED2-KO-Studie von der AG Schuh des Physiologischen Instituts der Universität Würzburg, die u.a. die Entgleisung der HHNA mit resultierendem erhöhten Stresshormonspiegel und eine Dysregulation des Mineralhaushaltshormons Aldosteron zeigte, wurden bei den Versuchstieren zwanghafte Verhaltensmuster beobachtet. Daraufhin wurden elektrophysiologische Messungen durchgeführt, die auf eine Anomalie in der synaptischen Übertragung zwischen Thalamus und Amygdala hindeuteten. Erhöhte Effizienz und Erregbarkeit der amygdaloiden Neuronen führten zu der morphologischen Untersuchung, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Da die Afferenzen des Thalamus vorwiegend in den lateralen Kern der Amygdala projizieren, wurde zunächst dieser betrachtet. Ziel der Untersuchung war es, Erkenntnisse darüber zu erlangen, ob der Knockout des SPRED2-Proteins in Mäusen zu einer veränderten Morphologie der Neuronen der lateralen Amygdala führt. Falls dies der Fall sein sollte, könnte damit zumindest ansatzweise das zwanghafte Verhalten der SPRED2-defizienten Mäusen erklärt werden. Die Hirne der Versuchstiere wurden nach der Golgi-Cox-Imprägnierung nach Glaser und Van der Loos und der Einbettung in Celloidin in 150 µm dicke Scheiben geschnitten und anschließend mithilfe eines Hellfeld-Mikroskops und

des Neurolucida-Systems analysiert. Quantitativ erfasst und analysiert wurden pyramidale Klasse 1-Neuronen der lateralen Amygdala inklusive absoluter Anzahl und Dichte der *Spines* an ihren Dendriten.

Die Untersuchung zeigte bei SPRED2-KO-Mäusen eine signifikante Erhöhung der mittleren Länge des apikalen Dendriten in *Branch order* 3 und eine tendenzielle Erhöhung der Gesamtzahl der *Spines* an den Dendriten in *Branch order* 1-3 gegenüber den Wildtyp-Mäusen. Daraus lässt sich folgern, dass ein Knockout des SPRED2-Proteins sich auf die Morphologie der Neuronen der lateralen Amygdala auswirkt. Die erhöhte mittlere Länge des apikalen Dendriten in *Branch order* 3 und die tendenziell erhöhte *Spine*-Anzahl korrelieren mit der gesteigerten synaptischen Übertragung und Erregbarkeit an amygdaloiden pyramidalen Neuronen. Auf molekularer Ebene kann die Hyperaktivität der lateralen Amygdala als Folge der fehlenden Inhibition des BDNF/TrkB-ERK-Signalwegs und der dadurch veränderten Expression zahlreicher synaptischer Proteine diskutiert werden. Die veränderte Morphologie der Neuronen in der lateralen Amygdala kann eine Ursache für das zwanghafte Verhalten der Mäuse sein, jedoch ist anzunehmen, dass Zwangsstörungen nicht bloß eine monokausale Ursache haben. Diese Arbeit identifiziert SPRED2 als neuen Regulator der Morphologie und Aktivität von Synapsen und die Amygdala als wichtige Hirnregion bei der Entstehung von Zwangsstörungen. SPRED2 ist somit ein vielversprechender Angriffspunkt für andere und spezifischere Untersuchungen der Hirnfunktion und eine potenzielle genetische Ursache für weitere neurologische Erkrankungen.

7. Literaturverzeichnis

- Adler, C.M., McDonough-Ryan, P., Sax, K.W., Holland, S.K., Arndt, S., and Strakowski, S.M. (2000). fMRI of neuronal activation with symptom provocation in unmedicated patients with obsessive compulsive disorder. *J Psychiatr Res* 34, 317-324.
- Adolphs, R. (2008). Fear, faces, and the human amygdala. *Curr Opin Neurobiol* 18, 166-172.
- Adolphs, R. (2010). What does the amygdala contribute to social cognition? *Ann N Y Acad Sci* 1191, 42-61.
- Ahmari, S.E., Spellman, T., Douglass, N.L., Kheirbek, M.A., Simpson, H.B., Deisseroth, K., Gordon, J.A., and Hen, R. (2013). Repeated cortico-striatal stimulation generates persistent OCD-like behavior. *Science* 340, 1234-1239.
- Alonso, M., Medina, J.H., and Pozzo-Miller, L. (2004). ERK1/2 activation is necessary for BDNF to increase dendritic spine density in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Learn Mem* 11, 172-178.
- Alonso, P., Gratacos, M., Menchon, J.M., Saiz-Ruiz, J., Segalas, C., Baca-Garcia, E., Labad, J., Fernandez-Piqueras, J., Real, E., Vaquero, C., *et al.* (2008). Extensive genotyping of the BDNF and NTRK2 genes define protective haplotypes against obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 63, 619-628.
- Altemus, M., Pigott, T., Kalogeras, K.T., Demitrack, M., Dubbert, B., Murphy, D.L., and Gold, P.W. (1992). Abnormalities in the regulation of vasopressin and corticotropin releasing factor secretion in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 49, 9-20.
- Andero, R., Choi, D.C., and Ressler, K.J. (2014). BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. *Prog Mol Biol Transl Sci* 122, 169-192.
- Aouizerate, B., Guehl, D., Cuny, E., Rougier, A., Bioulac, B., Tignol, J., and Burbaud, P. (2004). Pathophysiology of obsessive-compulsive disorder: a necessary link between phenomenology, neuropsychology, imagery and physiology. *Prog Neurobiol* 72, 195-221.
- Autry, A.E., and Monteggia, L.M. (2012). Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Rev* 64, 238-258.

- Bartholomeusz, C., Xie, X., Pitner, M.K., Kondo, K., Dadbin, A., Lee, J., Saso, H., Smith, P.D., Dalby, K.N., and Ueno, N.T. (2015). MEK Inhibitor Selumetinib (AZD6244; ARRY-142886) Prevents Lung Metastasis in a Triple-Negative Breast Cancer Xenograft Model. *Mol Cancer Ther* 14, 2773-2781.
- Bartz, J.A., and Hollander, E. (2006). Is obsessive-compulsive disorder an anxiety disorder? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30, 338-352.
- Baxter, L.R. (1999). Functional imaging of brain systems mediating obsessive-compulsive disorder: clinical studies. *Neurobiology of Mental Illness*, 534-547.
- Baxter, M.G., and Murray, E.A. (2002). The amygdala and reward. *Nat Rev Neurosci* 3, 563-573.
- Benarroch, E.E. (2008). Metabotropic glutamate receptors: synaptic modulators and therapeutic targets for neurologic disease. *Neurology* 70, 964-968.
- Bennett, M.R., and Lagopoulos, J. (2014). Stress and trauma: BDNF control of dendritic-spine formation and regression. *Prog Neurobiol* 112, 80-99.
- Black, D.W., Noyes, R., Jr., Goldstein, R.B., and Blum, N. (1992). A family study of obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 49, 362-368.
- Bordi, F., and LeDoux, J.E. (1994). Response properties of single units in areas of rat auditory thalamus that project to the amygdala. II. Cells receiving convergent auditory and somatosensory inputs and cells antidromically activated by amygdala stimulation. *Exp Brain Res* 98, 275-286.
- Breiter, H.C., Rauch, S.L., Kwong, K.K., Baker, J.R., Weisskoff, R.M., Kennedy, D.N., Kendrick, A.D., Davis, T.L., Jiang, A., Cohen, M.S., *et al.* (1996). Functional magnetic resonance imaging of symptom provocation in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 53, 595-606.
- Brems, H., Chmara, M., Sahbatou, M., Denayer, E., Taniguchi, K., Kato, R., Somers, R., Messiaen, L., De Schepper, S., Fryns, J.P., *et al.* (2007). Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. *Nat Genet* 39, 1120-1126.
- Browne, H.A., Gair, S.L., Scharf, J.M., and Grice, D.E. (2014). Genetics of obsessive-compulsive disorder and related disorders. *Psychiatr Clin North Am* 37, 319-335.
- Bundschu, K. (2005). Generation and characterization of *spred-2* knockout mice.

- Bundschu, K., Gattenlohner, S., Knobloch, K.P., Walter, U., and Schuh, K. (2006). Tissue-specific Spred-2 promoter activity characterized by a gene trap approach. *Gene Expr Patterns* 6, 247-255.
- Bundschu, K., Knobloch, K.P., Ullrich, M., Schinke, T., Amling, M., Engelhardt, C.M., Renne, T., Walter, U., and Schuh, K. (2005). Gene disruption of Spred-2 causes dwarfism. *J Biol Chem* 280, 28572-28580.
- Bundschu, K., Walter, U., and Schuh, K. (2007). Getting a first clue about SPRED functions. *Bioessays* 29, 897-907.
- Bzdok, D., Schilbach, L., Vogeley, K., Schneider, K., Laird, A.R., Langner, R., and Eickhoff, S.B. (2012). Parsing the neural correlates of moral cognition: ALE meta-analysis on morality, theory of mind, and empathy. *Brain Struct Funct* 217, 783-796.
- Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Quevedo, J.F., Milhem, M.M., Joshua, A.M., Kudchadkar, R.R., Linette, G.P., Gajewski, T.F., Lutzky, J., Lawson, D.H., *et al.* (2014). Effect of selumetinib vs chemotherapy on progression-free survival in uveal melanoma: a randomized clinical trial. *JAMA* 311, 2397-2405.
- Chakravarthy, S., Saiepour, M.H., Bence, M., Perry, S., Hartman, R., Couey, J.J., Mansvelder, H.D., and Levelt, C.N. (2006). Postsynaptic TrkB signaling has distinct roles in spine maintenance in adult visual cortex and hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1071-1076.
- Chang, E.H., Furth, M.E., Scolnick, E.M., and Lowy, D.R. (1982a). Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature* 297, 479-483.
- Chang, E.H., Gonda, M.A., Ellis, R.W., Scolnick, E.M., and Lowy, D.R. (1982b). Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 4848-4852.
- Chardin, P., Camonis, J.H., Gale, N.W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M.H., and Bar-Sagi, D. (1993). Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260, 1338-1343.
- Chen, K.C., Liao, Y.C., Wang, J.Y., Lin, Y.C., Chen, C.H., and Juo, S.H. (2015). Oxidized low-density lipoprotein is a common risk factor for cardiovascular diseases and gastroenterological cancers via epigenomical regulation of microRNA-210. *Oncotarget* 6, 24105-24118.
- Corsi, P. (1987). Camillo Golgi's morphological approach to neuroanatomy. *Neuroplasticity: a new therapeutic tool in the CNS pathology*, 1-7.

- Davis, M. (1999). Functional neuroanatomy of anxiety and fear: a focus on the amygdala. *Neurobiology of Mental Illness*, 463-474.
- Davis, M., and Whalen, P.J. (2001). The amygdala: vigilance and emotion. *Mol Psychiatry* 6, 13-34.
- Davydova, D., Marini, C., King, C., Klueva, J., Bischof, F., Romorini, S., Montenegro-Venegas, C., Heine, M., Schneider, R., Schroder, M.S., *et al.* (2014). Bassoon specifically controls presynaptic P/Q-type Ca(2+) channels via RIM-binding protein. *Neuron* 82, 181-194.
- Denayer, E., Ahmed, T., Brems, H., Van Woerden, G., Borgesius, N.Z., Callaerts-Vegh, Z., Yoshimura, A., Hartmann, D., Elgersma, Y., D'Hooge, R., *et al.* (2008). Spred1 is required for synaptic plasticity and hippocampus-dependent learning. *J Neurosci* 28, 14443-14449.
- Doshi, P.K. (2011). Anterior capsulotomy for refractory OCD: First case as per the core group guidelines. *Indian J Psychiatry* 53, 270-273.
- Duman, R.S., and Monteggia, L.M. (2006). A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry* 59, 1116-1127.
- Eagle, D.M., Noschang, C., d'Angelo, L.S., Noble, C.A., Day, J.O., Dongelmans, M.L., Theobald, D.E., Mar, A.C., Urcelay, G.P., Morein-Zamir, S., *et al.* (2014). The dopamine D2/D3 receptor agonist quinpirole increases checking-like behaviour in an operant observing response task with uncertain reinforcement: a novel possible model of OCD. *Behav Brain Res* 264, 207-229.
- Engelhardt, C.M., Bundschu, K., Messerschmitt, M., Renne, T., Walter, U., Reinhard, M., and Schuh, K. (2004). Expression and subcellular localization of Spred proteins in mouse and human tissues. *Histochem Cell Biol* 122, 527-538.
- Everitt, B.J., Parkinson, J.A., Olmstead, M.C., Arroyo, M., Robledo, P., and Robbins, T.W. (1999). Associative processes in addiction and reward. The role of amygdala-ventral striatal subsystems. *Ann N Y Acad Sci* 877, 412-438.
- Flores Alves dos Santos, J., and Mallet, L. (2013). [OCD: when limbic systems start looping...]. *Rev Prat* 63, 643-646.
- Glaser, E.M., and Van der Loos, H. (1981). Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. *J Neurosci Methods* 4, 117-125.
- Goodman, W.K., Price, L.H., Rasmussen, S.A., Mazure, C., Fleischmann, R.L., Hill, C.L., Heninger, G.R., and Charney, D.S. (1989). The Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale. I. Development, use, and reliability. *Arch Gen Psychiatry* 46, 1006-1011.

- Graybiel, A.M., and Rauch, S.L. (2000). Toward a neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Neuron* 28, 343-347.
- Guiton, M., Gunn-Moore, F.J., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D., and Tavaré, J.M. (1994). Identification of in vivo brain-derived neurotrophic factor-stimulated autophosphorylation sites on the TrkB receptor tyrosine kinase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 269, 30370-30377.
- Hacohen, N., Kramer, S., Sutherland, D., Hiromi, Y., and Krasnow, M.A. (1998). sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the *Drosophila* airways. *Cell* 92, 253-263.
- Hall, D., Dhillia, A., Charalambous, A., Gogos, J.A., and Karayiorgou, M. (2003). Sequence variants of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene are strongly associated with obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet* 73, 370-376.
- Hemmings, S.M., Kinnear, C.J., Van der Merwe, L., Lochner, C., Corfield, V.A., Moolman-Smook, J.C., and Stein, D.J. (2008). Investigating the role of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) val66met variant in obsessive-compulsive disorder (OCD). *World J Biol Psychiatry* 9, 126-134.
- Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677-736.
- Huang, E.J., and Reichardt, L.F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72, 609-642.
- Huang, G.J., Bannerman, D., and Flint, J. (2008). Chronic fluoxetine treatment alters behavior, but not adult hippocampal neurogenesis, in BALB/cJ mice. *Mol Psychiatry* 13, 119-121.
- Ikegame, T., Bundo, M., Murata, Y., Kasai, K., Kato, T., and Iwamoto, K. (2013). DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders. *J Hum Genet* 58, 434-438.
- Inoue, H., Kato, R., Fukuyama, S., Nonami, A., Taniguchi, K., Matsumoto, K., Nakano, T., Tsuda, M., Matsumura, M., Kubo, M., *et al.* (2005). Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness. *J Exp Med* 201, 73-82.
- Janak, P.H., and Tye, K.M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature* 517, 284-292.
- Jiang, K., Liu, M., Lin, G., Mao, B., Cheng, W., Liu, H., Gal, J., Zhu, H., Yuan, Z., Deng, W., *et al.* (2016). Tumor suppressor Spred2 interaction with LC3 promotes autophagosome maturation and induces autophagy-dependent cell death. *Oncotarget*.

- Jolkkonen, E., and Pitkanen, A. (1998). Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the central nucleus. *J Comp Neurol* 395, 53-72.
- Kachroo, N., Valencia, T., Warren, A.Y., and Gnanapragasam, V.J. (2013). Evidence for downregulation of the negative regulator SPRED2 in clinical prostate cancer. *Br J Cancer* 108, 597-601.
- Kalivas, P.W. (1993). Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Brain Res Rev* 18, 75-113.
- Kapur, S., and Remington, G. (1996). Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am J Psychiatry* 153, 466-476.
- Kaschel, T.B. (2010). Die Langzeit-Depression in der lateralen Amygdala.
- Katerberg, H., Lochner, C., Cath, D.C., de Jonge, P., Bochdanovits, Z., Moolman-Smook, J.C., Hemmings, S.M., Carey, P.D., Stein, D.J., Sondervan, D., *et al.* (2009). The role of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) val66met variant in the phenotypic expression of obsessive-compulsive disorder (OCD). *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B, 1050-1062.
- Kato, R., Nonami, A., Taketomi, T., Wakioka, T., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., and Yoshimura, A. (2003). Molecular cloning of mammalian Spred-3 which suppresses tyrosine kinase-mediated Erk activation. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 767-772.
- Keith, D., and El-Husseini, A. (2008). Excitation Control: Balancing PSD-95 Function at the Synapse. *Front Mol Neurosci* 1, 4.
- King, J.A., Straffon, A.F., D'Abaco, G.M., Poon, C.L., I, S.T., Smith, C.M., Buchert, M., Corcoran, N.M., Hall, N.E., Callus, B.A., *et al.* (2005). Distinct requirements for the Sprouty domain for functional activity of Spred proteins. *Biochem J* 388, 445-454.
- Kittel, R.J., Wichmann, C., Rasse, T.M., Fouquet, W., Schmidt, M., Schmid, A., Wagh, D.A., Pawlu, C., Kellner, R.R., Willig, K.I., *et al.* (2006). Bruchpilot promotes active zone assembly, Ca²⁺ channel clustering, and vesicle release. *Science* 312, 1051-1054.
- Kluge, M., Schussler, P., Kunzel, H.E., Dresler, M., Yassouridis, A., and Steiger, A. (2007). Increased nocturnal secretion of ACTH and cortisol in obsessive compulsive disorder. *J Psychiatr Res* 41, 928-933.
- Koob, G.F. (1999). The role of the striatopallidal and extended amygdala systems in drug addiction. *Ann N Y Acad Sci* 877, 445-460.

- Lai, C.S., Franke, T.F., and Gan, W.B. (2012). Opposite effects of fear conditioning and extinction on dendritic spine remodelling. *Nature* 483, 87-91.
- Leckman, J.F., Grice, D.E., Boardman, J., Zhang, H., Vitale, A., Bondi, C., Alsobrook, J., Peterson, B.S., Cohen, D.J., Rasmussen, S.A., *et al.* (1997). Symptoms of obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 154, 911-917.
- LeDoux, J.E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23, 155-184.
- Liu, W., and Zhou, C. (2012). Corticosterone reduces brain mitochondrial function and expression of mitofusin, BDNF in depression-like rodents regardless of exercise preconditioning. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1057-1070.
- Liu, X.Y., Yang, Y.F., Wu, C.T., Xiao, F.J., Zhang, Q.W., Ma, X.N., Li, Q.F., Yan, J., Wang, H., and Wang, L.S. (2010). Spred2 is involved in imatinib-induced cytotoxicity in chronic myeloid leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 393, 637-642.
- Liu, Y., Tao, L., Fu, X., Zhao, Y., and Xu, X. (2013). BDNF protects retinal neurons from hyperglycemia through the TrkB/ERK/MAPK pathway. *Mol Med Rep* 7, 1773-1778.
- McDonald, A.J. (1982). Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat. *J Comp Neurol* 212, 293-312.
- McKittrick, C.R., Magarinos, A.M., Blanchard, D.C., Blanchard, R.J., McEwen, B.S., and Sakai, R.R. (2000). Chronic social stress reduces dendritic arbors in CA3 of hippocampus and decreases binding to serotonin transporter sites. *Synapse* 36, 85-94.
- Meng, S., Zhang, M., Pan, W., Li, Z., Anderson, D.H., Zhang, S., Ge, B., and Wang, C. (2012). Tyrosines 303/343/353 within the Sprouty-related domain of Spred2 are essential for its interaction with p85 and inhibitory effect on Ras/ERK activation. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 748-758.
- Menzies, L., Chamberlain, S.R., Laird, A.R., Thelen, S.M., Sahakian, B.J., and Bullmore, E.T. (2008). Integrating evidence from neuroimaging and neuropsychological studies of obsessive-compulsive disorder: the orbitofronto-striatal model revisited. *Neurosci Biobehav Rev* 32, 525-549.
- Miguel, E.C., Leckman, J.F., Rauch, S., do Rosario-Campos, M.C., Hounie, A.G., Mercadante, M.T., Chacon, P., and Pauls, D.L. (2005). Obsessive-compulsive disorder phenotypes: implications for genetic studies. *Mol Psychiatry* 10, 258-275.

- Milad, M.R., and Rauch, S.L. (2012). Obsessive-compulsive disorder: beyond segregated cortico-striatal pathways. *Trends Cogn Sci* 16, 43-51.
- Miyoshi, K., Wakioka, T., Nishinakamura, H., Kamio, M., Yang, L., Inoue, M., Hasegawa, M., Yonemitsu, Y., Komiya, S., and Yoshimura, A. (2004). The Sprouty-related protein, Spred, inhibits cell motility, metastasis, and Rho-mediated actin reorganization. *Oncogene* 23, 5567-5576.
- Modell, J.G., Mountz, J.M., Curtis, G.C., and Greden, J.F. (1989). Neurophysiologic dysfunction in basal ganglia/limbic striatal and thalamocortical circuits as a pathogenetic mechanism of obsessive-compulsive disorder. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1, 27-36.
- Momeny, M., Khorramizadeh, M.R., Ghaffari, S.H., Yousefi, M., Yekaninejad, M.S., Esmaeili, R., Jahanshiri, Z., and Nooridaloui, M.R. (2008). Effects of silibinin on cell growth and invasive properties of a human hepatocellular carcinoma cell line, HepG-2, through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Eur J Pharmacol* 591, 13-20.
- Murmu, M.S., Salomon, S., Biala, Y., Weinstock, M., Braun, K., and Bock, J. (2006). Changes of spine density and dendritic complexity in the prefrontal cortex in offspring of mothers exposed to stress during pregnancy. *Eur J Neurosci* 24, 1477-1487.
- Niswender, C.M., and Conn, P.J. (2010). Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 295-322.
- Nobuhisa, I., Kato, R., Inoue, H., Takizawa, M., Okita, K., Yoshimura, A., and Taga, T. (2004). Spred-2 suppresses aorta-gonad-mesonephros hematopoiesis by inhibiting MAP kinase activation. *J Exp Med* 199, 737-742.
- Nonami, A., Kato, R., Taniguchi, K., Yoshiga, D., Taketomi, T., Fukuyama, S., Harada, M., Sasaki, A., and Yoshimura, A. (2004). Spred-1 negatively regulates interleukin-3-mediated ERK/mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 279, 52543-52551.
- Ohman, A. (2009). Of snakes and faces: an evolutionary perspective on the psychology of fear. *Scand J Psychol* 50, 543-552.
- Olsen, D., Kaas, M., Schwartz, O., Nykjaer, A., and Glerup, S. (2013). Loss of BDNF or its receptors in three mouse models has unpredictable consequences for anxiety and fear acquisition. *Learn Mem* 20, 499-504.
- Packard, M.G., and Cahill, L. (2001). Affective modulation of multiple memory systems. *Curr Opin Neurobiol* 11, 752-756.

- Pasmant, E., Sabbagh, A., Hanna, N., Masliah-Planchon, J., Jolly, E., Goussard, P., Ballerini, P., Cartault, F., Barbarot, S., Landman-Parker, J., *et al.* (2009). SPRED1 germline mutations caused a neurofibromatosis type 1 overlapping phenotype. *J Med Genet* 46, 425-430.
- Pauls, D.L., and Alsobrook, J.P., 2nd (1999). The inheritance of obsessive-compulsive disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 8, 481-496, viii.
- Paxinos, G., and Franklin, K.B.J. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Second Edition.*
- Pitkanen, A., Pikkarainen, M., Nurminen, N., and Ylinen, A. (2000). Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex, and postrhinal cortex in rat. A review. *Ann N Y Acad Sci* 911, 369-391.
- Pitkanen, A., Savander, V., and LeDoux, J.E. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neurosci* 20, 517-523.
- Pittenger, C., Adams, T.G., Jr., Gallezot, J.D., Crowley, M.J., Nabulsi, N., James, R., Gao, H., Kichuk, S.A., Simpson, R., Billingslea, E., *et al.* (2016). OCD is associated with an altered association between sensorimotor gating and cortical and subcortical 5-HT1b receptor binding. *J Affect Disord* 196, 87-96.
- Price, L.H., Russchen, F.T., and Amaral, D.G. (1987). The limbic region. *Handbook of chemical neuroanatomy* 5, 279-388.
- Quintanar-Audelo, M., Yusoff, P., Sinniah, S., Chandramouli, S., and Guy, G.R. (2011). Sprouty-related Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology 1-domain-containing protein (SPRED1), a tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 (SHP2) substrate in the Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. *J Biol Chem* 286, 23102-23112.
- Quirk, G.J., Armony, J.L., and LeDoux, J.E. (1997). Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron* 19, 613-624.
- Quirk, G.J., and Mueller, D. (2008). Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. *Neuropsychopharmacology* 33, 56-72.
- Ramon-Moliner, E. (1970). The Golgi-Cox technique. *Contemporary Methods in Neuroanatomy*, 32-55.
- Rapp, U.R., Goldsborough, M.D., Mark, G.E., Bonner, T.I., Groffen, J., Reynolds, F.H., Jr., and Stephenson, J.R. (1983). Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 4218-4222.

- Rattiner, L.M., Davis, M., French, C.T., and Ressler, K.J. (2004). Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning. *J Neurosci* 24, 4796-4806.
- Reith, M.E.A. (2000). *Cerebral Signal Transduction: From First to Fourth Messengers*. Numana Press.
- Risher, W.C., Ustunkaya, T., Singh Alvarado, J., and Eroglu, C. (2014). Rapid Golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines. *PLoS One* 9, e107591.
- Rolls, E.T. (1992). Neurophysiological mechanisms underlying face processing within and beyond the temporal cortical visual areas. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 335, 11-20; discussion 20-11.
- Romanski, L.M., and LeDoux, J.E. (1992). Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning. *J Neurosci* 12, 4501-4509.
- Ruscio, A.M., Stein, D.J., Chiu, W.T., and Kessler, R.C. (2010). The epidemiology of obsessive-compulsive disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *Mol Psychiatry* 15, 53-63.
- Sasaki, A., Taketomi, T., Kato, R., Saeki, K., Nonami, A., Sasaki, M., Kuriyama, M., Saito, N., Shibuya, M., and Yoshimura, A. (2003). Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nat Cell Biol* 5, 427-432.
- Saxena, S., Brody, A.L., Schwartz, J.M., and Baxter, L.R. (1998). Neuroimaging and frontal-subcortical circuitry in obsessive-compulsive disorder. *Br J Psychiatry Suppl*, 26-37.
- Saxena, S., and Rauch, S.L. (2000). Functional neuroimaging and the neuroanatomy of obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Clin North Am* 23, 563-586.
- Schneier, F.R., Martinez, D., Abi-Dargham, A., Zea-Ponce, Y., Simpson, H.B., Liebowitz, M.R., and Laruelle, M. (2008). Striatal dopamine D(2) receptor availability in OCD with and without comorbid social anxiety disorder: preliminary findings. *Depress Anxiety* 25, 1-7.
- Schwartz, J.M. (1999). A role volition and attention in the generation of new brain circuitry. Toward a neurobiology of mental force. *Journal of Consciousness Studies* 6.
- Sheline, Y.I., Wang, P.W., Gado, M.H., Csernansky, J.G., and Vannier, M.W. (1996). Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3908-3913.

- Shirayama, Y., Chen, A.C., Nakagawa, S., Russell, D.S., and Duman, R.S. (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci* 22, 3251-3261.
- Shmelkov, S.V., Hormigo, A., Jing, D., Proenca, C.C., Bath, K.G., Milde, T., Shmelkov, E., Kushner, J.S., Baljevic, M., Dincheva, I., *et al.* (2010). *Slitrk5* deficiency impairs corticostriatal circuitry and leads to obsessive-compulsive-like behaviors in mice. *Nat Med* 16, 598-602, 591p following 602.
- Spurlock, G., Bennett, E., Chuzhanova, N., Thomas, N., Jim, H.P., Side, L., Davies, S., Haan, E., Kerr, B., Huson, S.M., *et al.* (2009). SPRED1 mutations (Legius syndrome): another clinically useful genotype for dissecting the neurofibromatosis type 1 phenotype. *J Med Genet* 46, 431-437.
- Stein, D.J., Fineberg, N.A., Bienvenu, O.J., Denys, D., Lochner, C., Nestadt, G., Leckman, J.F., Rauch, S.L., and Phillips, K.A. (2010). Should OCD be classified as an anxiety disorder in DSM-V? *Depress Anxiety* 27, 495-506.
- Steiner, P., Higley, M.J., Xu, W., Czervionke, B.L., Malenka, R.C., and Sabatini, B.L. (2008). Destabilization of the postsynaptic density by PSD-95 serine 73 phosphorylation inhibits spine growth and synaptic plasticity. *Neuron* 60, 788-802.
- Sudhof, T.C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron* 75, 11-25.
- Suliman, S., Hemmings, S.M., and Seedat, S. (2013). Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) protein levels in anxiety disorders: systematic review and meta-regression analysis. *Front Integr Neurosci* 7, 55.
- Swanson, L.W., and Petrovich, G.D. (1998). What is the amygdala? *Trends Neurosci* 21, 323-331.
- Taniguchi, K., Kohno, R., Ayada, T., Kato, R., Ichiyama, K., Morisada, T., Oike, Y., Yonemitsu, Y., Maehara, Y., and Yoshimura, A. (2007). Spreds are essential for embryonic lymphangiogenesis by regulating vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. *Mol Cell Biol* 27, 4541-4550.
- Taylor, S. (2013). Molecular genetics of obsessive-compulsive disorder: a comprehensive meta-analysis of genetic association studies. *Mol Psychiatry* 18, 799-805.
- Trabalza, A., Colazingari, S., Sgobio, C., and Bevilacqua, A. (2012). Contextual learning increases dendrite complexity and EphrinB2 levels in hippocampal mouse neurons. *Behav Brain Res* 227, 175-183.

- Tu, J.C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J.P., Petralia, R.S., Brakeman, P., Doan, A., Aakalu, V.K., Lanahan, A.A., Sheng, M., *et al.* (1999). Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins. *Neuron* 23, 583-592.
- Tuduce, I.L., Schuh, K., and Bundschu, K. (2010). Spred2 expression during mouse development. *Dev Dyn* 239, 3072-3085.
- Ullrich, M. (2014). Identification of SPRED2 as a Novel Regulator of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity and of Body Homeostasis.
- Ullrich, M., Bundschu, K., Benz, P.M., Abesser, M., Freudinger, R., Fischer, T., Ullrich, J., Renne, T., Walter, U., and Schuh, K. (2011). Identification of SPRED2 (sprouty-related protein with EVH1 domain 2) as a negative regulator of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Biol Chem* 286, 9477-9488.
- Ullrich, M., and Schuh, K. (2009). Gene trap: knockout on the fast lane. *Methods in molecular biology*. Clifton NJ 561, 145-159.
- Ullrich, M., Weber, M., Post, A.M., and Popp, S. (2017). OCD-like behavior is caused by dysfunction of thalamo-amygdala circuits and upregulated TrkB/ERK-MAPK signaling as a result of SPRED2 deficiency. *Molecular Psychiatry* 00, 1-15.
- van Grootheest, D.S., Cath, D.C., Beekman, A.T., and Boomsma, D.I. (2005). Twin studies on obsessive-compulsive disorder: a review. *Twin Res Hum Genet* 8, 450-458.
- Vanderklish, P.W., and Edelman, G.M. (2002). Dendritic spines elongate after stimulation of group 1 metabotropic glutamate receptors in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1639-1644.
- Vetere, G., Restivo, L., Cole, C.J., Ross, P.J., Ammassari-Teule, M., Josselyn, S.A., and Frankland, P.W. (2011). Spine growth in the anterior cingulate cortex is necessary for the consolidation of contextual fear memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8456-8460.
- Wakioka, T., Sasaki, A., Kato, R., Shouda, T., Matsumoto, A., Miyoshi, K., Tsuneoka, M., Komiya, S., Baron, R., and Yoshimura, A. (2001). Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature* 412, 647-651.
- Welch, J.M., Lu, J., Rodriguiz, R.M., Trotta, N.C., Peca, J., Ding, J.D., Feliciano, C., Chen, M., Adams, J.P., Luo, J., *et al.* (2007). Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature* 448, 894-900.
- Wood, J., and Ahmari, S.E. (2015). A Framework for Understanding the Emerging Role of Corticolimbic-Ventral Striatal Networks in OCD-Associated Repetitive Behaviors. *Front Syst Neurosci* 9, 171.

- Yoshida, T., Hisamoto, T., Akiba, J., Koga, H., Nakamura, K., Tokunaga, Y., Hanada, S., Kumemura, H., Maeyama, M., Harada, M., *et al.* (2006). Spreds, inhibitors of the Ras/ERK signal transduction, are dysregulated in human hepatocellular carcinoma and linked to the malignant phenotype of tumors. *Oncogene* 25, 6056-6066.
- Zhang, W., and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9-18.
- Zuccato, C., and Cattaneo, E. (2009). Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol* 5, 311-322

8. Anhang

8.1. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mir während der Anfertigung meiner Dissertation beistanden und stets an mich geglaubt haben. Ohne Unterstützung wäre mir sicherlich so manches Mal die Motivation verloren gegangen.

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. Kai Schuh danken, der mir damals, dem stressigen Studium zum Trotz, freundlicherweise dieses Dissertationsthema anvertraut hat. Seine nette und offene Art machte die Zeit um einiges leichter. Vielen Dank vor allem auch für die wissenschaftliche Unterstützung, insbesondere bei der anfangs schwierigen Suche nach der richtigen Methodik für diese Studie.

Ein ebenso großer Dank gilt Frau Dr. Melanie Ullrich. Sie hat mir als Teil der AG von Prof. Dr. Kai Schuh viel über wissenschaftliches Arbeiten und Schreiben beigebracht. Es machte mir viel Spaß mit ihr zu diskutieren, oder zahllose Emails hin und her zu senden. Ohne ihren Eifer und ihre motivierende Art, hätte ich diese Dissertation sicherlich nicht in so kurzer Zeit fertigstellen können. Hoffentlich bleiben der Kontakt und vor allem die Freundschaft mit ihr und Prof. Dr. Kai Schuh noch lange erhalten.

Vielen Dank auch an Frau Priv.-Doz. Dr. Angelika Schmitt-Böhrer für die freundliche Zusammenarbeit und dafür, dass wir die Räumlichkeiten und die Ausstattung ihres Labors verwenden durften. An dieser Stelle möchte ich mich ebenso bei Frau Marion Winnig bedanken, die sich netterweise die Mühe und Arbeit gemacht hat, die histologischen Schnitte für uns anzufertigen.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem freundlichen Arbeitgeber Herrn Werner Möhrlein, der mir gerade in der kritischen Phase des Schreibens dieser Dissertation genügend Zeit und Freiräume lies.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich während der Promotion, aber auch schon mein ganzes Leben lang unterstützen. Nicht nur in menschlicher und emotionaler Hinsicht wart ihr für mich immer ein großer Halt und die beste Motivation, auch die große finanzielle Unterstützung weiß ich sehr zu schätzen, ohne die das alles hier sicherlich nicht möglich gewesen wäre. Liebe Mama, lieber Papa, danke für alles.

Liebe Franziska, danke, dass du ein so toller Mensch bist und ich dich meine Lebensgefährtin nennen darf. Mit dir war die Zeit nicht nur erträglicher, sondern hat sogar richtig Spaß gemacht. Danke, dass du mich immer wieder motiviert hast und in jeder Lebenslage für mich da warst und es noch bist.

8.2. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Martin Zechner
Geburtsdatum/-ort: 10.04.1991, Würselen
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Berufstätigkeit

seit 05/2018 Tätigkeit als angestellter Vorbereitungsassistent in der Zahnarztpraxis Geldersheim, Würzburger Str. 1, 97505 Geldersheim

11/2016-04/2018 Tätigkeit als angestellter Vorbereitungsassistent in der Zahnarztpraxis Werner Möhrlein, Versbacher Str. 108, 97078 Würzburg

Studium

04/2011-06/2016 Studium der Zahnmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Abschluss: Examen und Zulassung zur Promotion an der Physiologischen Fakultät

Ausbildung

10/2010-03/2011 Ausbildung zum Zahntechniker im Dentallabor Pohl, Daimlerstr. 57, 48308 Senden

Ohne Abschluss

Schule

08/2001-06/2010 Besuch des Gymnasium Remigianum, Josefstr. 6, 46325 Borken

Abschluss: Abitur (Durchschnittsnote 1,8)

Würzburg, Januar 2018

Martin Zechner

