

Aus dem Institut für Physiologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. habil. Manfred Heckmann

**„Quantifizierung von prä- und postsynaptischen Protein-Veränderungen in
der Amygdala-Region in SPRED2-defizienten Mäusen“**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Hans Guerrero González

Aus Mexiko-Stadt

Würzburg, April 2020

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh

Korreferentin: Prof. Dr. med. Nurcan Üçeyler

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Sarah Kittel-Schneider

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

03. November 2020

Der Promovend ist Arzt

Die vorliegende Arbeit wurde unter Betreuung von
Herrn Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh
am Physiologischen Institut
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Teile dieser Dissertation wurden bereits in einer
wissenschaftlichen Publikation
veröffentlicht.

Für meinen geliebten Vater

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	
Abkürzungsverzeichnis	
1. Einleitung	1
1.1. Die Zwangsstörungen	1
1.1.1. Pathomechanismus von Zwangsstörungen	2
1.1.2. Die Rolle von SPRED-Proteinen bei OCD	5
1.3. BDNF/TRKB-Signalling	6
1.4. SPRED-Proteine	7
1.4.1. SPRED-Proteine: Genom- und Proteinstruktur	8
1.4.2. Expression, Muster und Lokalisation von SPRED-Proteinen	9
1.4.3. SPRED Funktion	9
1.5. Der MAPK Signalweg	11
1.5.1. Der Ras/ERK/MAPK Signalweg	11
1.6. Die Synapse	15
1.7. Synaptische Proteine	16
1.7.1. Präsynaptische Proteine	16
1.7.2. Postsynaptische Proteine	18
1.8. Die Amygdala	18
1.8.1. Verbindungen	20
1.8.2. Zelluläre Mechanismen	22
1.9. Das Mausmodell in der Forschung	25
1.9.1. Generierung der SPRED2 KO-Mäuse	25
2. Material und Methoden	27
2.1. Haltung und Züchtung der Mäuse	27
2.2. Verwendete Mäuse	27
2.3. Genotypisierung der SPRED2 KO-MÄUSE	29

2.4. Entnahme der Gehirne	30
2.5. Material X-Gal Färbung	31
2.5.1. Chemikalien und Reagenzien	31
2.5.2. Geräte	31
2.5.3. Methoden-X-Gal Färbung	31
2.6. Western Blot	32
2.6.1. Chemikalien und Reagenzien	32
2.6.2. Antikörper	33
2.6.3. Geräte	34
2.6.4. Verbrauchsmaterialien	34
2.6.5. Methode-Western Blot	34
2.7. Real-Time PCR	35
2.7.1. Chemikalien und Reagenzien	35
2.7.2. Primer	36
2.7.3. Geräte	36
2.7.4. Methoden- Real-Time PCR	36
2.7.5. RNA-Aufreinigung	37
2.8. Optische Dichte Messung	37
2.9. Statistik	37
3. Ergebnisse	39
3.1. X-Gal Färbung	39
3.2. Western Blot	40
3.2.1. Expressionsveränderung der synaptischen Proteine in der Amygdala	40
3.3. Quantitative Real-Time-PCR	47
4. Diskussion	51
4.1. OCD Verhalten bei SPRED2 KO-Mäusen	51
4.2. OCD-ähnliches Verhalten durch erhöhte Aktivität des TrkB/BDNF-ERK Signalwegs In SPRED2 KO-Mäusen	52

4.3. Veränderungen in der Synaptischen Aktivität und -Morphologie bei SPRED2 Defizienz	54
4.4. Dysregulation des CSTC-Regelkreises bei SPRED2 KO-Mäusen	57
5. Zusammenfassung	59
6. Literaturverzeichnis.....	61
7. Anhang
7.1. Danksagung.....
7.2. Lebenslauf

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: DAS LIMBISCHE SYSTEM; HIRNAREALE BETEILIGT AN DER ENTSTEHUNG UND VERARBEITUNG VON EMOTIONEN.....	3
ABBILDUNG 2: HAUTVERLETZUNGEN DURCH ZWANGHAFTE SELBSTPFLEGE VON SPRED2 KO MÄUSEN	4
ABBILDUNG 3: PROTEINSTRUKTUR UND GENOMISCHE EXON/INTRO ORGANISATION VON SPRED2.....	9
ABBILDUNG 4: SPRED PROTEINE-INHIBITOREN DES RAS/ERK/MAPK SIGNALWEGS	10
ABBILDUNG 5: DER RAS/ERK/MAPK SIGNALWEG.....	14
ABBILDUNG 6: DIE SYNAPSE	16
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER TIEFEN AMYGDALAKERNE UND IHRE INTRAAMYGDALOIDEN VERBINDUNGEN.....	21
ABBILDUNG 8: GENERIERUNG DER SPRED2 KO-MÄUSE	26
ABBILDUNG 9: X-GAL FÄRBUNG EINES KORONAREN SCHNITTES VON EINER SPRED2 HETEROZYGOTEN MAUS	39
ABBILDUNG 10: WESTERN BLOTS VON SPRED1 UND -2 IN WT- UND KO-MÄUSEN	41
ABBILDUNG 11: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES QUANTIFIZIERTEN SIGNALS VON SPRED1 IN WT- UND KO-MÄUSEN NACH NORMIERUNG MIT GAPDH.....	41

ABBILDUNG 12: RELATIVE PROTEINEXPRESSION VON SPRED2 IN WT- UND KO-MÄUSEN	42
ABBILDUNG 13: WESTERN BLOT VON PRÄSYNAPTISCHEN PROTEINEN IN DER AMYGDALA..	43
ABBILDUNG 14: RELATIVE PROTEINEXPRESSION DER PRÄSYNAPTISCHEN PROTEINE IN WT- UND KO-MÄUSEN	43
ABBILDUNG 15: WESTERN BLOT VON POSTSYNAPTISCHEN PROTEINEN IN DER AMYGDALA	44
ABBILDUNG 16: RELATIVE PROTEINEXPRESSION DER POSTSYNAPTISCHEN PROTEINEN IN WT- UND KO-MÄUSEN	45
ABBILDUNG 17: WESTERN BLOT VON TUBULINE IN DER AMYGDALA	46
ABBILDUNG 18: RELATIVE PROTEINEXPRESSION VON TUBULINE IN WT- UND KO-MÄUSEN	46
ABBILDUNG 19: RELATIVER MRNA WERT VON BASSOON IN WT- UND KO-MÄUSEN	48
ABBILDUNG 20: RELATIVER MRNA WERT VON ERC1 IN WT- UND KO-MÄUSEN.	48
ABBILDUNG 21: RELATIVER MRNA WERT VON MGLU2 IN WT- UND KO-MÄUSEN	49
ABBILDUNG 22: RELATIVER MRNA WERT VON MGLU5 IN WT- UND KO-MÄUSEN	49
ABBILDUNG 23: RELATIVER MRNA WERT VON PSD95 IN WT- UND KO-MÄUSEN	50

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: AMYGDALA KERNE UND EINTEILUNG.....	20
TABELLE 2: VERWENDETE WILDTYP MÄUSE	28
TABELLE 3: VERWENDETE KNOCKOUT MÄUSE.....	28
TABELLE 4: REAGENZIEREN FÜR DIE GENOTYPISIERUNG MITTELS PCR ANALYSE.....	29
TABELLE 5: SEQUENZEN DER BENUTZTEN PRIMER FÜR DIE KO UND WT PCR	29
TABELLE 6: ZYKLUS FÜR AMPLIFIZIERUNG VON KLEINEN DNA ABSCHNITTEN.....	30

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAA	Anteriore amygdaloide region
AB	Akzessorischer basaler Kern
B	Basaler Kern
BAOT	Bed nucleus des akzessorischen olfaktorischen Traktes
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
Bp	Basenpaar
Ca ²⁺	Calcium
CE	Zentraler Kern
CO _p	Anteriorer kortikaler Kern
CRH	Corticotropin-releasing hormone
CS	Konditionierter Stimulus
CSTC	Cortico-striato-thalamo-cortical
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERC1	ELKS/RAB6-Interacting/CAST Family Member 1
ERK	Extracellular-signal regulated kinase
EVH-1	Enabled/VASP homology 1 domain
GDP	Guanosindiphosphat
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
HET	Heterozygot
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
M	Medialer Kern
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	Dual specificity mitogen-activated protein kinase
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
mRNA	Messenger ribo nucleic acid/Boten-Ribonukleinsäure
NLOT	Kern des lateralen olfaktorischen Traktes
OCD	Obsessive-compulsive Disorder/ Zwangsstörung
PCR	Polymerase chain reaction/ Polymerase- Kettenreaktion
PSD95	Postsynaptic density protein 95
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonucleic acid/Ribonukleinsäure
SHC2	Src homology 2 domain containing
SOS	Son of Sevenless
SPR	Sprouty-Domäne
SPRED	Sprouty-related (protein) with EVH1 domain
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitor/ selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
US	Unkonditionierter Stimulus
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
WT	Wildtyp

1. EINLEITUNG

1.1. DIE ZWANGSSTÖRUNGEN

Zwangsstörungen sind neuropsychologische Erkrankungen, die durch immer wiederkehrende zwanghafte Gedanken (Obsessionen) und deren Kompensation durch repetitives Verhalten oder mentale kompulsive Tätigkeiten (Zwänge), charakterisiert sind. Die Zwänge werden üblicherweise durch das Individuum durchgeführt um die Sorgen, die durch die Obsessionen verursacht werden, zu entlasten. Den Betroffenen ist meistens bewusst, dass dieses Verhalten übertrieben und irrational ist, sie können dieses aber nicht unterbrechen. So erleben sie eine erhebliche Einschränkung in ihrem Alltag und ihrer Lebensqualität. OCD (Obsessive-compulsive Disorder) hat eine Inzidenz von 1,5-3% in der Bevölkerung und kann während der Kindheit oder im Erwachsenenalter manifest werden. Die häufigsten Arten von Obsessionen sind: Verschmutzung, pathologischer Zweifel, Verlangen nach Symmetrie, und sexuelle und aggressive Obsessionen. Gut bekannte Zwänge sind: das Putzen, Zählen, Symmetrie und Sammeln. Die Symptome von OCD sind vielfältig und wechselhaft bei den Betroffenen (van Grootheest, Cath et al. 2005). Außerdem gibt es eine Reihe an Störungen oder Erkrankungen, die mit OCD vergesellschaftet sind, wie das Tourette-Syndrom, Trichotillomanie, Skin Picking Disorder (Dermatillomanie) oder chronische Tic-Störungen. Zu den genetischen Faktoren, die zu der Entstehung der Zwangserkrankungen beitragen, ist noch vieles unklar.

1.1.1. PATHOMECHANISMUS VON ZWANGSSTÖRUNGEN

Die meisten Untersuchungen und Studien mit funktionellem und strukturellem Neuroimaging haben Veränderungen -unter anderem- im präfrontalen Cortex, im amygdalo-korticalen-Regelkreis, und im anterior cingulären Cortex und Thalamus, zwischen Patienten mit OCD und gesunden Individuen gezeigt. Es besteht eine starke Verbindung zwischen Zwangsstörungen/OCD und einer Hyperaktivität des orbitofrontalen Cortex (OFC), Teil des präfrontalen Cortex (Huey, Zahn et al. 2008). Der OFC spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen Lern- und emotionalen Prozessen sowie in der Integration dieser Prozesse im Sozialverhalten der Individuen. Die Amygdala, als Teil des limbischen Systems, ist ein integratives Zentrum für Emotionen und emotionales Verhalten, sie spielt eine wichtige Rolle in deren Verarbeitung. Der mutmaßliche Einfluss der Amygdala in der Entwicklung von Zwangsstörungen wird intensiv diskutiert, benötigt aber weitergehende Forschung (Milad and Rauch 2012). Durch eine Vielzahl an Experimenten, wie die klassische Angstkonditionierung, konnte eindeutig gezeigt werden, wie negative Stimuli die Aktivierung der Amygdala in gesunden Individuen verursachen. Sie reagiert auf eine Vielfalt von emotionalen Reizen und übt eine regulatorische Rolle in der Entstehung von Angst und Sorge aus (Janak and Tye 2015). Interessanterweise ist die Reaktion der Amygdala bei OCD Individuen teilweise ambivalent, auf der einen Seite ist die Reaktion auf OCD-spezifische Reize gesteigert, und auf der anderen Seite wirken nicht spezifische emotionale Reize, wie die Gesichtswahrnehmung, mit einer reduzierten Reaktion. Trotz Hinweise des Zusammenhangs zwischen genetischen Einflüssen und Zwangsstörung sowie Umweltfaktoren in Familien- und Zwillingsstudien, konnte bis jetzt kein spezielles Gen oder Risikogen nachgewiesen werden (Browne, Gair et al. 2014).

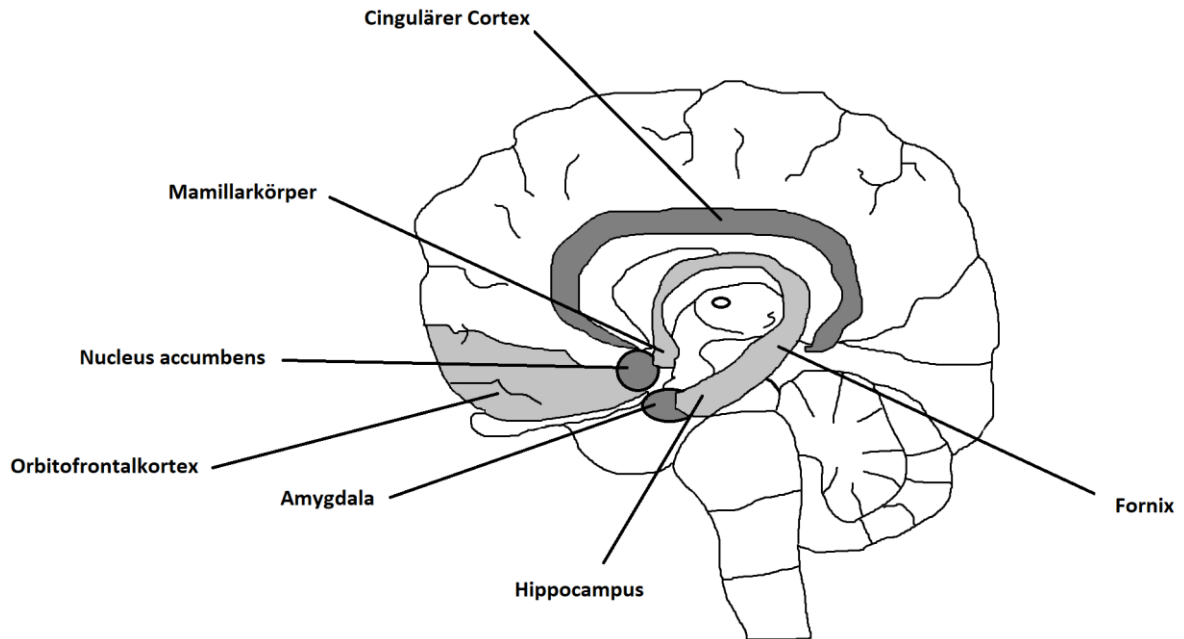


ABBILDUNG 1: DAS LIMBISCHE SYSTEM; DARSTELLUNG DES GEHIRNS IN SAGITTALER PROJEKTION MIT DEN HIRNAREALE BETEILIGT AN DER ENTSTEHUNG UND VERARBEITUNG VON EMOTIONEN. BASIERT AUF (TREPPEL M., AUFLAGE 2017).

Es bestehen aktuell verschiedene Ansätze in der Therapie von OCD, die je nach Schweregrad der Erkrankung angewendet werden: Psychotherapie, pharmakologische Therapie sowie die Neurostimulation. Als Mittel der ersten Wahl in der pharmakologischen Therapie bei Zwangsstörungen kommen die Serotonin-Wiederaufnahmehemmer oder SSRIs zum Einsatz. Es wird aus diesem Grund, im Rahmen der Forschung von Zwangsstörungen, die Entschlüsselung der Funktion des Serotonin-Transporters und anderen synaptischen Transportern als wichtiges Forschungsziel gesehen (Taylor 2013).

In einer Metaanalyse zum Thema Zwangsstörungen wurde, unter anderen, die Implikation von BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) Wachstumsfaktor als möglicher genetischer Faktor demonstriert (Taylor 2013). BDNF ist Teil eines zerebralen Signalweges, welcher fundamental für die neuronale Gentranskription, Neurogenese und neuronale Differenzierung ist (Huang and Reichardt 2001, Huang and Reichardt 2003). BDNF ist außerdem verantwortlich für die Regulation der synaptischen Stärke, Transmission und Plastizität, und aus diesem Grund stark in der Entstehung von verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen involviert, wie z.B.

Depression, bipolare Störungen und angstassoziierte Erkrankungen (Zuccato and Cattaneo 2009, Autry and Monteggia 2012).

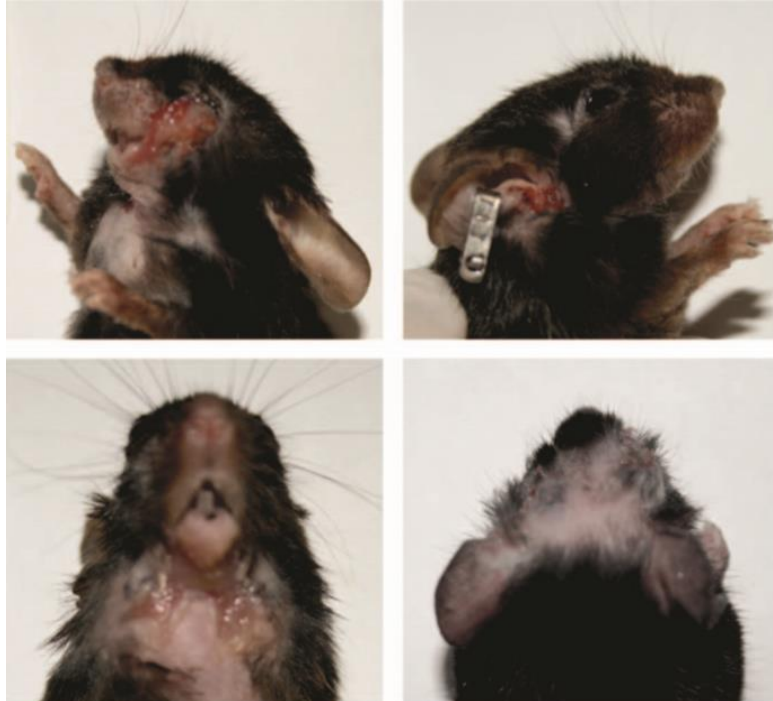


ABBILDUNG 2: HAUTVERLETZUNGEN DURCH ZWANGHAFTE SELBSTPFLEGE VON SPRED2 KO-MÄUSEN. ABBILDUNG AUS (M. ULLRICH, H. GUERRERO GONZALEZ, ET. AL. 2017).

BDNF ist der häufigste Wachstumsfaktor im zentralen Nervensystem und der bevorzugte Ligand für TrkB, einem transmembranösen Tyrosinkinase-Rezeptor, der nach Aktivierung den Ras/ERK-MAPK Signalweg bevorzugt aktiviert (Guiton, Gunn-Moore et al. 1994, Huang and Reichardt 2001, Huang and Reichardt 2003). Die Aktivierung von Ras wird nach Phosphorylierung des Tyrosinkinase-Rezeptors über verschiedene Adaptermoleküle verursacht und durch weitere sequenzielle Phosphorylierung und Aktivierung von verschiedenen Kinasen wie Raf, MEK1/2 und ERK wird das Signal intrazellulär weitergeleitet. Die Aktivierung von ERK verursacht wiederum die Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und anderen regulatorischen Proteinen in der Zelle (Zhang and Liu 2002).

1.1.2. DIE ROLLE VON SPRED-PROTEINEN BEI OCD

Als wichtige Regulatoren des Ras/ERK-MAPK Signalwegs spielen SPRED-Proteine (Sprouty-related protein with EVH1 domain) eine essenzielle Rolle in der neuronalen Entwicklung, da sie in der Neurogenese als Steuerung der ERK-abhängigen neuronalen Stammzell-Proliferation und für die Aufrechterhaltung der Keimzone im Zentralnervensystem fungieren (Phoenix and Temple 2010). Es konnte nachgewiesen werden, dass der Funktionsverlust von SPRED2 in KO-Mäusen, eine Hyperaktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse verursacht, was eine erhöhte Freisetzung von Corticoliberin, Adrenocorticotropin und Corticosteron bewirkt (Ullrich, Bundschu et al. 2011). Die SPRED-Proteine gehören zu einer neuen Familie von Membran-assoziierten Regulatoren der Zelle und üben eine inhibierende Wirkung auf viele mitogene Signale aus, wie z.B. auf verschiedene Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine und auch den Ras/ERK/MAPK-Signalweg (Wakioka, Sasaki et al. 2001). Die Entdeckung dieser Proteine gelangte im Rahmen der Forschung nach interagierenden Proteinen mit den intrazellulären katalytischen c-Kit- und c-Fms-Domäne des Tyrosinkinase-Rezeptors. Sie wurden initial in *Drosophila* nachgewiesen, als Antagonist des Fibroblastenwachstumsfaktor-Signalweges, der die Nachbildung der Verzweigung in den Atemwegen dieser Lebewesen reguliert (Hacohen, Kramer et al. 1998).

Nach intensiven Verhaltensuntersuchungen von SPRED2 KO-Mäusen, konnten in den Tieren Symptome ähnlich einer Zwangsstörung oder OCD beobachtet werden. Die Mäuse zeigten eine extreme Selbstpflege, als Hinweis für eine Zwangsstörung in Nagetieren, die bei den Mäusen zu gravierenden Hautverletzungen führte (Ullrich, Weber et al. 2018). Zur weiteren Differenzierung wurden verschiedene elektrophysiologische Untersuchungen der kortico-striatalen und thalamo-amygdalen Synapsen ergänzt. In den Ergebnissen konnte man signifikante Unterschiede in der synaptischen Erregbarkeit, besonders bei einer erhöhten synaptischen Übertragung der cortico-striatalen Synapsen, erkennen. Diese Dysregulation war durch Veränderungen in der neuronalen Morphologie der lateralen Amygdala vergesellschaftet (Ullrich, Weber et al. 2018). Aus diesem Grund wurde das Ziel dieser Arbeit, die Ursache der Thalamo-Amygdala Dysfunktion in SPRED2 KO-

Mäusen besser zu erforschen. Untersuchungen zu der SPRED-Expression und die Quantifizierungen von verschiedenen prä- und postsynaptischen Proteinen bei SPRED2 KO- und WT-Mäusen, spezifisch von der Amygdala-Region, wurden durchgeführt. All das, um die molekulare Basis in der Dysregulation des Thalamo-Amygdala Kreislaufs besser zu verstehen. Die untersuchten Proteine befinden sich teilweise in der präsynaptischen sowie der postsynaptischen Membran: PSD95, Glutamat Rezeptor-2 und -5, ERC1, Bassoon, Rab3A, Rab6, α -Tubulin und β -Tubulin. Für jedes Experiment wurden gleicherweise KO- und WT-Mäuse als Kontrolle verwendet. Die KO- und WT- Mäusegruppen beinhalten eine vergleichbare Menge an Weibchen wie Männchen und ein Alter zwischen 10 und 20 Monaten.

1.3. BDNF/TRKB-SIGNALLING

Der Wachstumsfaktor BDNF ist, wie bereits erwähnt, ein wichtiger neurotropher Faktor, der wesentlich für das Überleben, die Differenzierung und das Wachstum von peripheren und zentralen Neuronen während der Entwicklung sowie im Erwachsenenalter ist. Außerdem spielt er eine zentrale Rolle in der Plastizität von Synapsen, die wiederum wichtig für die Langzeit-Potenzierung und für das Gedächtnis ist (Huang and Reichardt 2001, Huang and Reichardt 2003). Das BDNF-Gen kodiert für ein präkursor Protein (proBDNF), das später in das 27 kDa große reife BDNF-Protein umgebaut wird. In dieser Form kann der Wachstumsfaktor dann an den TRKB-Rezeptor binden, eine transmembranäre Rezeptor-Tyrosinkinase, mit der Fähigkeit verschiedene Tyrosinreste zu phosphorylieren und die Zielproteine zu aktivieren (Zhang, Yao et al. 2016). Durch diese Aktivierung wird die Transkription von verschiedenen neuronalen Genen sowie die Neurogenese und neuronale Differenzierung reguliert. BDNF hat außerdem eine regulatorische Wirkung in der synaptischen Übertragung und in der Membran-Erregbarkeit, die durch Aktivierung von Signalwegen sowohl auf prä- wie auf postsynaptischer Ebene verursacht wird. Auf präsynaptischer Ebene verursacht BDNF, durch den TrkB-ERK Signalweg, eine vermehrte Freigabe der Neurotransmitter von Glutamat und GABA. Durch die erhöhte Freisetzung von Glutamat in den glutamatergen Synapsen, wird eine Übererregung dieser verursacht. Auf postsynaptischer Ebene kann BDNF, durch Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit von NMDA Glutamat-Rezeptoren,

ebenfalls die synaptische Erregbarkeit steigern (Pradhan, Noakes et al. 2019). Es ist aus diesem Grund klar, dass Veränderungen auf dieser Ebene, in der Pathogenese von einer Reihe an psychiatrischen Erkrankungen mitverantwortlich sein können.

Die Entwicklung von OCD und anderen psychiatrischen Störungen werden, wie bereits erwähnt, durch genetische wie auch durch Umweltfaktoren beeinflusst. Ein wichtiger und stabiler epigenetischer Mechanismus ist die DNA-Methylierung, dieser wurde bereits in verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen gut erforscht (Nestler, Pena et al. 2016). Das menschliche BDNF Gen ist in dem 11p13-14 Chromosom lokalisiert und besteht aus 11 Exons und 9 Promotoren (Pruunsild, Kazantseva et al. 2007). Veränderungen in der DNA-Methylierung (durch DNA-Methyltransferasen) in dem im Exon I und IV lokalisierten Promotor, wurden bereits in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Patienten mit verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen nachgewiesen; wie zum Beispiel Depression, bipolare Störung und Schizophrenie (Roth, Lubin et al. 2009, Kordi-Tamandani, Sahranavard et al. 2012, Ikegame, Bundo et al. 2013).

1.4. SPRED-PROTEINE

SPRED-Proteine beinhalten charakteristischerweise am N-Terminus eine EVH1 Domäne, eine zentrale c-Kit Bindungsdomäne (KBD) und eine cysteinreiche Sprouty-verwandte Domäne, ähnlich zu den Sprouty Proteinen (Wakioka, Sasaki et al. 2001, Kato, Nonami et al. 2003). Sie gehören zu einer Familie mit bis jetzt 3 bekannten Homologen, SPRED1, -2 und -3. Die Expression dieser Proteine, vor allem SPRED2, ist ubiquitär im Menschen sowie in der Maus vorhanden, mit höheren Konzentrationen in dem zentralen Nervensystem. Die regulatorische Rolle der SPRED-Proteine wurde in dem KO-Maus Modell bei der Knochen-Morphogenese, Hämatopoese, eosinophile-Immunantwort und Neurogenese identifiziert (Nobuhisa, Kato et al. 2004, Bundschu, Knobloch et al. 2005, Inoue, Kato et al. 2005). Sie inhibieren außerdem die Zell-Motilität und Metastasierung, sind potenzielle Tumormarker und Suppressoren der Karzinogenese (Miyoshi, Wakioka et al. 2004, Yoshida, Hisamoto et al. 2006). Des Weiteren sind SPRED-Proteine vermutlich an dem zytoplasmatischen Vesikel-Transport sowie an der Koordination von

Gastrulation und mesodermaler Spezifizierung beteiligt (Engelhardt, Bundschu et al. 2004, Sivak, Petersen et al. 2005).

1.4.1. SPRED-PROTEINE: GENOM- UND PROTEINSTRUKTUR

Alle Familienmitglieder der SPRED-Proteine beinhalten, wie bereits erwähnt, am N-Terminus eine EVH1-Domäne, ein evolutionär konserviertes Proteininteraktionsmodul, welches z.B. homolog zur EVH1-Domäne des Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) ist. Zudem enthalten sie eine zentrale c-Kit-Bindungsdomäne (KBD) und am C-Terminus eine cysteinreiche Domäne, welche sehr stark dem C-Terminus der Sprouty-Proteine ähnelt (SPR) (s. Abbildung 3) (Wakioka, Sasaki et al. 2001, Kato, Nonami et al. 2003). SPRED1 und SPRED2 besitzen die KBD-Bindungsdomäne des onkogenen c-Kit Tyrosinkinase-Rezeptors. Bei Eve-3 hingegen, einer Splice-Variante von SPRED3, fehlt eine funktionsfähige KBD (King, Corcoran et al. 2006).

Die drei Gene der SPRED-Proteine sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert, sowohl beim Menschen als auch bei der Maus. SPRED1 befindet sich beim Menschen auf Chromosom 15q13.2 bzw. auf 2E5 bei der Maus, SPRED2 auf 2p14 bzw. 11A3-A4, SPRED3 auf 19q13.13 bzw. 7A3 (Kato, Nonami et al. 2003). Das SPRED2 Gen in der Maus beinhaltet 6 Exons, Exon 1-3 codieren für die EVH1-Domäne, Exons 4 und 5 für die Region zwischen EVH1-Domäne und KBD, und Exon 6 codiert für die KBD und die SPR-Domäne. Das SPRED1 Maus-Gen ist sehr ähnlich, besteht aber aus 7 Exons, wobei das zusätzliche Exon für einen Teil der EVH1/KBD-Interregion codiert (Bundschu, Knobloch et al. 2005).

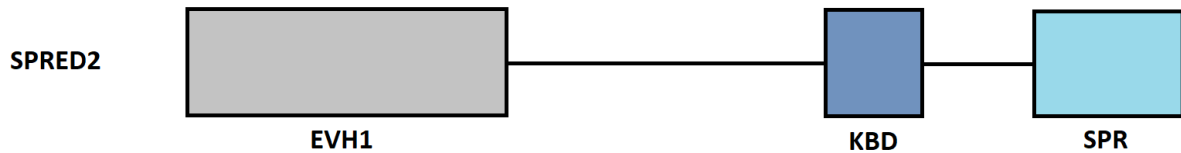


ABBILDUNG 3: DOMÄNENSTRUKTUR DER SPRED2-PROTEINE. EVH1: ENABLED/VASODILATOR-STIMULATED PHOSPHOPROTEIN (VASP) HOMOLOGIE 1 DOMAIN; KBD:C-KIT BINDENDE DOMÄNE; SPR: SPROUTY DOMÄNE. BASIERT AUF (ULLRICH, M., 2014).

1.4.2. EXPRESSION, MUSTER UND LOKALISATION VON SPRED-PROTEINEN

Die Erforschung des Expressionsprofils des SPRED2 Promotors in neugeborenen und erwachsenen Mäusen wurde mit Hilfe von SPRED2 KO-Mäusen erzielt, die mittels Gene-Trapping erzeugt wurden (Bundschu, Gattenlohner et al. 2006). Die höchste Aktivität wurde in dem Gehirn nachgewiesen, besonders in dem frontoparietalen Cortex und Ammonshorn (Teil des limbischen Systems). Im Kleinhirn, Rückenmark, Nerven und verschiedenen Drüsen, wie der Prostata, den Speicheldrüsen, den mukösen Epitheldrüsen im Kolon und Magen, wurde ebenfalls eine hohe Expressionsaktivität gefunden. Außerdem wurde eine hohe SPRED2 Promotor-Aktivität in den Zellen der glatten Muskulatur in Darm und Gebärmutter sowie in den Nieren gezeigt. Eine schwache Aktivität wurde im Herz, Hoden, Lunge und Leber nachgewiesen. Eine sehr geringere Aktivität wurde in der Skelettmuskulatur und Milz festgestellt (Bundschu, Walter et al. 2007).

1.4.3. SPRED FUNKTION

SPRED-Proteine können, unter anderem, die Aktivierung von MAP-Kinasen inhibieren, in dem sie die Phosphorylierung und Aktivierung von Raf verhindern. SPRED1 und SPRED2 sind fähig mitogene Signalisierung zu inhibieren, die durch verschiedene Wachstumsfaktoren, Cytokine und Chemokine induziert ist. SPRED-Proteine sind aber nur auf einem einzigen MAP-Kinase Signalweg fokussiert (Bundschu, Walter et al. 2007). Es existieren vier miteinander verwandte Kinase-Signalwege: die zwei durch extrazelluläre Signale regulierte Kinasen (ERK1/-2), c-Jun NH(2)-terminale Kinasen (JNKs) und p38 MAPKs (Nonami, Kato et al. 2004,

King, Straffon et al. 2005). Die inhibierende Wirkung von SPRED beschränkt sich aber nur auf den Ras-ERK Signalweg und hat keinen Einfluss auf das Rac-abhängige Membran-Ruffling (Wakioka, Sasaki et al. 2001). Aus diesem Grund sind SPRED-Proteine als spezifische ERK Signalweg-Inhibitoren identifiziert worden (Nonami, Kato et al. 2004).

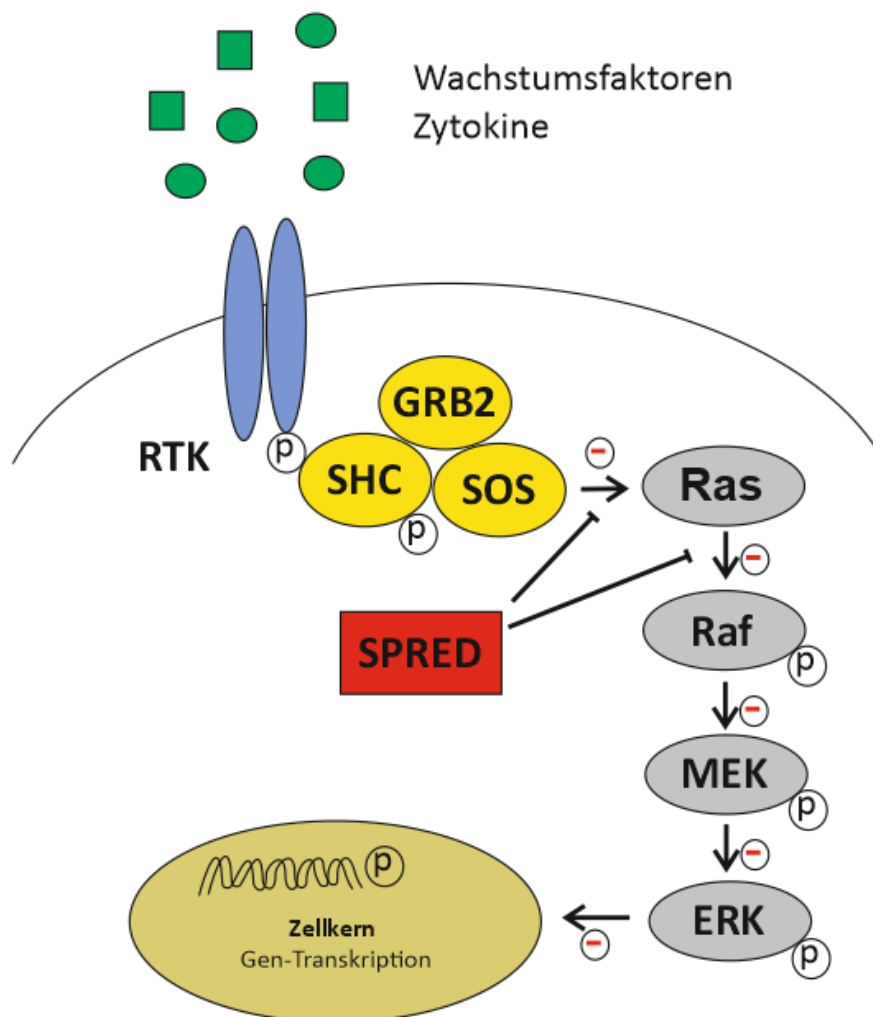


ABBILDUNG 4: SPRED-PROTEINE WIRKEN ALS INHIBITOREN DES RAS/ERK/MAPK SIGNALWEGS AN MEHREREN AKTIVIERUNGSSTELLEN UND REGULIEREN DADURCH DIE TRANSKRIPTION VON VERSCHIEDENEN GENEN. MODIFIZIERT NACH (ULLRICH, M., 2014). ERK: EXTRACELLULAR-SIGNAL REGULATED KINASE; GRB2: GROWTH FACTOR RECEPTOR-BOUND PROTEIN 2; MEK: DUAL SPECIFICITY MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE; P: PYROPHOSPHAT; RAF: RAPIDLY ACCELERATED FIBROSARCOMA; RAS: RAT SARCOMA; RTK; REZEPTOR TYROSIN KINASEN; SHC: SRC HOMOLOGY 2 DOMAIN CONTAINING; SOS: SON OF SEVENLESS.

1.5. DER MAPK SIGNALWEG

Die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kaskaden sind Signalwege, die auf verschiedene extrazelluläre Signale reagieren und Botschaften in das Innere der Zelle übermitteln. Die extrazellulären Signale werden mittels sequenzieller Phosphorylierung und Aktivierung von einer Reihe regulatorischer Zielproteine im Zytoplasma und Zellkern weitergeleitet. Aus diesem Grund spielen sie eine wichtige Rolle in einer großen Zahl von fundamentalen zellulären Prozessen, wie Proliferation, Differenzierung, Wachstum, Motilität, Stressreaktion, Überleben und Apoptose (Raman, Chen et al. 2007, Plotnikov, Zehorai et al. 2011). Bis jetzt wurden, wie bereits erwähnt, vier verschiedene MAPK Kaskaden in Säugetieren identifiziert: extracellular signal-regulated kinase 1 und 2 (ERK1/2), c-Jun N-terminal Kinase (JNK), p38 und ERK5.

1.5.1. DER RAS/ERK/MAPK SIGNALWEG

Im Gegensatz zu anderen MAPK-Signalwegen, beschränkt sich die Funktion des ERK1/2 Signalweges hauptsächlich auf die Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Segar and Krebs 1995). Er wird bevorzugt durch Mitogene und Wachstumsfaktoren aktiviert, wie zum Beispiel: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), nerve growth factor (NGF) und verschiedene Zytokine wie stem cell factor (SCF), Interleukine (IL-3, IL5) und tumor necrosis factor α (TNF α). Diese Liganden binden an Monomere des Tyrosinkinase Rezeptors und verursachen eine Dimerisierung durch Monomer-Vernetzung und dadurch die Aktivierung des Tyrosinkinase Rezeptors. Die Rezeptormonomere beinhalten einen extrazellulären N-Terminus, eine einzige transmembranöse Domäne und eine intrazelluläre C-terminale Region (Ullrich and Schlessinger 1990). Der extrazelluläre N-Terminus beinhaltet die Bindungsstelle für die Liganden, welche die Aktivierung des Tyrosinkinase Rezeptors verursachen und durch Konformationsänderung des Rezeptors die Aktivierung über die Zellmembran zu der intrazellulären Domäne weitergeben. Die intrazelluläre C-

Terminale Region beinhaltet die katalytische Domäne, zuständig für die Kinaseaktivität und Autophosphorylierung der Rezeptor-Monomere und die Interaktion mit verschiedenen Adapterproteinen (Ullrich and Schlessinger 1990). Mit Hilfe der Sarcoma homology 2 Domäne (SH2), kann das Adapterprotein growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) an die Phosphotyrosin-Bindungsdomäne von aktivierten Rezeptoren binden (Lowenstein, Daly et al. 1992). Das GRB2 interagiert nicht nur mit den aktivierten Tyrosinkinase Rezeptoren, sondern auch mit verschiedenen intermediären Adapterproteinen wie SHC (Src homology and collagen protein) (Skolnik, Lee et al. 1993), FRS2 (fibroblast growth factor receptor substrate 2) (Kouhara, Hadari et al. 1997), IRS-1/2 (insulin receptor substrate 1/2) (Skolnik, Lee et al. 1993), GAB1 (GRB2-associated binding protein 1) (Holgado-Madruga, Emler et al. 1996) und SHP2 (Src homology 2 domain containing protein-tyrosine phosphatase 2 und auch PTPN11=Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11) (Hadari, Kouhara et al. 1998). Über die Src homology 3 (SH3) Domäne kann GRB2 mit der Prolin-reichen Interaktionsstelle von SOS (son of sevenless) agieren (Chardin, Camonis et al. 1993). Wenn der GRB2-SOS Komplex an den Tyrosin-phosphorylierten Tyrosinkinase Rezeptor bindet, wird SOS aktiviert, um dann mit Ras zu interagieren und dies zu aktivieren (Egan, Giddings et al. 1993). Ras (Rat sarcoma) ist ein Proto-Onkogen, das aus einer Familie von kleinen monomeren GTP-bindenden Proteinen besteht, von welchen H-Ras, N-Ras und K-Ras die häufigsten sind (Malumbres and Barbacid 2003). Ras besteht aus einer N-Terminalen GTPase-Domäne, welche Guanosin Nukleotide bindet, und einer C-Terminalen CAAX-Protease Bindungsstelle, essenziell für die Prenylation der Proteine und dadurch Verankerung in der Zellmembran (Willumsen, Christensen et al. 1984, Temeles, Gibbs et al. 1985, Hancock, Magee et al. 1989).

SOS ist ein Ras-GEF (guanine nucleotide exchange factor) und aktiviert Ras, in dem es den Austausch von GDP zu GTP katalysiert (Chardin, Camonis et al. 1993). Der aktivierte GRB2-SOS Komplex bindet exklusiv das inaktivierte Ras-GDP Paar, destabilisiert dessen Verbindung und fördert dadurch die Trennung von GDP von Ras. Auf Grund des erhöhten Gehalts von GTP im Zytoplasma, verglichen mit GDP (10:1), interagiert GTP mit den GTPasen, was die Freisetzung des GRB2-SOS Komplexes und die Aktivierung von Ras in der Zellmembran verursacht (Bos,

Rehmann et al. 2007). Ras aktiviert dann Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma), eine MAP kinase kinase kinase in dem ERK Signalweg, die zu den Serin/Threonin-Proteinkinasen gehört. Drei Mitglieder in der Raf Familie sind bis jetzt bekannt, A-Raf, B-Raf und C-Raf/Raf-1. Wie in dem Fall von Ras, sind Raf Proteinkinasen als Protoonkogene eingestuft worden, wohingegen B-Raf als potentes Onkogen identifiziert wurde und eine hohe Mutationsrate bei Krebserkrankung in Menschen zeigt (Davies, Bignell et al. 2002, Wellbrock, Karasarides et al. 2004). Aktiviertes Ras bindet direkt in der regulatorischen Domäne von Raf und rekrutiert auf diese Weise die Kinasen an die Plasmamembran, was essenziell für dessen Aktivierung ist (Leevers, Paterson et al. 1994, Stokoe, Macdonald et al. 1994). Die Phosphorylierung und Aktivierung von Raf ist Ras-unabhängig und durch die Familie von Src Thyrosin-Proteinkinasen und andere Serin/Threonin-Proteinkinasen vermittelt (Marais, Light et al. 1995, King, Wireman et al. 2001). Aktivierte Raf-Kinase katalysiert die Aktivierung von den MAPKKs, MEK1 und MEK2, in dem sie zwei Serin-Seitenketten phosphoryliert (Kyriakis, App et al. 1992, Macdonald, Crews et al. 1993). MEK1/2 sind klassische dual-spezifische Kinasen, die sowohl als Tyrosin-Kinasen, als auch als Serin/Threonin-Kinasen fungieren können. Diese Kinasen sind spezifisch was die Bindungspartner in den Signaltransduktionswegen angeht, die MAPKs, ERK1 und ERK2 (Crews, Alessandrini et al. 1992). ERK1/2 werden nach sequenzieller Phosphorylierung an deren regulatorischen Tyrosin und Threonin Seitenketten in der Thr-Glu-Tyr Domäne aktiviert (Haystead, Dent et al. 1992). Im weiteren Verlauf kann ERK, wie auch Ras, mehr als 200 verschiedene und hauptsächlich im Zellkern aber auch im Zytoplasma und Zellorganen lokalisierte Substrate phosphorylieren (Yoon and Seger 2006, Yao and Seger 2009). Unter anderen sind Transkriptionsfaktoren und andere Transkriptionsregulatoren die Hauptziele von ERK1/2. Diese können direkt durch ERK reguliert werden, oder durch ERK-regulierte MAPKAPKs, wie die ribosomale S6 Kinasen (RSKs), MAPK interagierende Kinasen (MNKs) und die Mitogen- und Stressaktivierende Kinasen (MSKs) (Ullrich, M. 2014). Damit ERK verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und aktivieren kann, muss dessen Translokation in den Zellkern erfolgen. ERK reguliert aus dieser Position, unter anderen, die Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos, die Teil des heterodimeren Transkriptionsfaktor AP-1 (activator Protein 1) sind und in dieser Weise für wichtige Zellprozesse wie Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose regulatorisch mitverantwortlich sind.

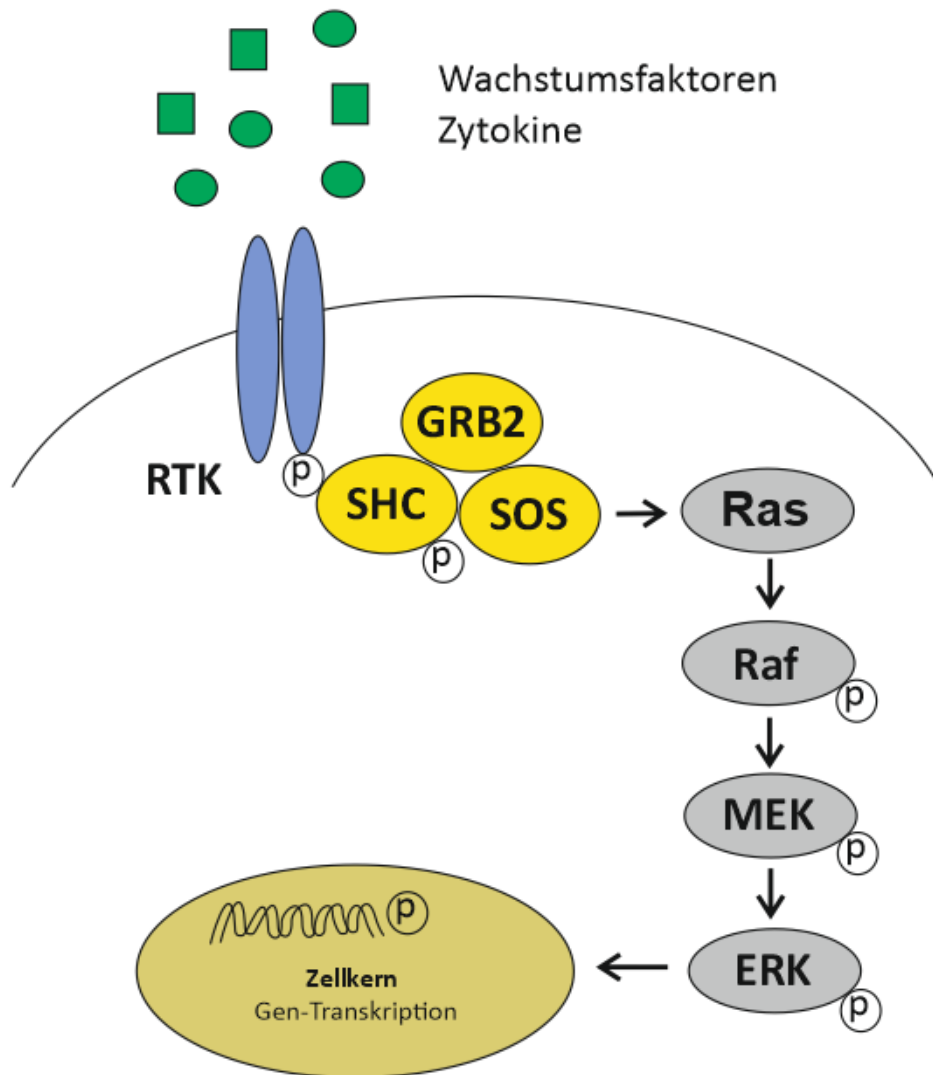


ABBILDUNG 5: DER RAS/ERK/MAPK SIGNALWEG. DIE STIMULATION DES RTK DURCH WACHSTUMSFAKTOREN ODER ZYTOKINE, VERURSACHT EINE AKTIVIERUNG VON MAPKS, ERK1 UND ERK2. ERK PHOSPHORYLIERT ALS NÄCHSTES VERSCHIEDENE ZIELPROTEINE IM ZELLKERN SOWIE IM ZYTOPLASMA, DIE DIE TRANSKRIPTION VON VERSCHIEDENEN GENEN REGULIEREN. MODIFIZIERT NACH (ULLRICH, M., 2014). ERK: EXTRACELLULAR-SIGNAL REGULATED KINASE; GRB2: GROWTH FACTOR RECEPTOR-BOUND PROTEIN 2; MEK: DUAL SPECIFICITY MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE; P: PYROPHOSPHAT; RAF: RAPIDLY ACCELERATED FIBROSARCOMA; RAS: RAT SARCOMA; RTK; REZEPTOR TYROSIN KINASEN; SHC: SRC HOMOLOGY 2 DOMAIN CONTAINING; SOS: SON OF SEVENLESS.

1.6. DIE SYNAPSE

Das Nervensystem besteht aus Nervenzellen (Neuronen) und Gliazellen. Diese bilden die funktionelle Grundeinheit des Nervensystems. Ein Neuron besteht aus einem Zellkörper, der den Zellkern enthält, und aus einem oder mehreren Fortsätzen. Diese werden wiederum in Axonen und Dendriten unterteilt. Die Dendriten dienen dem Erregungsempfang, sind meist reicher verzweigt als das Axon und in enger Nachbarschaft zu dem Zellkörper. Die Axone oder auch Neuriten genannt, sind für die Erregungsweiterleitung des Neurons zuständig, über diesen Ausläufer werden Nervenimpulse vom Zellkörper weggeleitet. Das Axon, gemeinsam mit seiner Gliahülle, wird als Nervenfasern bezeichnet. Diese können von unterschiedlichen Dicken und Länge sein. Die Geschwindigkeit, mit der eine Nervenfasern elektrische Erregung weiterleitet, steigt proportional zu ihrem Kaliber. Dicke Axone, die den Impuls rasch leiten, sind stets von einer Myelinscheide umhüllt. Präterminal verzweigt sich das Axon in mehrere kleine Äste, die letztlich in synaptische Endkolben oder „Boutons“ enden. Der Endknopf tritt in Kontakt mit einem anderen Neuron oder einem Effektor (z.B. Muskelfasern) und bildet mit diesem eine Synapse, an der ein Nervenimpuls weitergeleitet wird (Trepel M., Auflage 2017, Lüllmann-Rauch R. Auflage 2006).

Die Synapse ist der Ort, wo die Erregungsübertragung von einem Neuron zum nächsten stattfindet. Die Übertragung geschieht, indem eine ankommende Erregung zum Einstrom von Kalziumionen an der präsynaptischen (vor dem synaptischen Spalt liegend) Zellmembran führt. Der Anstieg in der Kalziumkonzentration verursacht die Verschmelzung von in dem Endkolben befindlichen synaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Membran aus. Dadurch wird die in den Vesikeln gespeicherte Substanz in den synaptischen Spalt freigegeben, diese wird dann als Transmitter bezeichnet. Es gibt eine Vielzahl an Transmittern, die in mehrere Substanzklassen eingeteilt werden können und die an nachfolgenden Nerven-, Muskel- oder Drüsenzellen (Effektor) wirken. Durch Bindung an definierte Rezeptoren der Erfolgszelle, können Transmitter die postsynaptische Membran elektrisch verändern und können in dieser Weise das Signal von Zelle zu Zelle weiterleiten. Ein Transmitter kann je nach Beschaffenheit des Rezeptors nicht nur erregend, sondern auch hemmend auf die Erfolgszelle wirken (Trepel M., Auflage 2017, Lüllmann-Rauch R. Auflage 2006).

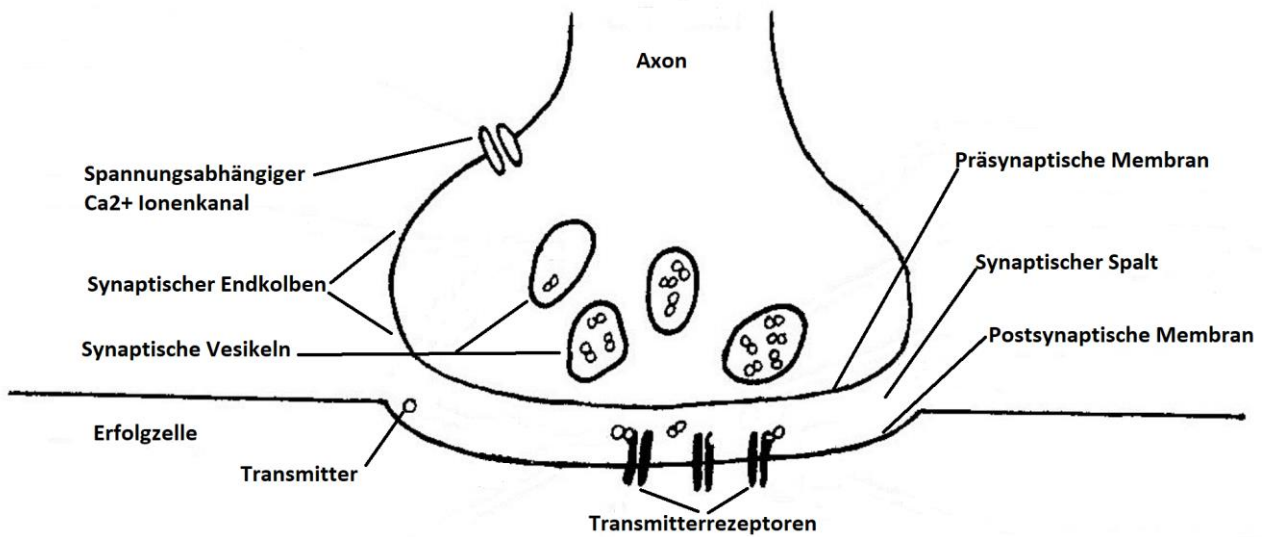


ABBILDUNG 6: SKIZZE EINER SYNAPSE MIT DARSTELLUNG EINES SYNAPTISCHEN ENDKOLBENS. AUF DER EINEN SEITE DIE PRÄSYNAPTISCHE MEMBRAN EINES AXONS UND GEGENÜBER DIE POSTSYNAPTISCHE MEMBRAN MIT DEN VERSCHIEDENEN TRANSMITTERREZEPTOREN. MODIFIZIERT NACH „AUFBAU UND FUNKTION DER CHEMISCHEN SYNAPSE“, SERLO.ORG¹.

1.7. SYNAPTISCHE PROTEINE

1.7.1. PRÄSYNAPTISCHE PROTEINE

- **Bassoon** ist ein Gerüstprotein, Teil der präsynaptischen Cytomatrix in der Aktiven Zone, hier findet die Neurotransmitter-Freisetzung statt. Es ist ein Multidomänenprotein, das spezifisch und exklusiv in der Aktiven Zone des Nervensystems von Säugetieren vorkommt. Bassoon und sein strukturell verwandter Piccolo, bilden die Grundstruktur dieser Zone und erlauben hier die Wechselwirkung mit diversen anderen Proteinen in der Synapse. Es reguliert die räumliche Organisation der synaptischen Vesikelcluster sowie die Proteinkomplexe, die die Membranfusion und Endozytose ermöglichen (Dondzillo, Satzler et al. 2010).

- **Rab3A** ist ein Mitglied der RAS-Proteinfamilie und gehört zu den GTP-Bindungsproteinen. Außerdem spielt es eine zentrale Rolle in der Regulierung von Exozytose und Protein-Sekretion in der Synapse. Nach entsprechender Stimulation wird Rab3A in die aktive GTP-gebundene Form umgewandelt und rekrutiert so weitere synaptischen Proteine, um die Bindung und das Andocken von sekretorischen Vesikeln in der Zellmembran zu ermöglichen. Nach GTPase-abhängiger Hydrolyse von GTP, löst sich der Komplex von der Vesikelmembran und erlaubt dadurch die Exozytose (Bello, Zanetti et al. 2012).
- **Rab6** gehört ebenfalls zu den GTP-Bindungsproteinen und der RAS-Familie. Es spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Proteintransports von dem Golgi-Apparat zu dem endoplasmatischen Retikulum sowie in der Exozytose entlang der Mikrotubuli (Shetty, Kurada et al. 1998).
- **Metabotroper Glutamat Rezeptor 2** ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der hauptsächlich in der präsynaptischen Membran vorkommt, aber auch in der postsynaptischen Membran vorkommen kann. Der Rezeptor funktioniert als Autorezeptor für den Neurotransmitter Glutamat, der nach Aktivierung die Freisetzung des Vesikelinhalts in der präsynaptischen Membran in glutamatergen Neuronen inhibiert.
- **ERC1 oder ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1** ist ein präsynaptisches Protein, Mitglied der Familie von RIM-bindenden Proteinen und Homolog des Bruchpilot-Proteins von Drosophila. Diese Proteine befinden sich in der aktiven Zone der Synapse und regulieren die Freisetzung von Neurotransmittern durch die Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Kanäle-Dichte. Sie sind außerdem an der synaptischen Übertragung nach Stimulation beteiligt (Nomura, Ohtsuka et al. 2009).
- **ERC2 oder ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2** gehört ebenfalls zu der Familie von RIM-bindenden Proteinen, die sich in der aktiven Zone der präsynaptischen Membran befinden und an der Regulation der

Freisetzung von Neurotransmittern der aktiven Zone beteiligen. ERC2 ist außerdem ein Interaktionspartner von Rab3 (Wang, Liu et al. 2002).

- **α - und β -Tubulin** sind Proteine, die in den Zellen von Eukaryoten vorkommen. Sie sind Bausteine des Cytoskeletts und beteiligt an der Bewegung der Zellen sowie dem Transport und der Verteilung von Organellen und Partikeln in der Zelle. Sie spielen eine besondere Rolle beim Transport von Neurotransmittern in den Neuronen (Löffler G., Auflage 2007).

1.7.2. POSTSYNAPTISCHE PROTEINE

- **PSD95** ist ein synaptisches Protein, welches beinahe exklusiv an der postsynaptischen Membran lokalisiert ist. Es gehört zu der Familie der MAGUK-Proteine, ihre Grundstruktur beinhaltet drei PDZ Domänen, eine SH3 Domäne und eine GK (guanylate kinase-like) Domäne. PSD95 ist an der Verankerung von anderen synaptischen Proteinen an der Membran beteiligt. Einige der direkten oder indirekten Partner des Proteins sind NMDA Rezeptoren, AMPA Rezeptoren und Neuroligin (Hunt, Schenker et al. 1996).
- **Metabotroper Glutamat Rezeptor 5** ist ebenfalls einen G-Proteingekoppelter Rezeptor, der sich in der Peripherie der synaptischen Dichte befindet. Durch die Bindung von Glutamat an den Rezeptor wird eine Konformationsänderung verursacht, die dann die Signaltransduktion über G-Proteine bewirkt. Der Rezeptor spielt eine besondere Rolle in der synaptischen Plastizität und in der Modulation der neuronalen Aktivität (Minakami, Katsuki et al. 1994).

1.8. DIE AMYGDALA

Die Amygdala gehört zu dem zentralen Nervensystem und bildet, zusammen mit dem Gyrus cinguli, dem Gyrus parahippocampalis und dem Hippocampus, das limbische System (Rolls 1992). Trotz ihrer kleinen Größe besteht die Amygdala aus multiplen und heterogenen Gruppen von Kernen, die ein komplexes Netzwerk bilden

und tief im Temporallappen lokalisiert sind. Sie ist an einer großen Vielfalt von Aufgaben beteiligt, wie z.B. Gedächtnis, Aufmerksamkeit, Verarbeitung von emotionaler Bedeutung auf sensorische Reize, Wahrnehmung von Körperbewegung sowie das Generieren von emotionalen Aspekten in Träumen (Davis 1992). Die Amygdala kann in drei Kerngebiete unterteilt werden; ein tiefes, ein oberflächliches und ein zusätzliches Kerngebiet, jeweils mit mehrere Unterkernen (Pitkanen, Savander et al. 1997).

Kerngruppe	Kerne	Unterkerne
Tiefe Kerne	Lateraler Kern (La)	Dorsolaterale Division (Ldl) Ventrolaterale Division (Lvl) Mediale Division (Lm)
	Basaler Kern (B)	Magnozelluläre Division (Bmc) Intermediäre Division (Bi) Parvizelluläre Division (Bpc)
	Akzessorischer basaler Kern (AB)	Magnozelluläre Division (Bmc) Parvizelluläre Division (Bpc)
Oberflächliche Kerne	Kern des lateralen olfaktorischen Traktes (NLOT)	
	Bed nucleus des akzessorischen olfaktorischen Traktres (BAOT)	
	Anteriorer kortikaler Kern (COp)	
	Medialer Kern (M)	Rostrale Division Zentrale Division Dorsaler Teil (Mcd) Ventraler Teil (Mcv) Kaudale Division (Mc)
	Periamygdaloider Kortex	Periamygdaloider Kortex Mediale Division (PACm)

		Sulcale Division (PACs)
	Posteriorer kortikaler Kern (COp)	
Andere amygdaloide Regionen	Anteriore amygdaloide region (AAA)	
	Zentraler Kern (CE)	
	Amygdalohippokampale Region (AHA)	Kapsuläre Division (CDc) Laterale Division (CEl) Intermediäre Division Mediale Division
	Interkalierte Kerne (IC)	

TABELLE 1. AMYGDALA KERNE UND EINTEILUNG, BASIERT AUF (PITKANEN ET AL., 1997).

1.8.1. VERBINDUNGEN

Im Gehirn entscheiden die Verbindungen die Funktion. Jeder Kern in der Amygdala besitzt eigene Verbindungen, um Information zu empfangen oder sie weiterzuleiten. Die laterale Amygdala wird als „Gatekeeper“ dieser Hirnregion gesehen. Diese empfängt eine relativ große Menge an Information aus den Sinnesorganen; visuell, auditorisch, somatosensibel (inklusive Schmerz), olfaktorisch und geschmacklich. All diese Reize werden hauptsächlich in die laterale Amygdala weitergeleitet. Verschiedene Informationen werden außerdem aus diversen Hirnregionen in andere Amygdala Regionen weitergeleitet, um durch die Amygdala verarbeitet zu werden (LeDoux 2007).

Die Verbindungen für akustische Reize in der lateralen Amygdala sind bis jetzt am besten erforscht. Die Information wird aus dem Thalamus und aus dem auditorischen Kortex in die laterale Amygdala transportiert. Kortikale Reize aus dem auditorischen und anderen sensorischen Systemen, haben deren Ursprung eher aus Assoziationsarealen als aus primär sensorischen Arealen. In dieser Weise wird der Amygdala eine vielfältigere Eingabe geboten, als es aus dem Thalamus der Fall wäre. Die Komplexität dieses Netzwerkes verursacht eine Verzögerung in der

Transmission. Die sensiblen Reize in der lateralen Amygdala enden hauptsächlich in dem dorsolateralen Unterkern. Dieser verbindet sich und kommuniziert mit anderen Regionen der Amygdala, wie der medialen Division und der ventrolateralen Division (LeDoux 2007).

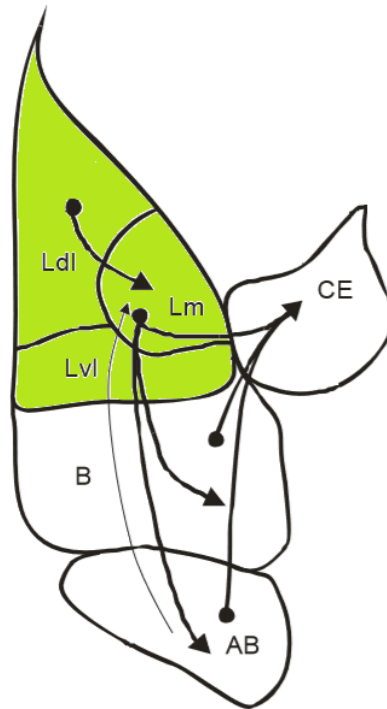


ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER TIEFEN AMYGDALAKERNE UND IHRE INTRAAMYGDALOIDEN VERBINDUNGEN. IN GRÜN MARKIERT IST DER LATERALE KERN MIT SUBDIVISIONEN. AB: AKZESSORISCHER BASALER KERN; B: BASALER KERN; CE: ZENTRALER KERN LDL: DORSOLATERALE DIVISION; LM: MEDIALE DIVISION; LVL: VENTROLATERALE DIVISION. MODIFIZIERT NACH (KASCHEL 2010).

So wie der laterale Kern als „Gatekeeper“ der Amygdala gilt, wird der zentrale Kern als Ausgangsregion gesehen, zumindest für die emotionale und passende physische Antwort auf einen Reiz. Die Antwort auf diese Reize umfasst Verbindungen aus dem medialen Subdivisionen des zentralen Kernes mit dem Hirnstamm, welche spezifische Verhaltensmuster und physiologische Reaktionen steuern. Um das Verhaltensmuster durch sensorische Information beeinflussen zu können, muss die Information Verbindungen in der Amygdala durchlaufen. Es gibt wenige direkte Verbindungen zwischen dem lateralen Kern und dem zentralen Kern, aus diesem Grund findet die Kommunikation zwischen diesen beiden Kernen hauptsächlich durch Verbindungen mit dem medialen Anteil des lateralen Kernes und anderen

Kernen der Amygdala statt, die dann mit dem zentralen Kern kommunizieren (LeDoux 2007).

Eine andere wichtige Ausgangsverbindung der Amygdala findet in dem basalen Kern statt. Zusätzlich zu der Verbindung zu dem zentralen Kern, kommuniziert sie mit striatalen Bereichen, die an der Steuerung von instrumentellen Verhalten beteiligt sind. Während die Ausgangsverbindungen von der zentralen Amygdala mit dem Hirnstamm an der Steuerung von Emotionen beteiligt sind, wie die Erstarrung in der Anwesenheit eines Raubtiers, sind die Verbindung von der basalen Amygdala mit dem Striatum an der Steuerung von Aktionen, wie dem Wegrennen beteiligt (LeDoux 2007).

1.8.2. ZELLULÄRE MECHANISMEN

Die Amygdala übt eine starke inhibierende Wirkung im Gehirn aus und verhindert die Triggerung der Synapsen auf unbedeutende Reize. Die meisten synaptischen Erregungen in der Amygdala umfassen aktivierende Signalwege, die Glutamat als Neurotransmitter benutzen. Diese Erregung bildet synaptische Verbindungen in den Dendriten von aktivierenden Projektionsneuronen, die die Signale zu anderen Kernen und Unterkernen der Amygdala sowie extrinsische Regionen weiterleiten. Projektionsneurone oder Hauptneurone sind Nervenzellen, die Informationen über exzitatorische Neurotransmitter in entfernte Gehirnareale senden. Diese Art von Neuronen können außerdem lokale Verbindungen zu inhibitorischen Interneuronen herstellen, die wiederum eine inhibitorische Rückkopplung zu den Projektionsneuronen ausüben. Diese Art von Verbindungen erlaubt stimulusabhängige Hemmungen zu kumulieren und verursacht damit eine Reduktion in der Reaktion auf weitere Reize.

Diese besonderen Abläufe in den synaptischen Erregungen und Verbindungen gelten vor allem für die Neurone aus dem basolateralen Anteil (basalen und lateralen Kern) der Amygdala. Die Projektionsneurone in dem zentralen Kern zeigen meistens eine inhibitorische Wirkung. Aus diesem Grunde wirkt die synaptische Erregung in

dieser Region mit einer Inhibierung in der Erregungsweiterleitung, während dessen Inhibierung den gegenteiligen Effekt bewirkt.

Der Informationsfluss durch die Amygdala wird durch verschiedene Neurotransmitter gesteuert. In dieser Weise beeinflusst die Freisetzung von Norepinephrin, Dopamin, Serotonin und Acetylcholin die Interaktion von erregenden und hemmenden Synapsen. Die Aktivierung der Amygdala verursacht die Freisetzung dieser Neurotransmitter im Vorderhirn und in der Amygdala selbst. Die Rezeptoren zu den verschiedenen Neurotransmittern sowie für Hormone, wie Östrogen und Glukokortikoide, sind unterschiedlich in den verschiedenen Kernen der Amygdala verteilt. Außerdem ist eine große Zahl an Peptidrezeptoren in der Amygdala vertreten, wie zum Beispiel Opioide, Oxytocin, Vasopressin, Corticotropin-releasing Hormon (CRH) (LeDoux 2007).

1.8.3. Pawlowsche Konditionierung

Die Angst ist die Funktion, die am meisten mit der Amygdala in Assoziation gebracht wird. In verschiedenen Studien zur Pawlowschen oder der klassischen Konditionierung in den letzten Jahren, wurde klar wie wichtig die Rolle der Amygdala bei dieser Form des Lernens ist (LeDoux 2007). Dabei wird Angst gemessen, in dem man quantifiziert, wie gut ein Tier einen negativen Reiz zu vermeiden lernt. In der Pawlowschen Konditionierung wird ein neutraler konditionierter Stimulus (CS) mit einem schmerzhaften unconditionierten Stimulus (US) gekoppelt, um eine Angstreaktion, wie Erstarrung und dazu passende physiologische Veränderungen auszulösen. In Studien im Mausmodell konnten die Afferenzen und Efferenzen in den verschiedenen Kernen der Amygdala, die für die Angstkonditionierung verantwortlich sind, zugeordnet werden (LeDoux 2007). Es ist weitgehend akzeptiert, dass die Konvergenz der CS und US zu einer synaptischen Plastizität in der lateralen Amygdala führt. Wenn dann der CS einzeln gegeben wird, fließt der Stimulus über potenzierende Synapsen zu anderen Zielen in der Amygdala und letzten Endes in den medialen Anteil des zentralen Kerns, wovon Efferenzen beginnen, die die Angstkonditionierung regulieren. Zellen der dorsolateralen Division in der lateralen Amygdala besitzen die besonderen Voraussetzungen, die für die

Angstkonditionierung wichtig sind. Diese Zellen nehmen CS Reize aus dem auditorischen Thalamus und Cortex sowie des US auf. Nach der Kopplung von CS und US verbessert sich dramatisch die zelluläre Antwort auf den CS, in dem mehr Aktionspotentiale ausgelöst werden. Die Zellen in dem superioren Anteil der dorsolateralen Division zeigen als erstes und zügig eine synaptische Plastizität. Nach einigen Wiederholungen des Stimulus, setzen die Zellen ihre Einstellung auf das Startniveau zurück. Parallel dazu behalten aber die Zellen in der inferioren dorsolateralen Division ihre Plastizität für längere Zeit bei. Selbst wenn das Tier einen Stimulus nicht mehr als angsteinflößend empfindet und eine entsprechende Reaktion des Tiers nicht mehr auslösbar ist, behalten die Zellen der inferioren dorsolateralen Division ihr Zellgedächtnis bei. Dies kann dann unter Stress erneut ausgelöst werden.

Die Verhaltenskonditionierung unterliegt einer Reihe von molekularen Mechanismen und beginnt mit der Übertragung eines konditionierten Stimulus in die präsynaptische Membran der lateralen Amygdala, was die Freisetzung von Glutamat verursacht. Glutamat bindet an postsynaptische Rezeptoren wie AMPAR, NMDAR und mGluR5. Wenn ein starker unkonditionierter Stimulus die Zelle gleichzeitig aktiviert, tritt Calcium in die postsynaptische Zelle durch NMDARs und spannungsabhängige L-Typ-Calciumkanäle ein. Dieses kombinierte Calciumsignal verursacht die Phosphorylierung von MAPK. Andere Kinasen werden aber auch aktiviert, wie PKC, PKA und CaMKII. MAPK transloziert in den Zellkern und aktiviert verschiedene Transkriptionsfaktoren (wie z.B. CREB), welche die Synthese von mRNA und den entsprechenden Proteinen verursacht. Diese neuen Proteine haben verschiedene Funktionen, wie die Bildung von neuen Rezeptoren, die in der Lage sind, Glutamat zu binden. Sie können aber auch eine Strukturveränderung der synaptischen Verbindung auslösen, in dem sie Aktin und andere cytoskelettale Funktionen modifizieren. Diese und andere postsynaptischen Effekte tragen zu der Stabilisierung und Konsolidierung des Langzeitgedächtnisses bei (LeDoux 2007).

1.9. DAS MAUSMODELL IN DER FORSCHUNG

Seit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms Anfang dieses Millenniums, wurde durch die Wissenschaft intensiv an der Analyse und Funktion der proteinkodierenden Gene geforscht (Lander, Linton et al. 2001). Für diese Aufgabe werden verschiedene ausgewählte Modellorganismen verwendet, die mit relativ einfachen Methoden gezüchtet und untersucht werden können. Zu den Organismen gehören zum Beispiel: Bakterien, Pilze, Pflanzen oder Tiere. Der Einsatz von diesen bestimmten Tiermodellen ist ein sehr verbreitetes und effektives Werkzeug um verschiedene physiologische Prozesse sowie die Entstehung von Krankheiten und deren genauen Pathomechanismen zu erforschen. Außerdem können mit deren Hilfe neuartige Therapieansätze sowie der Medikamenteneinsatz entwickelt und getestet werden (Leichsenring A., 2013). Unter den Säugetieren ist das Tiermodell der Maus, vor allem in der präklinischen Forschung, als unabdingbarer Vertreter anzusehen. Einerseits eignet sich das Mausmodell in der wissenschaftlichen Forschung besonders durch dessen genetische Ähnlichkeit mit dem Menschen, andererseits aber auch durch die einfache Handhabung der Tiere und die mögliche genetische Manipulation. Außerdem ähnelt deren Entwicklung, Physiologie, Verhalten, Anatomie und Krankheiten den Vorgängen im Menschen. Durch die Kultivierung und Manipulation von embryonischen Stammzellen können, unter anderen, Knockout und Knockin Individuen erzeugt werden, die gezielt in der Untersuchung der Funktionen von Genen oder als Modell für gendefektbasierte Krankheiten verwendet werden.

1.9.1. GENERIERUNG DER SPRED2 KO-MÄUSE

Die Generierung der SPRED2 KO-Mäuse gelangte aus der embryonalen Stammzelllinie XB228, welche von BayGenomics (Aktuell International Gene Trap Consortium in USA) erhalten wurden. Diese Stammzelllinie hat ihren Ursprung aus 129P2/OlaHsd-Mäusen und beinhaltet den pGT0 Gene-Trap Vektor, dieser inserierte zwischen Exon 4 und 5 im SPRED2 Gen. Die XB228 Zellen, die mit dem Gene-Trap Vektor versehen wurden, wurden dann in isolierte Blastozysten aus superovulierten C57BL/6 Mäusen injiziert. Pseudoschwangeren Weibchen, die zuvor mit

vasektomierten männlichen Mäusen gepaart wurden, wurden diese manipulierten Blastozysten implantiert. Um die SPRED2 KO-Mauslinie zu etablieren, wurden chimäre männliche Tiere mit den C57BL/6 WT-Weibchen gepaart. In dieser Weise konnte die Keimbahntransmission getestet werden und die ersten SPRED2 heterozygoten Mäuse erzeugt werden. Das genaue Vorgehen in der Generierung der SPRED2 KO-Mäuse wurde bereits im Detail beschrieben (Bundschu, 2005; Bundschu et al., 2005; Ullrich and Schuh, 2009).

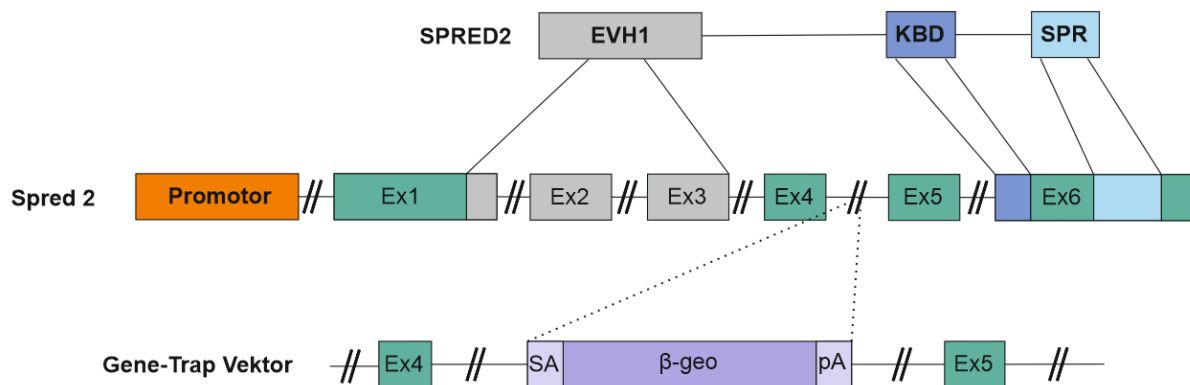


ABBILDUNG 8: GENERIERUNG DER SPRED2 KO-MÄUSE. DARGESTELLT IST DIE GENOMISCHE SPRED2-STRUKTUR MIT DEN JEWEILS FÜR DAS SPRED2-PROTEIN CODIERENDEN EVH1-, KBD- UND SPR-DOMÄNEN. DURCH DIE INSERTION DES GENE-TRAP VEKTORS ZWISCHEN DEN EXONS 4 UND 5 VON SPRED2, WIRD DAS GEN GESTÖRT. B-GEO: REPORTER GEN; EVH1: ENABLED/VASP HOMOLOGY 1 DOMAIN; EX: EXON; KBD: C-KIT BINDEnde DOMÄNE; PA: SV40 POLYADENYLIERUNGSSEQUENZ; SA: SPLICE ACCEPTOR; SPR: CYSTEIN-REICHE SPROUTY-DOMÄNE. MODIFIZIERT NACH (ULLRICH, M., 2014).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. HALTUNG UND ZÜCHTUNG DER MÄUSE

Die Mäuse wurden einzeln oder in Gruppen von bis zu vier Individuen pro Plastik Käfig gehalten. Einen Tagesrhythmus von 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit sowie eine 50%ige Feuchtigkeit wurden konstant gehalten. Trinkwasser und Standard-Mausfutter standen den Tieren zu freien Verfügung.

Um Nachwusch von jedem Phänotyp, wie SPRED2 WT-, KO- oder HET-Mäuse, mit gleichem Alter von einem Wurf zu erzeugen, wurde ein SPRED2 HET-Männchen mit zwei SPRED2 HET-Weibchen gepaart. Die Mäuse wurden außerdem, auf einem gemischten 129P2/OlaHsd x C57Bl/6 genetischen Hintergrund gezüchtet, um eine potenzielle Inzucht zu vermeiden.

2.2. VERWENDETE MÄUSE

Für die Durchführung der Experimente wurden 20 Mäuse verwendet, 10 KO-Mäuse und 10 WT-Mäuse als Kontroll-Gruppe. Die beiden Gruppen bestanden aus vergleichbaren alten Tieren und vergleichbaren Mengen an Weibchen und Männchen pro Gruppe. Das Alter der Mäuse schwanke zwischen 11 und 20 Monate. Die Fellfarbe der Versuchstiere war entweder braun oder schwarz. Alle Experimente wurden durch die zuständige Ethikkommission und Tierschutz Behörde genehmigt (Genehmigung des Tierversuches mit Nummer **55.2.2531.01-98/14**).

Nummer	Geburtsdatum	Alter (Monate)	♂/♀
1724	20.03.2010	20,1	♂
1945	08.11.2010	11,8	♂
1729	20.03.2010	20,1	♀
1882	12.09.2010	13,9	♀
1883	12.09.2010	13,9	♀
31	28.12.2010	12,4	♂
35	01.01.2011	12,2	♂
73	15.02.2011	10,6	♂
1779	07.05.2010	20,8	♀
1824	09.07.2010	18,5	♀
1921	14.10.2010	15,0	♀

TABELLE 2. VERWENDETE WILDTYP MÄUSE

Nummer	Geburtsdatum	Alter (Monate)	♂/♀
1739	25.03.2010	19	♂
1934	01.11.2010	11	♂
1726	20.03.2010	19	♀
1899	01.10.2010	12	♀
1912	14.09.2010	13	♀
22	18.12.2010	12,7	♂
23	18.12.2010	12,7	♂
78	20.02.2011	10,4	♂
1787	27.05.2010	20,0	♀
1817	03.07.2010	18,7	♀
1938	01.11.2010	14,4	♀

TABELLE 3. VERWENDETE KNOCKOUT MÄUSE

2.3. GENOTYPISIERUNG DER SPRED2 KO-MÄUSE

Der Maus-Nachwuchs wurde mittels PCR Analyse genotypisiert, mit Hilfe des REDEExtract-N-Amp™ Gewebe PCR Kits von Sigma-Aldrich (Cat. No. XNATR). Die genomische DNA wurde aus Biopsien aus der Spitze des Schwanzes der Maus (ca. 0,1 cm Länge) isoliert. Die Präparate wurden dann mit einer Mischung aus 100 µl Extraktionslösung und 25 µl Präparationslösung für 12 Minuten bei 55°C, und für 3 Minuten bei 95°C inkubiert. Als letzter Schritt vor der PCR Amplifikation, wurde 100 µl Neutralisationslösung zu den Proben dazugegeben. Das Gesamtvolumen jeder Probe betrug 20 µl und bestand aus den folgenden Komponenten:

Bezeichnung	Volumen	Konzentration
Red-Mastermix (2 x)	10 µl	1x
Primer: SPR2-Geno-WT/KO-Forward	0,8 µl	400 nM
Primer: SPR2-Geno-WT-Reverse	0,8 µl	4000 nM
Primer: SPR2-Geno-KO-Reverse	0,8 µl	400 nM
Gewebe/Probe	4 µl	
Steriles Wasser	3,6 µl	
Gesamtvolumen	20 µl	

TABELLE 4. REAGENZIEN FÜR DIE GENOTYPISIERUNG MITTELS PCR ANALYSE.

Primer	Sequenz
SPR2-Geno-WT/KO-Forward	5` - GCTTGACCGGCACCCCGGTGAG - 3`
SPR2-Geno-WT-Reverse	5` - GGGCACTGGATCCCTTGGAGC – 3`
SPR2-Geno-KO-Reverse	5` - CGGATCTCAAACCTCTCCTCC - 3`

TABELLE 5. SEQUENZEN DER BENUTZTEN PRIMER FÜR DIE KO UND WT PCR.

Kleine Abschnitte der genomischen DNA, die an Größe abweichen, wurden mit Hilfe des folgenden Zyklus amplifiziert:

Vorgang	Temperatur	Zeit (Minuten)	Zyklen
Initialdenaturierung	94°C	3	1
Denaturierung	94°C	1	
Annealing	59°C	1	30
Elongation	72°C	1	
Abschlusselongation	72°C	10	1

TABELLE 6. ZYKLUS FÜR AMPLIFIZIERUNG VON KLEINEN DNA-ABSCHNITTEN.

Die 803 bp WT- und 452 bp KO-Fragmente wurden mittels Agarose Gelelektrophorese analysiert. Das Gel bestand aus 1 % Agarose in 1x TAE-Puffer (1 x Tris-Acetat-EDTA Puffer: 40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid) und Ethidiumbromid mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml. Das fertige Gel wurde in die Laufkammer gesetzt und mit 1x TAE-Puffer bedeckt, um 10 µl der Proben zu laden. Die Fragmente wurden dann mittels Gelelektrophorese (45-60 min bei 80 V) aufgetrennt. Die PCR-Produkte wurden dann mit Hilfe eines UV-Transilluminators detektiert und später fotografiert (Gel Logic 100 Imaging System, Kodak). Die Größe der Fragmente wurde mit einer DNA-Leiter bestimmt (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Thermo Scientific; Cat. No. SM0331).

2.4. ENTNAHME DER GEHIRNE

Die Gehirne der Mäuse wurden im Labor des Instituts für Physiologie der Universität Würzburg entnommen. Die Tiere wurden aus dem Tierstall des Instituts in ihren Plastikkäfigen ins Labor transportiert. Die Mäuse wurden einzeln in einem separaten Plastikkäfig umgelagert und mittels CO₂ für ca. 30 Sekunden getötet. Anschließend wurde der Kopf mit einer Schere von dem Hals abgetrennt und das Gehirn vorsichtig mittels Schere und Dissektor aus dem Schädel präpariert. Die Gehirne wurden dann, wie unten beschrieben, weiterverarbeitet.

2.5. MATERIAL X-GAL FÄRBUNG

2.5.1. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Bezeichnung	Inhalt
0.1 M Phosphatpuffer	27 mM NaH ₂ PO ₄ , 73 mM Na ₂ HPO ₄
X-Gal Fixierungspuffer	0.1 M Phosphatpuffer ergänzt mit 5 mM EGTS (Ethylenglycol Tetraessigsäure, pH 8), 2 mM MgCl ₂ , und 0.2% Glutaraldehyd
X-Gal Waschpuffer	0.1 M Phosphatpuffer ergänzt mit 2 mM MgCl ₂
X-Gal Stock Lösung (50 mg/ml)	500 mg X-Gal in 10 ml Dimethylformamid
X-Gal Färbepuffer	0.1 M Phosphatpuffer ergänzt mit 2 mM MgCl ₂ , 5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ , 5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ , und 1mg/ml X-Gal
Tissue-Tek O.C.T Verbindung	Sakura Finetek Europe, Leiden, Holland

2.5.2. GERÄTE

Bezeichnung	Hersteller
CM 1950 Mikrotom	Leica
EOS 1000D digitale Kamera	Canon
Stereomikroskop 200-C	Zeiss

2.5.3. METHODEN-X-GAL FÄRBUNG

Die seziierten Gehirne der Mäuse wurden in das wasserlösliche Einbettmedium Tissue-Tek O.C.T. eingebettet und mit flüssigem Stickstoff eingefroren, um diese dann später mit einem mit Kohlenstoff-Messer ausgestatteten Mikrotom in circa 10

µm dünnen Schnitte zu schneiden und auf unbeschichtete Objektträger aufzubringen. Die Präparate wurden dann für 15 Minuten in X-Gal Fixierungspuffer fixiert und danach zwei Mal für 5 Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die Proben wurden dann mit dem Färbepuffer über Nacht bei 37°C in einer feuchten Kammer gefärbt. Am nächsten Tag wurden die Proben erneut gewaschen und mit Mowiol eingedeckt. Die Präparate wurden dann bei 4 °C gelagert und mit einem Stereomikroskop und dazu passender Kamera fotografiert.

2.6. WESTERN BLOT

2.6.1. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Bezeichnung	Inhalt
Lysatpuffer	2% SDS in PBS, Protease Inhibitor, Phosphatase Inhibitor
Trenngel (10ml) 10%	4,0 ml H ₂ O, 3,3 ml 30% Acrylamid Mischung (Rotiphoprese®Gel 30, Roth, Cat. No. 3029.1), 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 100 µl 10% SDS, 100 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS), 4µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)
Sammelgel	3,4 ml H ₂ O, 830 µl 30% Acrylamid Mischung, 630 µl 1 M Tris (pH 6,8), 50 µl 10% SDS, 50 µl 10% APS, 5µl TEMED
1x SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1% SDS
1x Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1% SDS, 20% Methanol
PageRuler	Prestained Protein Ladder, Fermentas, Cat. No. 26616
Ponceau S Lösung	2% Ponceau S, 30% Trichloressigsäure, 30% Sulfosalicylsäure
Waschpuffer	0,05% Tween in PBS
Blocking-Lösung	5% Milchpulver in 0,05% PBS-Tween

2.6.2. ANTIKÖRPER

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Firma/Nr.
SPRED 2	Kaninchen	1:500	Bundschu et. al 05
SPRED 1	Kaninchen	1:500	Bundschu et. al 05
GAPDH	Kaninchen	1:10000	Cell Signalling
α -Tubulin	Maus	1:5000	Sigma T-6074
β -Tubulin	Maus	1:2000	Sigma T-8320
PSD95	Maus	1:2000	Sigma P-246
mGlutamat Rezeptor 2	Maus	1:1000	Abcam Ab15672
mGlutamat Rezeptor 5	Kaninchen	1:500	Abcam Ab53090
Bassoon	Kaninchen	1:500	Synaptic Systems 141003
Rab3a	Maus	1:1000	Synaptic Systems 107111
Rab6	Kaninchen	1:200	Santa Cruz sc310
ERC 1	Maus	1:5000	Abcam Ab50312
ERC 2	Kaninchen	1:5000	Synaptic Systems 143103
Meerrettichperoxidase	Ziege	1:10000	Jackson Immuno Research

2.6.3. GERÄTE

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Homogenisator	Polytron PT 3100	Kinematica, Luzern, Schweiz
Homogenisator	Sonopuls HD 2070	Bandelin
Semi-Dry Blotter	Fastblot B44	Biometra
Spektrometer	SmartSpec 3000	Bio-Rad
Zentrifuge	7500644	Heraeus Sorvall

2.6.4. VERBRAUCHSMATERIALIEN

Bezeichnung	Produkt	Hersteller
Zellulosenitrat-Membranen	Protran BA38	GE Whatman, Cat.No.10401396

2.6.5. METHODE-WESTERN BLOT

Die Proteinexpression im Mausgewebe wurde mittels Western Blot analysiert und quantifiziert. Die Tiere wurden, wie bereits erwähnt, mit CO₂ getötet und nach der Sezierung des Gehirns, die Amygdala-Region mit einem Metallzylinder herausgestanzt. Die Masse der Amygdala-Region schwankte zwischen 100-170 mg pro Maus. 50 mg der Gewebeproben wurden weiterverarbeitet und mit 2 ml Lysatpuffer verdünnt. Die Proben wurden in einem Polytron Homogenisator bei 28×10^3 Umdrehungen pro Minute für 60 Sekunden weiterverarbeitet. Die Proteinkonzentration der Proben wurden mit UV-Spektroskopie bestimmt. Die Proben wurden 1/20 (5 µl Lysatprobe und 95 µl H₂O) verdünnt und mit 17×10^3 G auf Raumtemperatur zentrifugiert. Das Spektrometer wurde initial durch eine Kontrollprobe mit einer nur Lysatpuffer enthaltenden Probe genullt, danach die Proteinkonzentration der Proben nacheinander bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde nach der folgenden Formel bestimmt: Proteinkonzentration (mg/ml) = 1,55 x

$A_{280} - 0,76 \times A_{260}$. Lysatproben, die nicht sofort gebraucht wurden, wurden auf -80°C gelagert. Danach wurden die Proben mit je $30 \mu\text{g}$ Protein, SDS-Ladepuffer hinzugefügt, und mittels SDS-PAGE (6-12% abhängig von der Proteingröße) sowie einem Protein-Marker mit verschiedenen Proteingrößen (PageRuler) getrennt. Die getrennten Proteine wurden dann mittels Semi-Dry Blotter und Elektrophorese ($1-2 \text{ mA/cm}^2$) auf Zellulosenitrat-Membranen transferiert. Zur Kontrolle des Proteintransfers, wurde Ponceau S Färbung auf die Zellulosenitrat-Membranen dazu appliziert und nach der Kontrolle mit destilliertem Wasser mehrmals gewaschen. Die Zellulosenitrat-Membranen wurden dann mit 5% Milch in 0,05% PBS-Tween für eine Stunde geblockt, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu reduzieren. Die Membranen wurden dann mit dem ersten Antikörper und Inkubations-Lösung auf 4°C über Nacht inkubiert und 3 Mal mit 0,05% PBS-Tween für je 7 Minuten gewaschen. Nach dem Waschen der Membran, wurde sie mit dem zweiten Antikörper für 2 Stunden auf Raumtemperatur inkubiert und danach erneut gewaschen. Die Entwicklung des Signals wurde mittels CheLuminate-Meerrettichperoxidase FemtoDetect Reagenz durchgeführt und auf Röntgenfilme übertragen. Die Analyse der in den Röntgenfilmen dargestellte Banden wurde mit dem Programm Image J durchgeführt.

2.7. REAL-TIME PCR

2.7.1. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN

Bezeichnung	Hersteller
Trizol	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
TaqMan Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
TaqMan Universal Mix	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA

2.7.2. PRIMER

Bezeichnung	Produkt	Hersteller
PSD95	Mm00492193_m1	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
mGluR2	Mm01235831_m1	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
mGluR5	Mm00690332_m1	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
ERC1	Mm00453569_m1	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
Bassoon	Hs01109152_m1	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA
18s rRNA	Hs99999901_s1	Applied Biosystems, Waltham, MA, USA

2.7.3. GERÄTE

Bezeichnung	Hersteller
96 Well Geneamp® PCR System 9700	Thermo Fisher Scientific

2.7.4. METHODEN- REAL-TIME PCR

Die Real Time Quantitative PCR ist ein wichtiges Werkzeug in der Molekularbiologie, bei der durch die Vervielfältigung von Nukleinsäuren und durch Fluoreszenz-Messungen mRNA quantifiziert werden kann. Diese wurde durchgeführt, um die Proteinexpression auf transkriptioneller Ebene zu analysieren. Die mRNA Menge wurde zwischen KO-Mäusen und WT-Mäusen verglichen. Die Amygdala-Region der Mäuse wurde nach der Sezierung des Gehirns mit einem Metallzylinder rausgestanzt und mit einem Polytron Homogenisator homogenisiert.

2.7.5. RNA-AUFREINIGUNG

Für die RNA-Aufreinigung wurde das Gewebe mit 600 µl Trizol-Reagenz pro Probe verdünnt und mittels Ultrathurax für 30 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde dann für 5 Minuten auf Raumtemperatur inkubiert, 300 µl Chloroform dazugegeben, die Proben gründlich mittels Vortex durchgemischt und dann für 15 Minuten mit 13×10^3 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Die obere Phase (Proteinfreie Phase) wurde weiterverarbeitet und mit 1,1 µl Glycogen und 600 µl Isopropylalkohol über Nacht bei -20°C inkubiert. Die Proben wurden erneut für 15 Minuten bei 4°C mit 13×10^3 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand abgekippt, 1ml 75% Ethanol dazugegeben und danach erneut für 10 Minuten bei 13×10^3 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgekippt und das verbleibende Pellet bei 42°C für 15 Minuten zum Trocknen auf einen Heizblock gelegt. Anschließend wurde das Pellet mit 33 µl DEPC- H_2O aufgelöst, gründlich durchgemischt und auf einen Heizblock zum Trocknen bei 55°C für 10 Minuten gelegt und über Nacht bei -20°C inkubiert.

2.8. OPTISCHE DICHTENMESSUNG

Die optische Dichte der Proben wurde mit Hilfe eines Photometers zur Bestimmung der RNA Konzentration gemessen. Dafür wurden die RNA Proben auf Eis aufgetaucht und jeweils 3 µl Probe mit 87 µl DEPC- H_2O verdünnt. Das Photometer wurde zweimal genullt und die Proben dann nacheinander gemessen.

2.9. STATISTIK

Die Auswertung der Daten, die in dieser Arbeit akquiriert worden sind, wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel durchgeführt. Die erhobenen Daten wurden erstmal in zwei Gruppen eingeteilt, die WT-Tiere und die KO-Tiere. Hier wurden insgesamt 11 Tiere ($n=11$) pro Gruppe verwendet, außer in dem Western Blot des Proteins SPRED1, wo nur 5 Tiere ($n=5$) pro Gruppe eingesetzt wurden. Proteinkonzentrationen wurden zuvor auf das Protein GAPDH verhältnismäßig

normiert und bei den PCR-Experimenten die endogene Kontrolle 18S rRNA dazu verwendet. Die Daten wurden dann in einer gemeinsamen Tabelle eingefügt und Mittelwert, Standardabweichung, Signifikanz und Varianz berechnet. Für die Berechnung der Statistik wurden die Werte normiert, sodass die WT-Tiere den Wert 1 hatten. Mit Hilfe der zusammengefassten Durchschnittswerte der KO- und WT-Mäuse wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt und die statistische Signifikanz berechnet. Das Signifikanzniveau wurde mit * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, und *** $p < 0.001$ festgelegt. Mit den gewonnenen Daten wurden Säulen-Diagramme ebenfalls mit Hilfe des Programms Microsoft Excel erstellt.

3. ERGEBNISSE

3.1. X-GAL FÄRBUNG

Um die Expression von SPRED2 in dem Gehirn der Mäuse genauer zu lokalisieren, wurden koronale Schnitte der Gehirne von SPRED2-heterozygoten Mäuse durchgeführt. Die Proben wurden seziiert, eingebettet und eingefroren. Schnittpräparate wurde dann mit dem Mikrotom hergestellt und dann, durch die X-Gal Färbung, die weit verbreitete SPRED2 Expression nachgewiesen. Vor allem im Kortex, Hippocampus, Amygdala und Striatum konnte eine erhöhte Expression des Zielproteins nachgewiesen werden (s. Abbildung 10). Die Amygdala wurde als Ziel dieser Arbeit festgelegt, da sie ein wichtiger Bestandteil des limbischen Systems ist und eine wichtige Rolle in der Entstehung von OCD spielt. Die Amygdala-beinhaltende Region der Versuchstiere wurde mit einem Metallzylinder ausgestanzt, lysiert und später in den verschiedenen Versuchen eingesetzt.

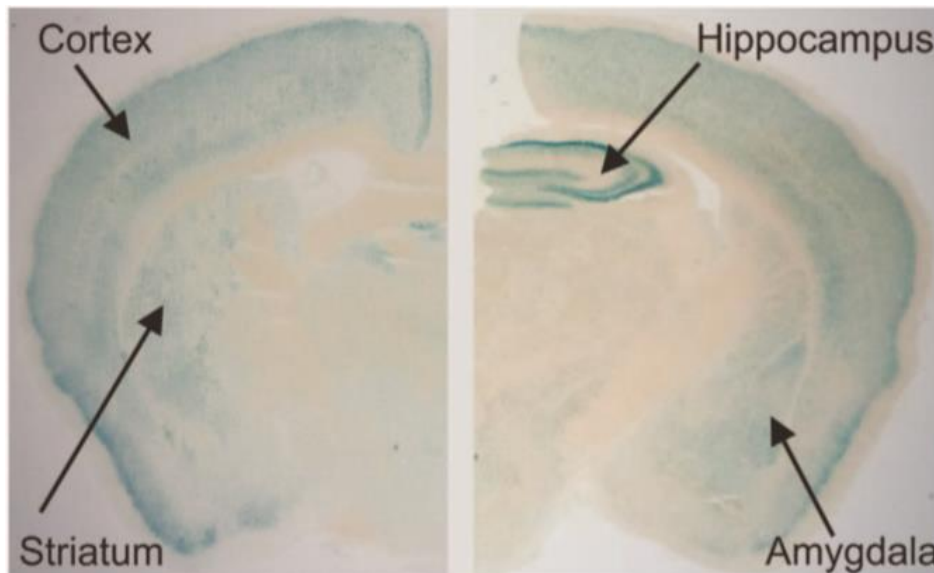


ABBILDUNG 9: X-GAL FÄRBUNG EINES KORONALEN SCHNITTES VON EINER SPRED2 HETEROZYGOTEN MAUS. ES ZEIGT SICH (BLAU VERFÄRBT) DIE WEIT VERBREITETE SPRED2 EXPRESSION IM CORTEX, HIPPOCAMPUS, AMYGDALA UND STRIATUM. ABBILDUNG VON (M. ULLRICH, H. GUERRERO GONZALEZ, ET. AL. 2017).

3.2. WESTERN BLOT

3.2.1. EXPRESSIONSVERÄNDERUNG DER SYNAPTISCHEN PROTEINE IN DER AMYGDALA

Im Rahmen der intensiven Verhaltensforschung von SPRED2 KO-Mäusen wurde unter anderem eine veränderte Morphologie der lateralen Amygdala und entsprechend der synaptischen Erregbarkeit in den Mäusen festgestellt. Da SPRED-Proteine eine supprimierende Wirkung in dem Ras/ERK-MAPK-Signalweg ausüben und als wichtige Regulatoren von Zell-Proliferation und Gen-Expression fungieren, wurde die Relation zwischen veränderter synaptischer Erregbarkeit und die veränderte Expression von synaptischen Proteinen in der Amygdala weiter untersucht. Durch die Western Blot Analyse von präsynaptischen und postsynaptischen Proteinen konnte ein verändertes Expressionsniveau in 11-19 Monaten alten SPRED2 KO-Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-WT-Mäusen nachgewiesen werden. Die Amygdala-Region der Tiere wurde, wie bereits vorbeschrieben, präpariert und mit Lysatpuffer weiterverarbeitet, um dann das Proteingehalt zu bestimmen und durch die Normierung mit GAPDH zu quantifizieren. Nach dem aufwendigen Vorgang des Western Blots und dem endgültigen Transfer der Proteine mittels Semi-Dry Blotter und Elektrophorese auf Zellulosenitrat-Membranen, wurden die Membranen mit dem gezielten Antikörper inkubiert. Die Entwicklung des Signals wurde mittels CheLuminate-Meerrettichperoxidase FemtoDetect Reagenz durchgeführt und auf Röntgenfilme übertragen. In den verschiedenen Abbildungen werden die Signalbanden exemplarisch dargestellt, hier wurden für jedes untersuchte Protein jeweils 5 WT- und 5 KO-Tiere gemessen. Alle Proben wurden nach dem Protein GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) als Referenz normiert. Hier handelt es sich um ein Enzym, das in allen Lebewesen vorkommt und in den meisten Geweben und Zellen synthetisiert wird. Es ist in hohem Maße stabil und konstitutiv vorhanden, da es ein unentbehrlicher Baustein in der Glykolyse ist. Aus diesem Grund wird GAPDH in der Zell-Forschung häufig als Kontrolle eingesetzt. In den verschiedenen Abbildungen kann man anhand der Intensität und Oberfläche der Signalbanden die

Proteinkonzentration feststellen, das bedeutet bei steigender Konzentration erscheinen die Banden dunkler und größer. Die Analyse der in den Röntgenfilmen dargestellten Banden wurde mit dem Programm Image-J durchgeführt, wo die Oberfläche der Banden ermittelt wurde. Die Ergebnisse wurden mit der GAPDH-Proteinkonzentration normiert und die relativen Werte zwischen den WT- und SPRED2 KO-Mäuse verglichen.

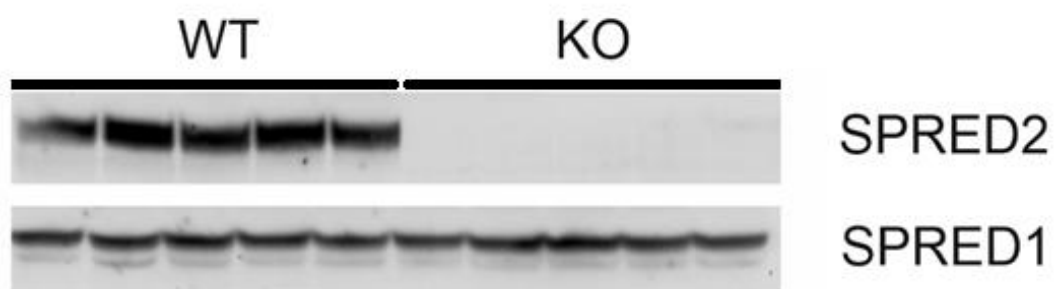


ABBILDUNG 10: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINES WESTERN BLOTS VON SPRED1 UND -2 IN WT- (N=5) UND KO-MÄUSEN (N=5).

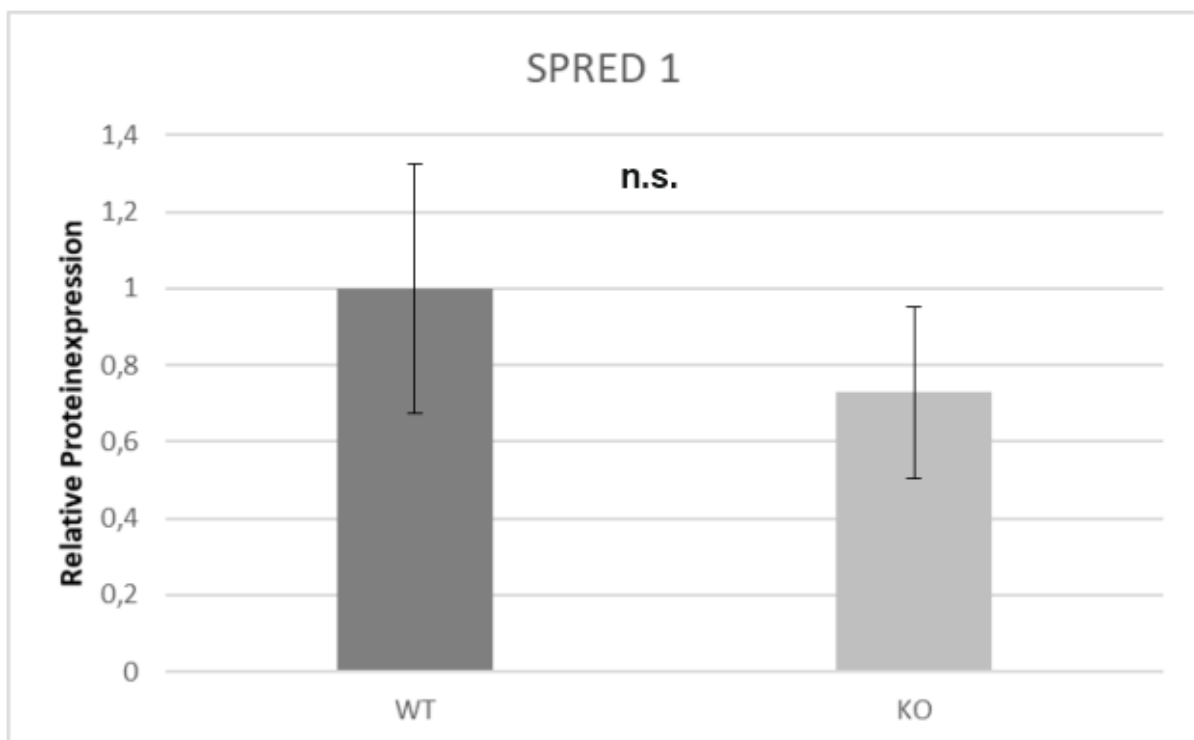


ABBILDUNG 11: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES QUANTIFIZIERTEN SIGNALS VON SPRED1 IN WT- (N=5) UND KO-MÄUSEN (N=5) NACH NORMIERUNG MIT GAPDH. N.S.=NICHT SIGNIFIKANT.

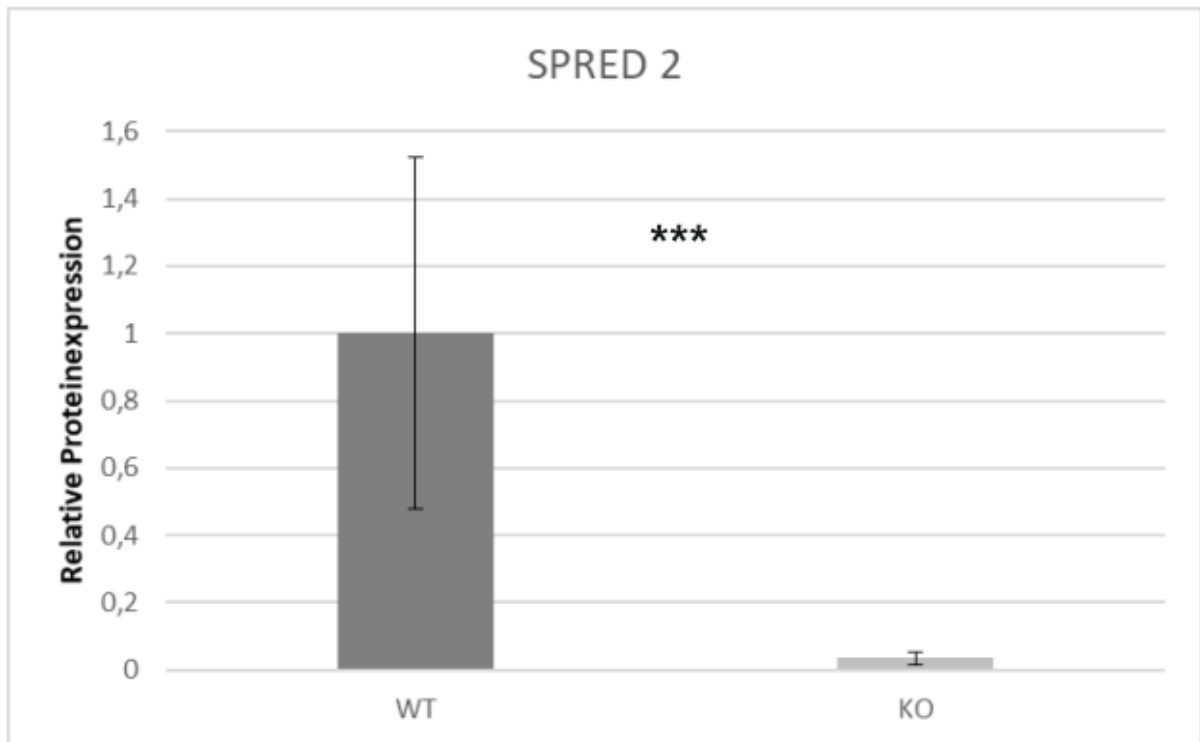


ABBILDUNG 12: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES QUANTIFIZIERTEN SIGNALS VON SPRED2 IN WT- (N=11) UND KO-MÄUSEN (N=11) NACH NORMIERUNG MIT GAPDH. * P<0,001.**

In der Abbildung 11 wird die Proteinexpression von SPRED1 und -2 zwischen den WT- und KO-Mäusen direkt verglichen. Hier zeigt sich die Expression von SPRED2 in den WT- und die Abwesenheit des Proteins in den KO-Tieren. Außerdem konnte in der Analyse von SPRED1 in beiden untersuchten Gruppen, keine Hochregulation in der Proteinexpression bei den KO-Mäuse nachgewiesen werden.

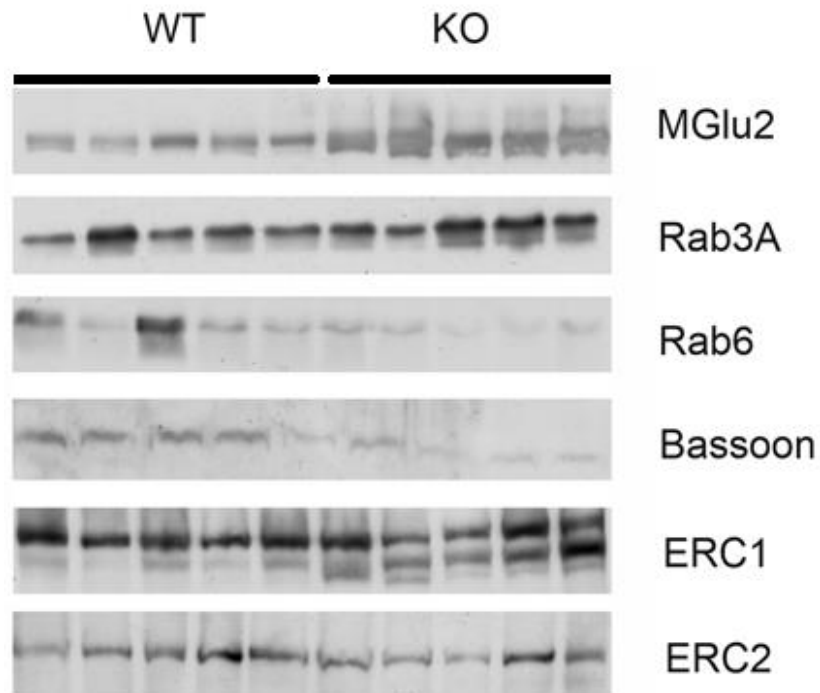


ABBILDUNG 13: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINES WESTERN BLOTS VON PRÄSYNAPTISCHEN PROTEINEN IN DER AMYGDALA BEI SPRED2 KO-MÄUSE (N=11) IM VERGLEICH ZU WT-KONTROLLEN (N=11).

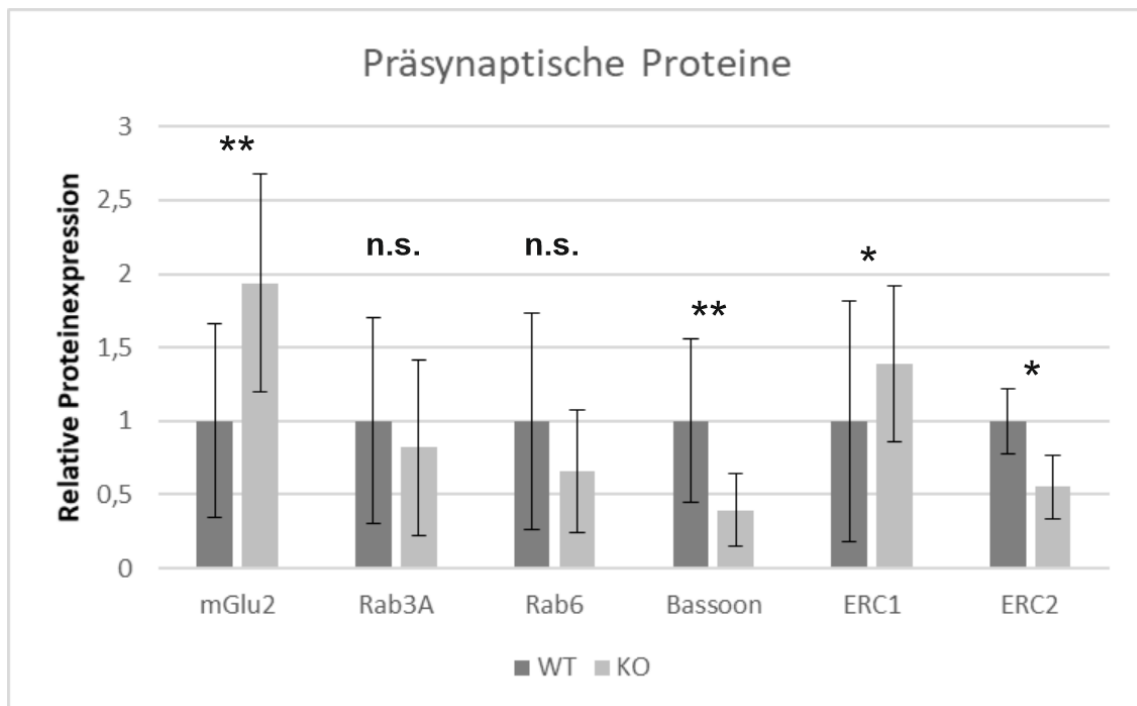


ABBILDUNG 14: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES QUANTIFIZIERTEN SIGNALS VON PRÄSYNAPTISCHEN PROTEINEN IN WT- (N=11) UND KO-MÄUSEN (N=11) NACH NORMIERUNG MIT GAPDH. * P<0,05; ** P<0,01; n.s.=NICHT SIGNIFIKANT.

Im Gegensatz dazu, konnte eine Proteinerhöhung des metabotropen Glutamatrezeptors 2, wie in der Abbildung 14 dargestellt, nachgewiesen werden. Der Rezeptor befindet sich hauptsächlich auf präsynaptischer Ebene, kommt aber in der postsynaptischen Membran auch vor. In dem Fall von ERC1 konnte ebenfalls eine Hochregulation in dem SPRED2 KO-Tiere nachgewiesen werden. ERC1 ist ein Mitglied der RIM-bindenden Proteinfamilie und kommt in der präsynaptischen aktiven Zone vor. Des Weiteren ist dieses Protein hauptsächlich für die Regulation der Freisetzung von Neurotransmittern beteiligt. Im Gegensatz dazu bot das präsynaptische Protein und direkter Interaktionspartner von ERC2, Bassoon, eine Herunterregulierung. Außerdem zeigten die GTPasen Rab3A und Rab6 keinen signifikanten Unterschied in der relativen Proteinexpression. Diese verwandten Proteine sind im Transport und Exozytose von verschiedenen Proteinen in der präsynaptischen Membran involviert.

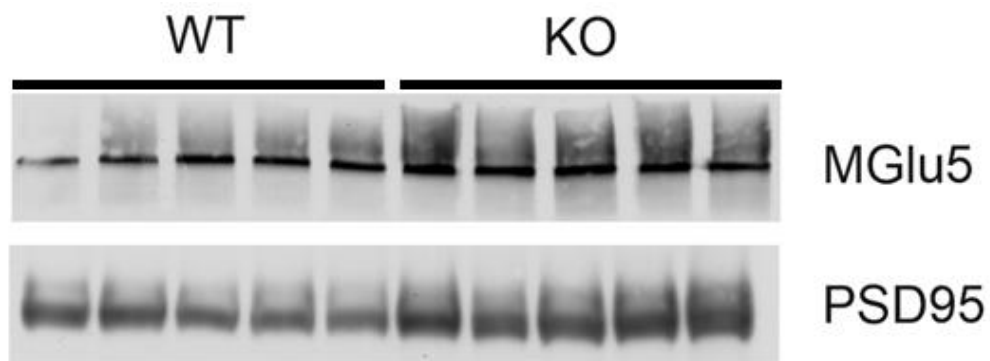


ABBILDUNG 15: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINES WESTERN BLOTS VON POSTSYNAPTISCHEN PROTEINEN IN DER AMYGDALA BEI SPRED2 KO-MÄUSEN (N=11) IM VERGLEICH ZU WT-KONTROLLEN (N=11).

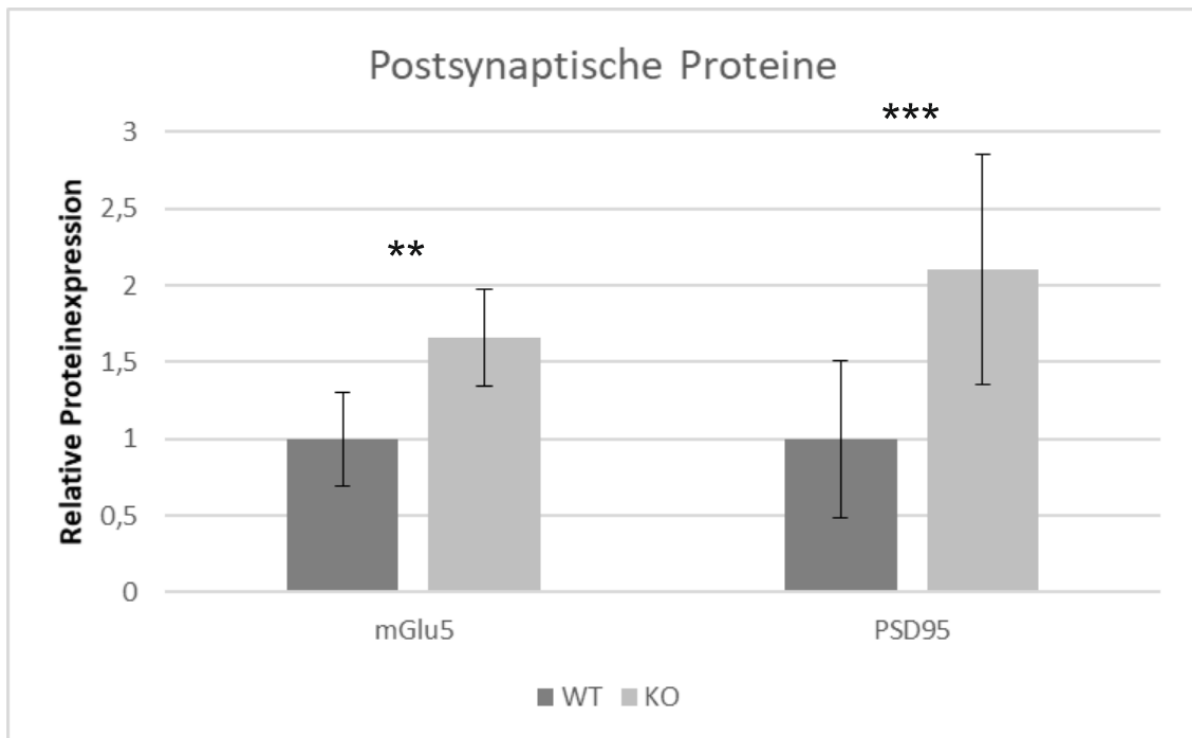


ABBILDUNG 16: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DES QUANTIFIZIERTEN SIGNALS VON POSTSYNAPTISCHEN PROTEINEN IN WT- (N=11) UND KO-MÄUSEN (N=11) NACH NORMIERUNG MIT GAPDH. ** P<0,01; * P<0,001.**

In dem Fall der postsynaptischen Proteine, wie PSD95, zeigte sich eine Hochregulierung in den SPRED2 KO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Versuchstieren. PSD95 ist ein membran-assoziiertes Protein, das auf postsynaptischer Ebene Proteinkomplexe bildet und für die Verankerung von anderen synaptischen Proteinen wichtig ist. Bei dem metabotropen Glutamatrezeptor 5, der spezifisch den Neurotransmitter Glutamat bindet und sich vor allem in der postsynaptischen Membran von glutamatergen Synapsen befindet, zeigte sich ebenfalls bei SPRED2 KO-Mäusen eine gesteigerte Konzentration.

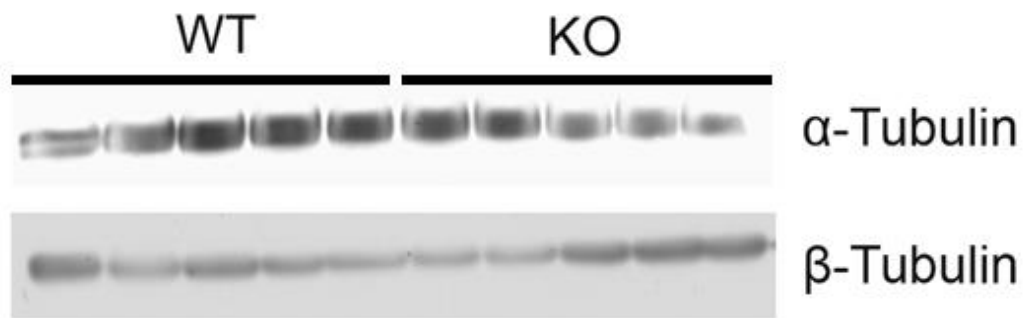


ABBILDUNG 17: EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG EINES WESTERN BLOTS VON TUBULINEN IN DER AMYGDALA BEI SPRED2 KO-MÄUSEN (N=11) IM VERGLEICH ZU WT-KONTROLLEN (N=11).

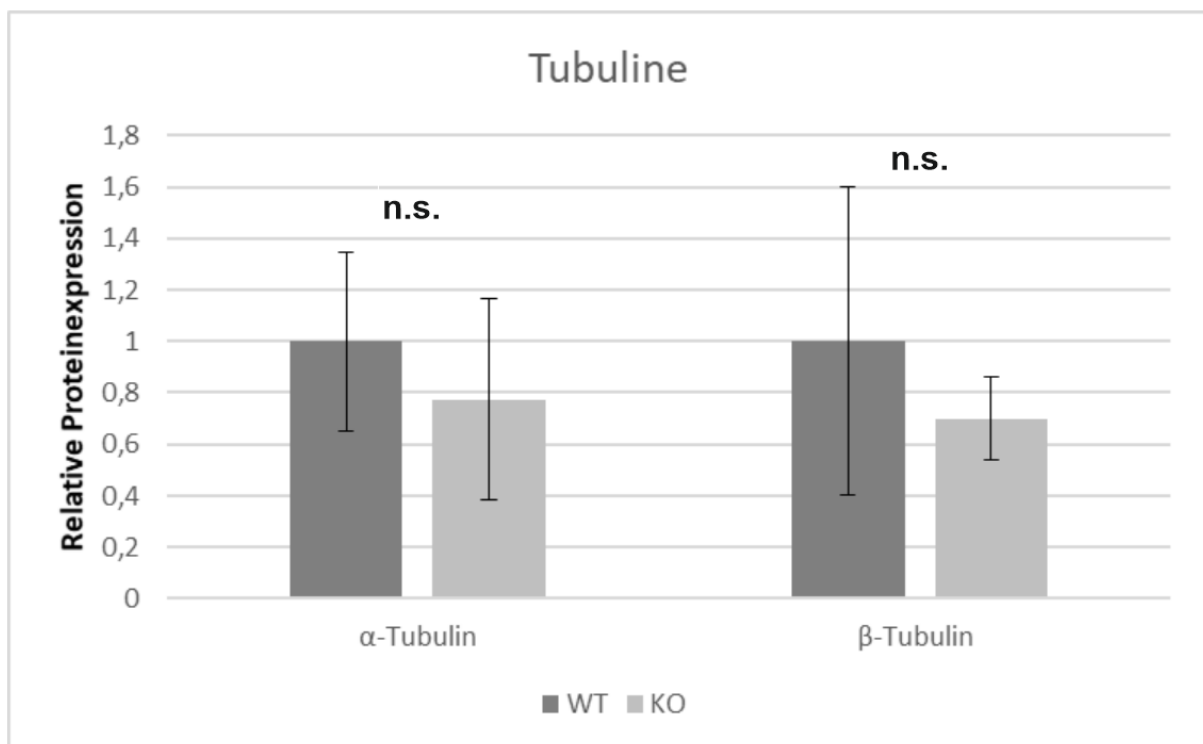


ABBILDUNG 18: GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER RELATIVEN PROTEINEXPRESSION VON TUBULINEN IN WT- (N=11) UND KO-MÄUSEN (N=11) NACH NORMIERUNG MIT GAPDH. N.S.=NICHT SIGNIFIKANT.

Nach Analyse der Strukturproteine, α - und β -Tubulin, konnte keine signifikante Änderung in der Proteinexpression zwischen den zwei Untersuchungsgruppen nachgewiesen werden. Durch die Western Blot Untersuchung der verschiedenen synaptischen Proteine konnten eindeutige Veränderungen in der Proteinexpression zwischen den beiden analysierten Gruppen nachgewiesen werden. Um diese

Unterschiede besser zu differenzieren und die Frage nach einer translationellen oder transkriptionellen Ursache zu beantworten, wurde das Material weiter mittels RT-PCR untersucht.

3.3. QUANTITATIVE REAL-TIME-PCR

Die unterschiedliche Proteinexpression in einer Zelle wird beeinflusst vor allem durch die Gen-Transkription oder die Protein Fluktuationsrate. Um eine mögliche Protein-Dysregulation auf transkriptioneller Ebene zwischen SPRED2 KO- und WT-Mäusen nachweisen zu können, wurden quantitative RT-PCRs mit mRNA aus der Amygdala der KO- und WT-Mäuse durchgeführt. Die Real Time Quantitative PCR ist ein wichtiges Werkzeug in der Molekularbiologie, bei der durch die Vervielfältigung von Nukleinsäuren und durch Fluoreszenz-Messungen, mRNA quantifiziert werden kann. Als interne Kontrolle für die Quantifizierung der mRNAs werden verschiedene Haushaltsgene verwendet, in diesem Fall 18s. Für die genauere Identifizierung der Gene, wurden spezifische Primer der zu untersuchenden Proteine verwendet. In unserem Experiment wurden folgenden Gen-spezifische Primer getestet: PSD95, metabotroper Glutamatrezeptor 2, metabotroper Glutamatrezeptor 5, Bassoon und ERC1.

In der RT-PCR Analyse des präsynaptischen Proteins Bassoon, konnte eine Hochregulation auf transkriptioneller Ebene nachgewiesen werden, anders als bei den Proteinexpression Ergebnissen des Western Blots, wo eine Herunterregulierung nachgewiesen wurde. Bei dem Protein ERC1 sowie dem metabotropen Glutamatrezeptor 2, konnte ebenfalls eine Erhöhung in den relativen mRNA Werten festgestellt werden, passend zu den Ergebnissen des Western Blots.

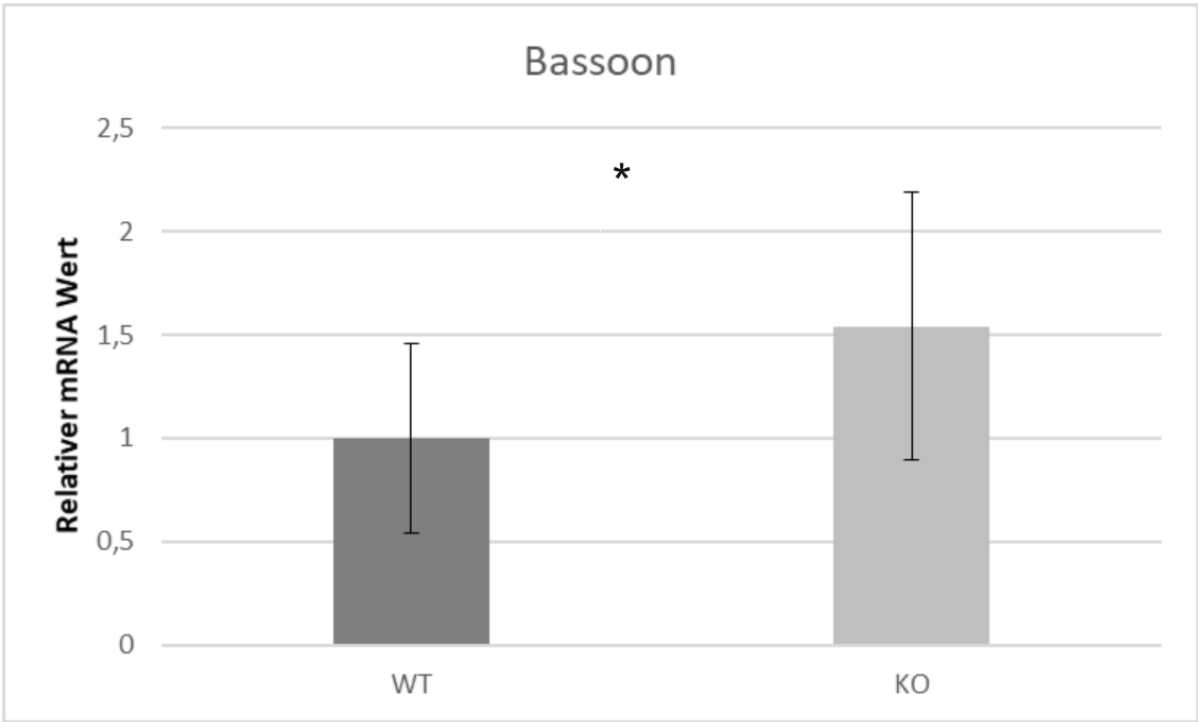


ABBILDUNG 19: QUANTITATIVE ECHTZEIT PCR FÜR BASSOON MIT ISOLIERTER MRNA AUS DER AMYGDALA VON SPRED2 KO-MÄUSEN (N=11) UND WT-KONTROLLE (N=11). * P<0,05.

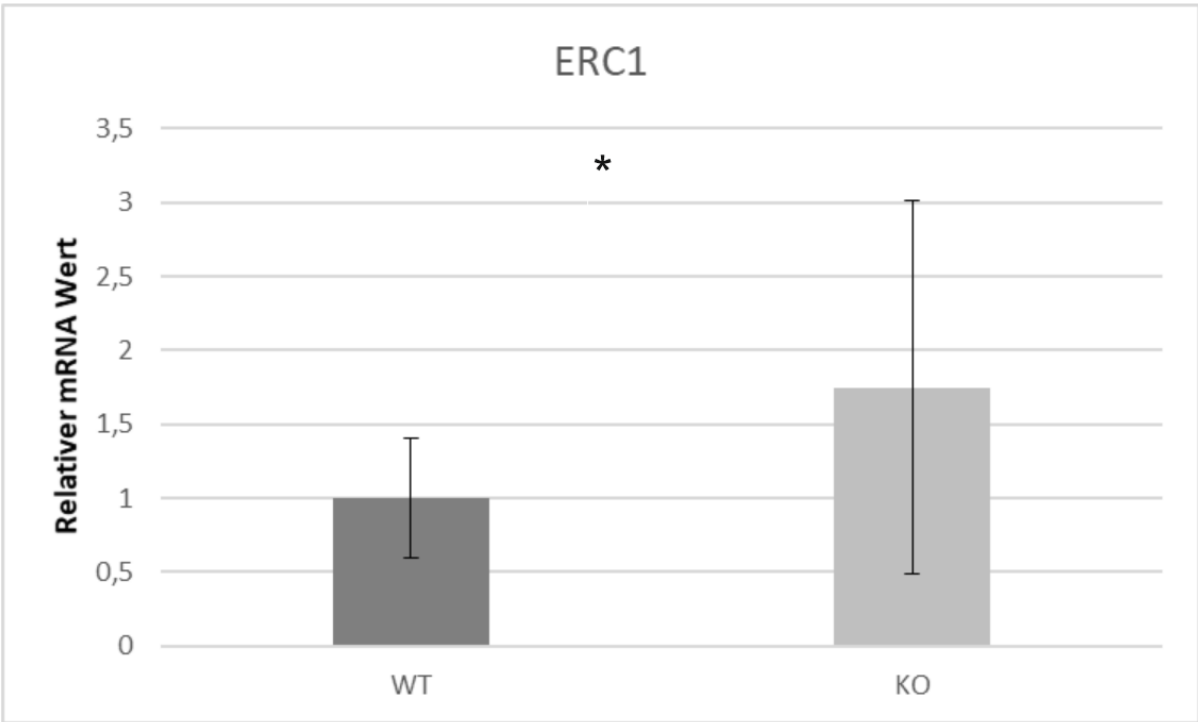


ABBILDUNG 20: QUANTITATIVE ECHTZEIT PCR FÜR ERC1 MIT ISOLIERTER MRNA AUS DER AMYGDALA VON SPRED2 KO-MÄUSEN (N=11) UND WT-KONTROLLEN (N=11). * P<0,05.

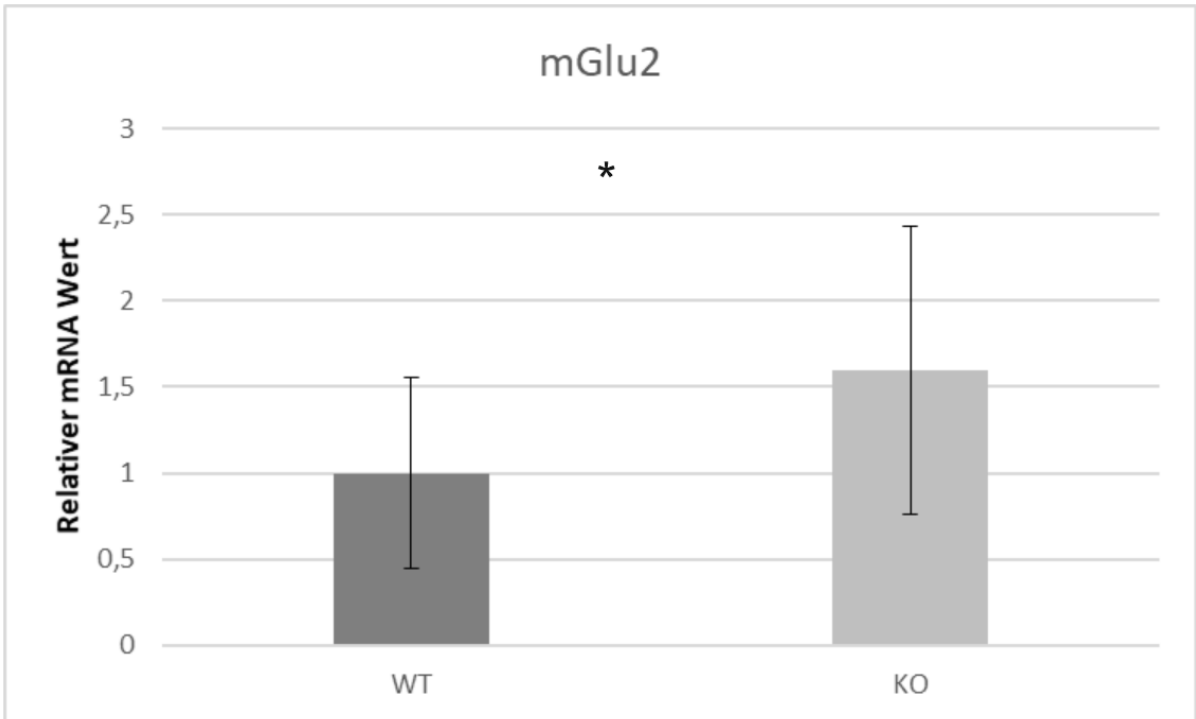


ABBILDUNG 21: QUANTITATIVE ECHTZEIT PCR FÜR DEN METABOTROPEN GLUTAMATREZEPTOR 2 MIT ISOLIERTER MRNA AUS DER AMYGDALA VON SPRED2 KO-MÄUSEN (N=11) UND WT-KONTROLLEN (N=11). * P<0,05.

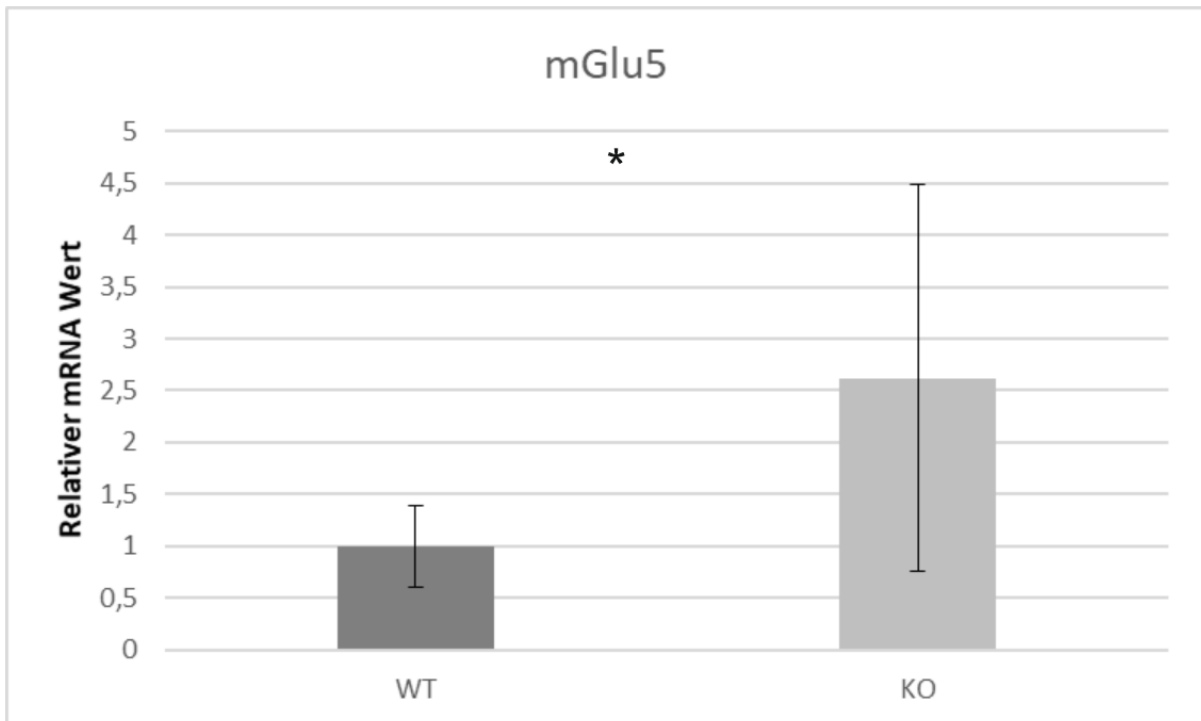


ABBILDUNG 22: QUANTITATIVE ECHTZEIT PCR FÜR DEN METABOTROPEN GLUTAMATREZEPTOR 5 MIT ISOLIERTER MRNA AUS DER AMYGDALA VON SPRED2 KO-MÄUSEN (N=11) UND WT-KONTROLLEN (N=11). * P<0,05.

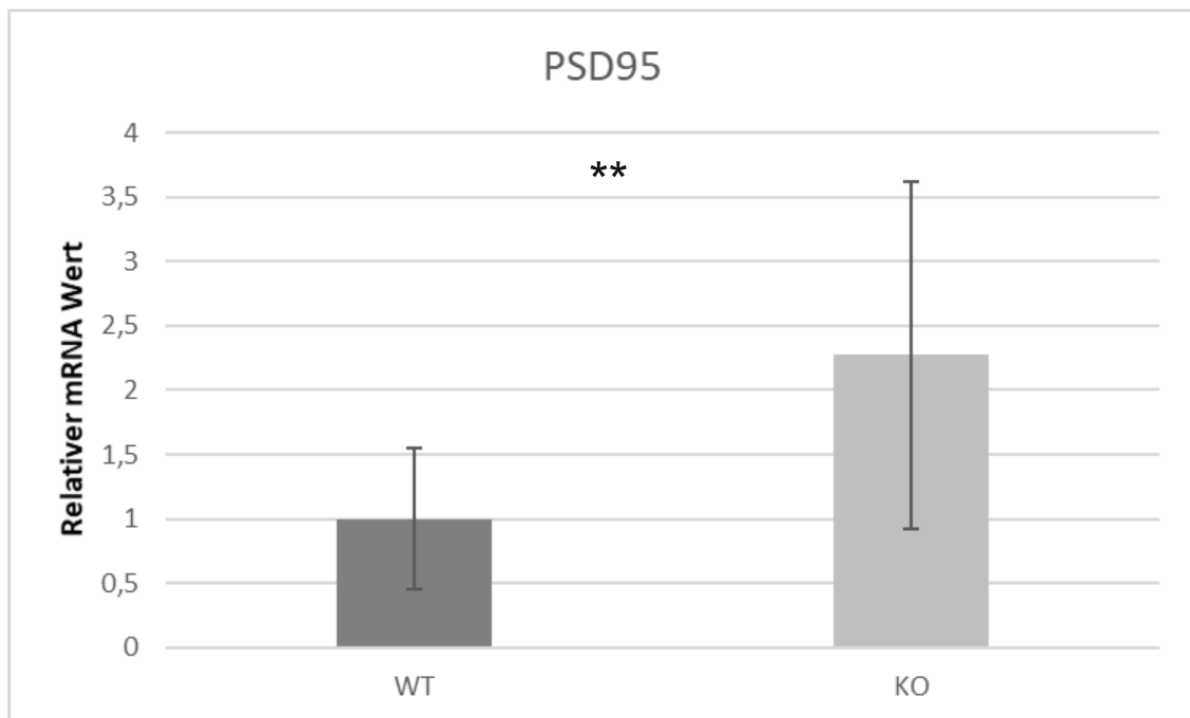


ABBILDUNG 23: QUANTITATIVE ECHTZEIT PCR FÜR DAS PROTEIN PSD95 MIT ISOLIERTER MRNA AUS DER AMYGDALA VON SPRED2 KO-MÄUSEN (N=11) UND WT-KONTROLLEN (N=11). ** P<0,01.

In dem Fall der postsynaptischen Proteine PSD95 sowie metabotropen Glutamatrezeptor 5 konnte ebenfalls eine Hochregulation der mRNA Werte nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte durch die RT-PCR Methode festgestellt werden, dass die Protein-Dysregulation, die in den Western Blots beobachtet wurde, mit einer Alteration in der Gen-Expression der selektierten Gene zusammenhängt. Da das Proteingehalt mit dem mRNA-Gehalt in gleicher Weise verändert ist, ist von einer Protein-Dysregulation auf transkriptioneller Ebene auszugehen. Eine Ausnahme zu dieser Aussage ist Bassoon, bei dem die Ergebnisse nicht übereinstimmten.

4. DISKUSSION

4.1. OCD VERHALTEN BEI SPRED2 KO-MÄUSEN

Zwangsstörungen sind ein relativ häufiges und heterogenes Krankheitsbild in Menschen wie auch bei Tieren. Vieles ist über die Ursachen und Pathomechanismen dieser psychiatrischen Störung unklar, sie sind aber Fokus intensiver wissenschaftlicher Forschung. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, spielen Umwelt- sowie genetische Faktoren eine wichtige Rolle in der Entstehung von Zwangserkrankungen. In dem Fall der SPRED2 KO-Mäuse wurden klassische Symptome von einem zwangsgestörten Verhalten beobachtet. Diese wurden im Rahmen von gründlicher Forschung der phänotypischen Veränderung von SPRED2 KO-Mäusen gegenüber WT-Tieren beobachtet. Unter anderem wurde eine exzessive und pathologische Selbstpflege der Mäuse festgestellt, die zu ausgeprägten Hautverletzungen führte (Ullrich, Weber et al. 2018). Ähnliche Verhaltensmuster sind bei OCD erkrankten Menschen mit einem z.B. Putzzwang zu sehen. Die SPRED2 KO-Tiere zeigten allerdings im Rahmen von Verhaltensstudien, kein vermehrtes ängstliches Verhalten, sondern eher ein weniger besorgtes Auftreten als die WT-Mäuse. Eine psychomotorische Verlangsamung in den Mäusen sowie Lethargie und verminderte Motivation, was auf eine depressive Störung hinweisen kann, wurde auch festgestellt (Ullrich, Weber et al. 2018). Zwangsstörungen in Menschen sind öfters mit einer Reihe an Komorbiditäten vergesellschaftet, wie Angst oder Depression, was auch bei SPRED2 defizienten Mäusen zutreffen könnte. Diese Tatsache würde die reduzierte Beweglichkeit und die beobachtete Antriebslosigkeit der KO-Mäuse erklären. Eine zweite wichtige Eigenschaft bei Zwangsstörungen oder OCD-Verhalten ist die Anfälligkeit für Stress, was bedeutet, dass Stressfaktoren eine Zunahme der Symptome triggern kann. Dementsprechend kann man zum Beispiel, bei Patienten mit Zwangsstörungen einen erhöhten Stresshormonspiegel, wie Corticotropin-releasing Hormone, Adrenocorticotropin und Corticosteron, nachweisen (Altemus, Pigott et al. 1992, Kluge, Schussler et al. 2007).

4.2. OCD-ÄHNLICHES VERHALTEN DURCH ERHÖHTE AKTIVITÄT DES TRKB/BDNF-ERK SIGNALWEGS IN SPRED2 KO-MÄUSEN

Die Therapie von Zwangsstörungen ist vielfältig und von dem Schweregrad der Erkrankung abhängig. Die Therapieoptionen erstrecken sich von Psychotherapie über Psychopharmaka bis zu der invasiven Neurostimulation mittels tiefer Hirnstimulation. Als Mittel der ersten Wahl in der pharmakologischen Therapie kommen die Serotonin-Wiederaufnahmehemmer zum Einsatz und aus diesem Grund wird in der Forschung von Zwangsstörungen die Entschlüsselung des Serotonin-Transporters (unter anderen) als besonderes Ziel gesetzt. Im Rahmen der Erforschung von Serotonin-verwandten Polymorphismen wurde in einer Metaanalyse zum Thema Zwangsstörungen, die Implikation von dem BDNF-Wachstumsfaktor in dessen Entstehung diskutiert (Taylor 2013). Der BDNF Wachstumsfaktor ist ein fundamentaler Baustein innerhalb des zentralen Nervensystems und für die neuronale Gentranskription, Neurogenese sowie neuronale Differenzierung verantwortlich. Eine Veränderung in der Aktivität des BDNF Wachstumsfaktors bedeutet eine Modifizierung der neuronalen Morphologie und eine Dysregulation, unter anderem von prä- und postsynaptischen Proteinen sowie Veränderung der synaptischen Erregung in verschiedenen Arealen des zentralen Nervensystems, wie zum Beispiel der lateralen Amygdala.

In den SPRED2 KO-Mausversuchen wurden bei den Tieren mit einem OCD-ähnlichen Verhalten eine Hyperaktivität des TrKB/ERK-MAPK Signalwegs, Interaktionspartner des BDNFs, nachgewiesen (Ullrich, Weber et al. 2018). In der Amygdala von SPRED2 KO-Mäusen wurde nicht nur eine Überexpression von TrKB festgestellt, sondern ebenfalls eine erhöhte Phosphorylierung des Rezeptors (besonders des Tyrosinrest 515/ Y515), welches den Ras/ERK-MAPK Signalweg aktiviert (Huang and Reichardt 2003). Diese Ergebnisse belegen, dass der Ras/ERK-MAPK Signalweg spezifisch durch den aktivierten TrKB in SPRED2 KO-Tieren aktiviert wird. Infolgedessen ist die Aktivität von Ras und die Phosphorylierung von ERK in der Amygdala von SPRED defizienten Tieren erhöht. In den Messungen des BDNF Spiegels in der Amygdala von SPRED2 KO-Mäusen konnte keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (Ullrich, Weber et al. 2018), was die Hypothese unterstützt, dass in diesem Fall eine Überaktivierung des Ras/ERK-MAPK

Signalwegs nicht durch BDNF verursacht wird, sondern durch den Verlust einer SPRED2 vermittelte Inhibierung.

Desweiteren wurde nachgewiesen, dass SPRED2 durch eine BDNF-bedingte Aktivierung von TrkB phosphoryliert wird. TrkB wird dann durch Autophosphorylierung aktiviert und aktiviert wiederum dadurch verschiedene Zielelemente unterhalb des Signaltransduktionswegs durch Phosphorylierung (Ullrich, Weber et al. 2018). Die Phosphorylierung von SPRED2 ist funktionell nötig für die Regulation der hemmenden Wirkung und Schutz des Proteins vor proteasomalen Abbau (Quintanar-Audelo, Yusoff et al. 2011, Meng, Zhang et al. 2012). Man geht davon aus, dass die TrkB-abhängige Tyrosin-Phosphorylierung von SPRED2 als präventiver Vorgang des Proteinabbaus dient und die Suppression des BDNF- und TrkB-abhängigen Ras/ERK Signaltransduktionwegs ermöglicht. Dieser Mechanismus kann die inhibitorische Funktion von SPRED2 auf den TrkB/BDNF-ERK-Signalweg ermöglichen und für ein stabiles und gesundes Verhalten der Tiere sorgen.

Der BDNF/TrkB Signalweg ist an vielen Phasen der neuronalen Entwicklung und in der Pathogenese von multiplen neuropsychiatrischen Erkrankungen beteiligt (Ikegame, Bundo et al. 2013). Bis jetzt existieren nur wenige deskriptive Studien über die Verbindung zwischen dem BDNF/TrkB Signalweg und OCD (Hall, Dhillia et al. 2003, Hemmings, Kinnear et al. 2008) oder ähnlichen Erkrankungen in Menschen oder Mäusen. Zusätzlich ist ERK ein wichtiger Regulator für die Zellproliferation und befindet sich mutmaßlich in allen Zellen und Geweben des Körpers. In dem Gehirn spielt ERK eine wichtige Rolle in der Transkription von Plastizität-verwandten Genen, reguliert die Freisetzung von synaptischen Transmittern und ist dadurch an Lernprozessen und der Bildung von Gedächtnis beteiligt (Kelleher, Govindarajan et al. 2004, Cui, Costa et al. 2008, Giese and Mizuno 2013). Es ist bis jetzt ebenfalls wenig über die Verbindung zwischen ERK und psychiatrischen Erkrankungen, vor allem in OCD- oder Zwangsstörungen, bekannt. In dem Mausmodell konnte ein Mechanismus erkannt werden, wie eine SPRED2-Defizienz zu einer erhöhten Aktivierung von TrkB und Signalübertragung kommt, welche durch die gesteigerte Aktivierung von Ras und ERK-Phosphorylierung verursacht wird und ein OCD-ähnliches Verhalten in den Tieren induziert (Ullrich, Weber et al. 2018).

Die Beteiligung des TrkB/ERK-MAPK Signalweges in der Entstehung von OCD-Störungen wurde durch den Einsatz des Pharmazeutikums Selumetinib, ein MEK1/2 und spezifischer Blocker der Ras/ERK-MAPK Aktivität, experimentell gezeigt. Das Pharmazeutikum linderte die selbstverursachten Wunden der SPRED KO-Mäuse, die durch zwanghaftes Putzen entstanden sind (Ullrich, Weber et al. 2018).

Außerdem wurde nachgewiesen, dass eine gesteigerte Aktivität des Ras/ERK/MAPK Signalwegs in der Entwicklung von Rasopathien und OCD-ähnlichen Störungen sowie in der Pathogenese von Malignomen eine Rolle spielt (Carvajal, Sosman et al. 2014, Bartholomeusz, Xie et al. 2015). Als betroffene Hirnregionen wurden die thalamo-amygdaloidalen und cortico-striatalen Synapsen identifiziert (Ullrich, Weber et al. 2018). In der Amygdala von SPRED defizienten Tieren ist mutmaßlich der Auslöser des OCD-ähnlichen Verhaltens, eine Hyperaktivität in dem BDNF/TrkB Signalweg, als Folge des Verlustes einer SPRED2 vermittelten Inhibierung.

4.3. VERÄNDERUNGEN IN DER SYNAPTISCHEN AKTIVITÄT UND - MORPHOLOGIE BEI SPRED2 DEFIZIENZ

Gezielte elektrophysiologische Untersuchungen bei SPRED2 defizienten Mäusen zeigten Alterationen auf prä- und postsynaptischer Ebene. In diesen Untersuchungen wurde eine vermehrte synaptische Aktivität zwischen der Amygdala und dem Striatum nachgewiesen (Ullrich, Weber et al. 2018). Um diese Veränderungen weiter zu differenzieren, wurde in dieser Arbeit die umfassende Analyse der Expression von gezielten Proteinen auf prä- sowie postsynaptischer Ebene untersucht. Passend zu den elektrophysiologischen Ergebnissen wurde eine veränderte Expression der präsynaptischen und in der aktiven Zone lokalisierten Proteinen, ERC1 und Bassoon (unter anderen), mittels Western Blot festgestellt. Diese Proteine sind wichtige Faktoren für die Integrität der Strukturen und tragen zur Freisetzung von präsynaptischen Neurotransmittern in den synaptischen Spalt bei (Sudhof 2012). ERC1, ein Homolog des Bruchpilot-Proteins der Drosophila, ist für die Aufrechterhaltung von der Ca^{2+} -Kanaldichte und die synaptische Übertragung nach jeder Stimulation zuständig. Im Einklang mit den geschilderten Ergebnissen, besteht bei SPRED KO-Mäusen eine Überexpression dieses Proteins, was die gesteigerte

Erregbarkeit der amygdaloidalen Synapsen in diesen Tieren erklärt. Passend zu den Veränderungen in den synaptischen Übertragungen, wurde außerdem eine Dysregulation in der Expression von Glutamat-Rezeptoren in der Amygdala festgestellt. Man beschränkte sich auf die metabolischen Glutamat-Rezeptoren, mGluR5 und mGluR2, die ebenfalls eine erhöhte Proteinexpression in den durchgeführten Western Blots zeigten. Der mGluR2 befindet sich hauptsächlich in der präsynaptischen Membran, kommt aber auf postsynaptischer Ebene auch vor. mGluR2 übt eine inhibierende Wirkung auf die synaptische Erregbarkeit aus, hingegen befindet sich mGluR5 ausschließlich in der postsynaptischen Membran und wirkt positiv auf die Erregung (Benarroch 2008). Eine Fehlfunktion der metabolischen Glutamat-Rezeptoren wird mit verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen und Angststörungen assoziiert. Es besteht deswegen eine denkbare Kausalität zwischen der erhöhten Expression von mGluR5 in SPRED2 defizienten Mäusen und dem OCD-ähnlichen Verhalten und der gesteigerten synaptischen Übertragungen. Auf der anderen Seite könnte die hochregulierte Expression von mGluR2 eine gegenregulierende Maßnahme sein und für das, in den Verhaltenstest festgestellte, weniger besorgte Verhalten der KO-Tiere verantwortlich sein. Die Proteinexpression von dem Protein PSD95 wurde ebenfalls in beiden Mausgruppen untersucht, hier zeigte sich auch eine gesteigerte Expression des Proteins bei den KO-Mäusen. PSD95 ist ein Haupt-Gerüstprotein auf der postsynaptischen Seite von glutamatergen Synapsen und bildet ein Cluster mit ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren (Tu, Xiao et al. 1999). Außerdem wurde die Proteinexpression der präsynaptischen Proteine Rab3A und Rab6 untersucht. Beide Proteine gehören zu der onkogenen RAS-Familie und den GTP-Bindungsproteinen und spielen eine zentrale Rolle in der Regulierung von Exozytose und Protein-Sekretion in der Synapse. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und SPRED2 KO-Mäusen nachgewiesen werden. Wichtig für die synaptische Erregbarkeit ist der Transport von Neurotransmittern in den Neuronen. α - und β -Tubulin sind wichtige Bestandteile des Cytoskeletts und sind an dem Transport und der Verteilung von Organellen und Neurotransmittern beteiligt. Untersuchungen der Proteinexpression dieser Proteine zeigten unveränderte Proteinexpression zwischen beiden Untersuchungsgruppen. Um diese Veränderungen in der Proteinexpression von den synaptischen Proteinen besser einordnen zu können, wurde nach möglichen Veränderungen auf transkriptioneller Ebene gesucht. Mittels RT-PCR konnte eine

Dysregulation in der mRNA nachgewiesen werden. Passend zu der präsynaptischen Hochregulation von PSD95 und mGluR5 bei den KO-Tieren, wurde eine Erhöhung in der relativen mRNA dieser Proteine nachgewiesen. Auf präsynaptischer Ebene konnte ebenfalls eine Erhöhung der relativen mRNAs bei den Proteinen ERC1 und mGluR2, passend zu den Ergebnissen des Western Blots, nachgewiesen werden. In dem Fall von Bassoon, konnte keine korrelierende mRNA-Erhöhung festgestellt werden, was gegen eine transkriptionelle Ursache der Dysregulation und für einen noch unbekanntem Mechanismus spricht.

Die Dysregulation in der Proteinexpression von regulatorischen Proteinen in der präsynaptischen aktiven Zone und von Proteinen, die für Neurotransmitter-Freisetzung mitverantwortlich sind, wie Bassoon, ERC1 und mGluR2, korrelieren mit nachgewiesenen elektrophysiologischen Veränderungen in der Amygdala. Die Dysregulation von Proteinen in der Postsynapse, wie PSD95 und mGluR5, korrelierte mit der beobachteten tendenziell erhöhten *Branch order*-abhängigen Anzahl der *Spines* von Neuronen der lateralen Amygdala in SPRED2 defizienten Mäusen (Ullrich, Weber et al. 2018). Die veränderte Aktivität des TrkB/ERK-MAPK Signalwegs verursacht die Dysregulation der oben genannten Proteine und beeinflusst die Regulation der *Spine*-Morphologie in der Amygdala und im Hypocampus (Bennett and Lagopoulos 2014).

Die dendritischen *Spines* oder Dornenfortsätze sind feine Vorwölbungen der Oberfläche der Nervenzellen, die für die Aufnahme und Übertragung von Erregungen zuständig sind. Eine erhöhte Übertragung von exzitatorischen Reizen zwischen Thalamus und lateralen Amygdala in SPRED2 KO-Mäusen und eine reduzierte Erregungsschwelle wurden nachgewiesen. Deshalb könnte eine erhöhte *Spines*-Anzahl und -Dichte bei diesen Tieren auf eine strukturelle Manifestation der gesteigerten Erregbarkeit der thalamo-amygdaloidalen Synapsen hinweisen. Außerdem könnte das zu der generellen Hyperaktivität der Amygdala beitragen, was ein Merkmal von OCD und verschiedenen Angststörungen ist (Breiter, Rauch et al. 1996, Menzies, Chamberlain et al. 2008, Wood and Ahmari 2015). Obwohl die SPRED2 KO-Mäuse keine vermehrte Ängstlichkeit in den Standardtests gezeigt haben, ist ein angstbedingtes Verhalten bei den Tieren messbar, wie die Erhöhung in dem Stresshormonspiegel, die durch eine Hyperaktivität in der Hypothalamus-

Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (Ullrich, Bundschu et al. 2011) verursacht wird, sowie die reduzierte Beweglichkeit der Tiere. Dementsprechend besitzt die Amygdala eine hohe Dichte an CRH- und Glucocorticoid-Rezeptoren, und der Einfluss von Stress kann die Aktivierung der Amygdala und den Anstieg in der *Spine*-Dichte verursachen (Davis and Whalen 2001, Roozendaal, McEwen et al. 2009, Nietzer, Bonn et al. 2011). Die Veränderungen in der synaptischen Erregbarkeit in der Amygdala tragen bei den SPRED KO-Mäuse zu der phänotypischen Ausprägung der Tiere bei, und ist das Ergebnis von prä- und postsynaptischen Einflüssen. Die Veränderungen in der synaptischen Übertragung zwischen Thalamus und Amygdala entstehen aus einer gestörten Proteinexpression, als Resultat von modifizierter Proteinexpression, was als Folge eine SPRED2-Defizienz bedingte Hochregulierung des TrkB/ERK Signalwegs verursacht.

Eine Dysregulation des BDNF/TrkB/ERK-MAPK Signalwegs verursacht Veränderungen in den prä- und postsynaptischen mRNAs und in der Proteinexpression sowie in der thalamo-amygdaloidalen Signalübertragung. Sowohl das SSRI Fluoxetine als auch der Ras/ERK Signalweg Inhibitor Selumetinib konnten das zwanghafte Verhalten der Mäuse reduzieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass SPRED2 nicht nur ein wichtiger Faktor in der Pathogenese von OCD ist, sondern auch als neuer Regulator des BDNF/TrkB Signalweges und der synaptischen Signalübertragung in verschiedenen Hirnregionen fungiert (Ullrich, Weber et al. 2018). SPRED2 scheint als vielversprechendes Ziel für die weitere Forschung der Hirnfunktion, neuropsychiatrischer und neurodegenerativer Erkrankungen.

4.4. DYSREGULATION DES CSTC-REGELKREISES BEI SPRED2 KO-MÄUSEN

Veränderungen in der Erregbarkeit in Synapsen des kortiko-striatalen und thalamo-amygdaloidalen Kreises tragen zu der Pathogenese von Zwangsstörungen oder OCD bei. In verschiedenen Studien mit Menschen mit OCD-Symptomen oder OCD-ähnlichen Symptomen sowie mutierten Mäusen (SAPAP3/SLITRK5) konnte eine

Dysregulation innerhalb des CSTC-Regelkreises (cortico-striatal-thalamo-corticalen) festgestellt werden (Welch, Lu et al. 2007, Shmelkov, Hormigo et al. 2010). In den SPRED2 KO-Mäusen wurde eine erhöhte synaptische Übertragung der kortiko-striatalen Synapsen nachgewiesen (Ullrich, Weber et al. 2018). Passend zu diesen Ergebnissen, konnte durch wiederholte kortiko-striatale Stimulation das OCD-ähnliche und zwanghafte Putzverhalten der Mäuse provoziert werden (Ahmari, Spellman et al. 2013). Daraus lässt sich schließen, dass eine Hyperaktivität der kortiko-striatalen Synapsen im kausalen Zusammenhang für das OCD-ähnliche Verhalten steht und dass SPRED2 eine zentrale Rolle in der Regulation in dem kortiko-striatalen Regelkreis spielt.

Interessanterweise wurde außerdem eine vermehrte synaptische Erregbarkeit in den thalamo-amygdaloidalen Synapsen in SPRED2 defizienten Mäusen nachgewiesen. Nach aktuellem Wissen ist eine Dysfunktion des CSTC-Regelkreises die meist akzeptierte neurobiologische Erklärung für die Entstehung von OCD. Die zugrundeliegende Pathologie scheint sich aber nicht auf die orbitofronto-striatalen Regionen zu beschränken. Verschiedene Arbeiten belegen, dass der Hippocampus, Gyrus cinguli und die Amygdala zu der Physiopathologie der OCD beitragen (Menzies, Chamberlain et al. 2008, Milad and Rauch 2012, Wood and Ahmari 2015).

Der basolaterale Anteil der Amygdala spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Verarbeitung von Emotionen und in verschiedenen Aspekten der Wahrnehmung. Diese Verbindung zwischen beiden Hirnarealen ist in dem Fall von OCD beeinträchtigt, was eine Veränderung in der Funktionalität bedeutet und das OCD Verhalten begünstigt. Eine Dysregulation in der Amygdala-Aktivität kann zusätzlich das Verhalten affektiv beeinflussen und zu einem zwanghaften Verhalten beitragen. Man kann aus diesen Ergebnissen zu der Schlussfolgerung kommen, dass eine veränderte Aktivität des CSTC-Regelkreises bei OCD ihren Ursprung in der vorgeschalteten Amygdala hat, und dass SPRED2 ein wichtiger Modulator in der synaptischen Übertragung zwischen Thalamus und lateralen Amygdala ist.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden gezielte Proteinveränderungen auf synaptischer Ebene näher untersucht, die im Rahmen einer SPRED2-Defizienz auftreten. SPRED2 als wichtiger Regulator der Ras/ERK-MAPK ist in verschiedenen Geweben des Körpers vorhanden, besonders im Zentralnervensystem konnte eine erhöhte Proteinexpression nachgewiesen werden. Hier spielt SPRED2 eine zentrale Rolle in der Neurogenese als Steuerung der ERK-abhängigen neuronalen Stammzell-Proliferation und in der Aufrechterhaltung der Keimzone. Außerdem übt es eine inhibierende Wirkung auf viele mitogene Signale aus, wie z.B. verschiedene Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine sowie auf dem BDNF/TrkB-ERK-Signalweg. Der Wachstumsfaktor BDNF als wichtiger neurotropher Faktor ist an dem Überleben, der Differenzierung und dem Wachstum von Neuronen beteiligt und es wurde bereits seine Implikation in der Entstehung von Zwangsstörungen demonstriert.

Unter Verwendung des Tiermodells, konnten SPRED2 KO- und WT-Mäuse auf spezifische Weise untersucht und miteinander verglichen werden. Die Generierung der SPRED2 KO-Mäuse gelangte aus der embryonalen Stammzelllinie XB228, die mit einem Gene-Trap Vektor in das SPRED2-Gen versehen wurde. Um die Expression von SPRED2 in dem Gehirn der Mäuse genauer zu lokalisieren, wurden koronale Schnitte der Gehirne von SPRED2-heterozygoten Mäusen durchgeführt und mittels X-Gal Färbung gefärbt. Vor allem im Kortex, Hippocampus, Amygdala und Striatum konnte eine erhöhte Expression des Proteins nachgewiesen und als Ziel der weiteren Untersuchungen festgelegt werden. Durch weitere Verhaltenstests konnte bei den KO-Tieren ein zwanghaftes Verhalten nachgewiesen werden, worauf elektrophysiologische Untersuchungen bei den Versuchstieren durchgeführt wurden. Hier konnten Veränderungen in der synaptischen Übertragung zwischen Thalamus und Amygdala festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde die Untersuchung der Synapsen-Morphologie im Bereich der Amygdala als Ziel dieser Arbeit festgelegt. Dafür wurden SPRED2 KO- und WT-Mäusen im Alter zwischen 11 und 20 Monaten verwendet. Die Gehirne der Tiere wurden seziiert, die Amygdala-Region freipräpariert

und Lysate entwickelt. Die Lysate wurden auf bestimmte prä- und postsynaptische Proteine mittels Western Blot untersucht, wo sich signifikante Veränderungen in der Proteinkonzentration zwischen KO- und WT-Mäusen zeigten. Im Fall der präsynaptischen Proteine, bot der metabotropen Glutamatrezeptors 2 und ERC1 eine vermehrte Konzentration in den KO-Mäusen. Im Gegensatz dazu bot Bassoon eine verminderte Expression und Rab3A sowie Rab6 keinen signifikanten Unterschied in der relativen Proteinexpression. Bei den postsynaptischen Proteinen, PSD95 und dem metabotropen Glutamatrezeptor 5, zeigte sich eine Hochregulierung in den SPRED2 KO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Versuchstieren. Die Strukturproteine α - und β -Tubulin, zeigten keine signifikante Veränderung zwischen den zwei Untersuchungsgruppen. Um eine mögliche Protein-Dysregulation auf transkriptioneller Ebene zwischen SPRED2 KO- und WT-Mäusen nachweisen zu können, wurden quantitativen RT-PCRs mit mRNA aus der Amygdala der KO- und WT-Mäuse durchgeführt. Bei den präsynaptischen Proteinen ERC1, metabotropen Glutamatrezeptor 2 sowie den postsynaptischen Proteinen PSD95 und metabotropen Glutamatrezeptor 5 konnte eine Erhöhung in den relativen mRNA-Werten festgestellt werden, passend zu den Ergebnissen des Western Blots. Diese Veränderungen können durch die verminderte Inhibition des BDNF/TrkB-ERK-Signalwegs bei den SPRED2 KO-Mäusen und die dadurch verursachte vermehrte Proteinexpression in der Amygdala erklärt werden. Die veränderte Proteinexpression in der prä- und postsynaptischen Membran kann die Hyperaktivität der lateralen Amygdala in den KO-Mäusen verursachen. Diese neurophysiologischen Veränderungen können als möglichen Ursprung des zwanghaften Verhaltens der SPRED2 KO-Mäusen diskutiert werden und als Ziel für die weitere Forschung von Zwangsstörungen und deren Therapie in Menschen gesetzt werden.

6.

LITERATURVERZEICHNIS

Ahmari, S. E., T. Spellman, N. L. Douglass, M. A. Kheirbek, H. B. Simpson, K. Deisseroth, J. A. Gordon and R. Hen (2013). "Repeated cortico-striatal stimulation generates persistent OCD-like behavior." Science **340**(6137): 1234-1239.

Altemus, M., T. Pigott, K. T. Kalogeras, M. Demitrack, B. Dubbert, D. L. Murphy and P. W. Gold (1992). "Abnormalities in the regulation of vasopressin and corticotropin releasing factor secretion in obsessive-compulsive disorder." Arch Gen Psychiatry **49**(1): 9-20.

Autry, A. E. and L. M. Monteggia (2012). "Brain-derived neurotrophic factor and neuropsychiatric disorders." Pharmacol Rev **64**(2): 238-258.

Bartholomeusz, C., X. Xie, M. K. Pitner, K. Kondo, A. Dadbin, J. Lee, H. Saso, P. D. Smith, K. N. Dalby and N. T. Ueno (2015). "MEK Inhibitor Selumetinib (AZD6244; ARRY-142886) Prevents Lung Metastasis in a Triple-Negative Breast Cancer Xenograft Model." Mol Cancer Ther **14**(12): 2773-2781.

Bello, O. D., M. N. Zanetti, L. S. Mayorga and M. A. Michaut (2012). "RIM, Munc13, and Rab3A interplay in acrosomal exocytosis." Exp Cell Res **318**(5): 478-488.

Benarroch, E. E. (2008). "Metabotropic glutamate receptors: synaptic modulators and therapeutic targets for neurologic disease." Neurology **70**(12): 964-968.

Bennett, M. R. and J. Lagopoulos (2014). "Stress and trauma: BDNF control of dendritic-spine formation and regression." Prog Neurobiol **112**: 80-99.

Bos, J. L., H. Rehmann and A. Wittinghofer (2007). "GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins." Cell **129**(5): 865-877.

Breiter, H. C., S. L. Rauch, K. K. Kwong, J. R. Baker, R. M. Weisskoff, D. N. Kennedy, A. D. Kendrick, T. L. Davis, A. Jiang, M. S. Cohen, C. E. Stern, J. W. Belliveau, L. Baer, R. L. O'Sullivan, C. R. Savage, M. A. Jenike and B. R. Rosen (1996). "Functional magnetic resonance imaging of symptom provocation in obsessive-compulsive disorder." Arch Gen Psychiatry **53**(7): 595-606.

Browne, H. A., S. L. Gair, J. M. Scharf and D. E. Grice (2014). "Genetics of obsessive-compulsive disorder and related disorders." Psychiatr Clin North Am **37**(3): 319-335.

Bundschu, K., S. Gattenlohner, K. P. Knobloch, U. Walter and K. Schuh (2006). "Tissue-specific Spred-2 promoter activity characterized by a gene trap approach." Gene Expr Patterns **6**(3): 247-255.

Bundschu, K., K. P. Knobloch, M. Ullrich, T. Schinke, M. Amling, C. M. Engelhardt, T. Renne, U. Walter and K. Schuh (2005). "Gene disruption of Spred-2 causes dwarfism." J Biol Chem **280**(31): 28572-28580.

Bundschu, K., U. Walter and K. Schuh (2007). "Getting a first clue about SPRED functions." Bioessays **29**(9): 897-907.

Carvajal, R. D., J. A. Sosman, J. F. Quevedo, M. M. Milhem, A. M. Joshua, R. R. Kudchadkar, G. P. Linette, T. F. Gajewski, J. Lutzky, D. H. Lawson, C. D. Lao, P. J. Flynn, M. R. Albertini, T. Sato, K. Lewis, A. Doyle, K. Ancell, K. S. Panageas, M. Bluth, C. Hedvat, J. Erinjeri, G. Ambrosini, B. Marr, D. H. Abramson, M. A. Dickson, J. D. Wolchok, P. B. Chapman and G. K. Schwartz (2014). "Effect of selumetinib vs chemotherapy on progression-free survival in uveal melanoma: a randomized clinical trial." JAMA **311**(23): 2397-2405.

Chardin, P., J. H. Camonis, N. W. Gale, L. van Aelst, J. Schlessinger, M. H. Wigler and D. Bar-Sagi (1993). "Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2." Science **260**(5112): 1338-1343.

Crews, C. M., A. Alessandrini and R. L. Erikson (1992). "The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product." Science **258**(5081): 478-480.

Cui, Y., R. M. Costa, G. G. Murphy, Y. Elgersma, Y. Zhu, D. H. Gutmann, L. F. Parada, I. Mody and A. J. Silva (2008). "Neurofibromin regulation of ERK signaling modulates GABA release and learning." Cell **135**(3): 549-560.

Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton and P. A. Futreal (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-954.

Davis, M. (1992). "The role of the amygdala in fear and anxiety." Annu Rev Neurosci **15**: 353-375.

Davis, M. and P. J. Whalen (2001). "The amygdala: vigilance and emotion." Mol Psychiatry **6**(1): 13-34.

Dondzillo, A., K. Satzler, H. Horstmann, W. D. Altmann, E. D. Gundelfinger and T. Kuner (2010). "Targeted three-dimensional immunohistochemistry reveals localization of presynaptic proteins Bassoon and Piccolo in the rat calyx of Held before and after the onset of hearing." J Comp Neurol **518**(7): 1008-1029.

Egan, S. E., B. W. Giddings, M. W. Brooks, L. Buday, A. M. Sizeland and R. A. Weinberg (1993). "Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation." Nature **363**(6424): 45-51.

Engelhardt, C. M., K. Bundschu, M. Messerschmitt, T. Renne, U. Walter, M. Reinhard and K. Schuh (2004). "Expression and subcellular localization of Spred proteins in mouse and human tissues." Histochem Cell Biol **122**(6): 527-538.

Giese, K. P. and K. Mizuno (2013). "The roles of protein kinases in learning and memory." Learn Mem **20**(10): 540-552.

Guiton, M., F. J. Gunn-Moore, T. N. Stitt, G. D. Yancopoulos and J. M. Tavares (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**(48): 30370-30377.

Hacohen, N., S. Kramer, D. Sutherland, Y. Hiromi and M. A. Krasnow (1998). "sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways." Cell **92**(2): 253-263.

Hadari, Y. R., H. Kouhara, I. Lax and J. Schlessinger (1998). "Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation." Mol Cell Biol **18**(7): 3966-3973.

Hall, D., A. Dhillia, A. Charalambous, J. A. Gogos and M. Karayiorgou (2003). "Sequence variants of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene are strongly associated with obsessive-compulsive disorder." Am J Hum Genet **73**(2): 370-376.

Hancock, J. F., A. I. Magee, J. E. Childs and C. J. Marshall (1989). "All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated." Cell **57**(7): 1167-1177.

Haystead, T. A., P. Dent, J. Wu, C. M. Haystead and T. W. Sturgill (1992). "Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase." FEBS Lett **306**(1): 17-22.

Hemmings, S. M., C. J. Kinnear, L. Van der Merwe, C. Lochner, V. A. Corfield, J. C. Moolman-Smook and D. J. Stein (2008). "Investigating the role of the brain-derived

neurotrophic factor (BDNF) val66met variant in obsessive-compulsive disorder (OCD)." World J Biol Psychiatry **9**(2): 126-134.

Holgado-Madruga, M., D. R. Emlet, D. K. Moscatello, A. K. Godwin and A. J. Wong (1996). "A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling." Nature **379**(6565): 560-564.

Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2001). "Neurotrophins: roles in neuronal development and function." Annu Rev Neurosci **24**: 677-736.

Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2003). "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction." Annu Rev Biochem **72**: 609-642.

Huey, E. D., R. Zahn, F. Krueger, J. Moll, D. Kapogiannis, E. M. Wassermann and J. Grafman (2008). "A psychological and neuroanatomical model of obsessive-compulsive disorder." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **20**(4): 390-408.

Hunt, C. A., L. J. Schenker and M. B. Kennedy (1996). "PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses." J Neurosci **16**(4): 1380-1388.

Ikegame, T., M. Bundo, Y. Murata, K. Kasai, T. Kato and K. Iwamoto (2013). "DNA methylation of the BDNF gene and its relevance to psychiatric disorders." J Hum Genet **58**(7): 434-438.

Inoue, H., R. Kato, S. Fukuyama, A. Nonami, K. Taniguchi, K. Matsumoto, T. Nakano, M. Tsuda, M. Matsumura, M. Kubo, F. Ishikawa, B. G. Moon, K. Takatsu, Y. Nakanishi and A. Yoshimura (2005). "Spred-1 negatively regulates allergen-induced airway eosinophilia and hyperresponsiveness." J Exp Med **201**(1): 73-82.

Janak, P. H. and K. M. Tye (2015). "From circuits to behaviour in the amygdala." Nature **517**(7534): 284-292.

Kato, R., A. Nonami, T. Taketomi, T. Wakioka, A. Kuroiwa, Y. Matsuda and A. Yoshimura (2003). "Molecular cloning of mammalian Spred-3 which suppresses tyrosine kinase-mediated Erk activation." Biochem Biophys Res Commun **302**(4): 767-772.

Kelleher, R. J., 3rd, A. Govindarajan, H. Y. Jung, H. Kang and S. Tonegawa (2004). "Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory." Cell **116**(3): 467-479.

King, A. J., R. S. Wireman, M. Hamilton and M. S. Marshall (2001). "Phosphorylation site specificity of the Pak-mediated regulation of Raf-1 and cooperativity with Src." FEBS Lett **497**(1): 6-14.

King, J. A., N. M. Corcoran, G. M. D'Abaco, A. F. Straffon, C. T. Smith, C. L. Poon, M. Buchert, S. I. N. E. Hall, P. Lock and C. M. Hovens (2006). "Eve-3: a liver enriched suppressor of Ras/MAPK signaling." J Hepatol **44**(4): 758-767.

King, J. A., A. F. Straffon, G. M. D'Abaco, C. L. Poon, S. T. I, C. M. Smith, M. Buchert, N. M. Corcoran, N. E. Hall, B. A. Callus, B. Sarcevic, D. Martin, P. Lock and C. M. Hovens (2005). "Distinct requirements for the Sprouty domain for functional activity of Spred proteins." Biochem J **388**(Pt 2): 445-454.

Kluge, M., P. Schussler, H. E. Kunzel, M. Dresler, A. Yassouridis and A. Steiger (2007). "Increased nocturnal secretion of ACTH and cortisol in obsessive compulsive disorder." J Psychiatr Res **41**(11): 928-933.

Kordi-Tamandani, D. M., R. Sahranavard and A. Torkamanzehi (2012). "DNA methylation and expression profiles of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and dopamine transporter (DAT1) genes in patients with schizophrenia." Mol Biol Rep **39**(12): 10889-10893.

Kouhara, H., Y. R. Hadari, T. Spivak-Kroizman, J. Schilling, D. Bar-Sagi, I. Lax and J. Schlessinger (1997). "A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway." Cell **89**(5): 693-702.

Kyriakis, J. M., H. App, X. F. Zhang, P. Banerjee, D. L. Brautigan, U. R. Rapp and J. Avruch (1992). "Raf-1 activates MAP kinase-kinase." Nature **358**(6385): 417-421.

Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, Y. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C. M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V. Olson, R. Kaul, C. Raymond, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J. A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H.

Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J. V. Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Slater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowki, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan, P. de Jong, J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi, Y. J. Chen, J. Szustakowki and C. International Human Genome Sequencing (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.

LeDoux, J. (2007). "The amygdala." Curr Biol **17**(20): R868-874.

Leevers, S. J., H. F. Paterson and C. J. Marshall (1994). "Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane." Nature **369**(6479): 411-414.

Lowenstein, E. J., R. J. Daly, A. G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E. Y. Skolnik, D. Bar-Sagi and J. Schlessinger (1992). "The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling." Cell **70**(3): 431-442.

Macdonald, S. G., C. M. Crews, L. Wu, J. Driller, R. Clark, R. L. Erikson and F. McCormick (1993). "Reconstitution of the Raf-1-MEK-ERK signal transduction pathway in vitro." Mol Cell Biol **13**(11): 6615-6620.

Malumbres, M. and M. Barbacid (2003). "RAS oncogenes: the first 30 years." Nat Rev Cancer **3**(6): 459-465.

Marais, R., Y. Light, H. F. Paterson and C. J. Marshall (1995). "Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation." EMBO J **14**(13): 3136-3145.

Meng, S., M. Zhang, W. Pan, Z. Li, D. H. Anderson, S. Zhang, B. Ge and C. Wang (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**(5): 748-758.

Menzies, L., S. R. Chamberlain, A. R. Laird, S. M. Thelen, B. J. Sahakian and E. T. Bullmore (2008). "Integrating evidence from neuroimaging and neuropsychological studies of obsessive-compulsive disorder: the orbitofronto-striatal model revisited." Neurosci Biobehav Rev **32**(3): 525-549.

Milad, M. R. and S. L. Rauch (2012). "Obsessive-compulsive disorder: beyond segregated cortico-striatal pathways." Trends Cogn Sci **16**(1): 43-51.

Minakami, R., F. Katsuki, T. Yamamoto, K. Nakamura and H. Sugiyama (1994). "Molecular cloning and the functional expression of two isoforms of human metabotropic glutamate receptor subtype 5." Biochem Biophys Res Commun **199**(3): 1136-1143.

Miyoshi, K., T. Wakioka, H. Nishinakamura, M. Kamio, L. Yang, M. Inoue, M. Hasegawa, Y. Yonemitsu, S. Komiya and A. Yoshimura (2004). "The Sprouty-related protein, Spred, inhibits cell motility, metastasis, and Rho-mediated actin reorganization." Oncogene **23**(33): 5567-5576.

Nestler, E. J., C. J. Pena, M. Kundakovic, A. Mitchell and S. Akbarian (2016). "Epigenetic Basis of Mental Illness." Neuroscientist **22**(5): 447-463.

Nietzer, S. L., M. Bonn, F. Jansen, R. S. Heiming, L. Lewejohann, N. Sachser, E. S. Asan, K. P. Lesch and A. G. Schmitt (2011). "Serotonin transporter knockout and repeated social defeat stress: impact on neuronal morphology and plasticity in limbic brain areas." Behav Brain Res **220**(1): 42-54.

Nobuhisa, I., R. Kato, H. Inoue, M. Takizawa, K. Okita, A. Yoshimura and T. Taga (2004). "Spred-2 suppresses aorta-gonad-mesonephros hematopoiesis by inhibiting MAP kinase activation." J Exp Med **199**(5): 737-742.

Nomura, H., T. Ohtsuka, S. Tadokoro, M. Tanaka and N. Hirashima (2009). "Involvement of ELKS, an active zone protein, in exocytotic release from RBL-2H3 cells." Cell Immunol **258**(2): 204-211.

Nonami, A., R. Kato, K. Taniguchi, D. Yoshiga, T. Taketomi, S. Fukuyama, M. Harada, A. Sasaki and A. Yoshimura (2004). "Spred-1 negatively regulates interleukin-3-mediated ERK/mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in hematopoietic cells." J Biol Chem **279**(50): 52543-52551.

Phoenix, T. N. and S. Temple (2010). "Spred1, a negative regulator of Ras-MAPK-ERK, is enriched in CNS germinal zones, dampens NSC proliferation, and maintains ventricular zone structure." Genes Dev **24**(1): 45-56.

Pitkanen, A., V. Savander and J. E. LeDoux (1997). "Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala." Trends Neurosci **20**(11): 517-523.

Plotnikov, A., E. Zehorai, S. Procaccia and R. Seger (2011). "The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation." Biochim Biophys Acta **1813**(9): 1619-1633.

Pradhan, J., P. G. Noakes and M. C. Bellingham (2019). "The Role of Altered BDNF/TrkB Signaling in Amyotrophic Lateral Sclerosis." Front Cell Neurosci **13**: 368.

Pruunsild, P., A. Kazantseva, T. Aid, K. Palm and T. Timmusk (2007). "Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters." Genomics **90**(3): 397-406.

Quintanar-Audelo, M., P. Yusoff, S. Sinniah, S. Chandramouli and G. R. Guy (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**(26): 23102-23112.

Raman, M., W. Chen and M. H. Cobb (2007). "Differential regulation and properties of MAPKs." Oncogene **26**(22): 3100-3112.

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**(1273): 11-20; discussion 20-11.

Roosendaal, B., B. S. McEwen and S. Chattarji (2009). "Stress, memory and the amygdala." Nat Rev Neurosci **10**(6): 423-433.

Roth, T. L., F. D. Lubin, M. Sodhi and J. E. Kleinman (2009). "Epigenetic mechanisms in schizophrenia." Biochim Biophys Acta **1790**(9): 869-877.

Seger, R. and E. G. Krebs (1995). "The MAPK signaling cascade." FASEB J **9**(9): 726-735.

Shetty, K. M., P. Kurada and J. E. O'Tousa (1998). "Rab6 regulation of rhodopsin transport in Drosophila." J Biol Chem **273**(32): 20425-20430.

Shmelkov, S. V., A. Hormigo, D. Jing, C. C. Proenca, K. G. Bath, T. Milde, E. Shmelkov, J. S. Kushner, M. Baljevic, I. Dincheva, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, N. W. Gale, G. D. Yancopoulos, I. Ninan, F. S. Lee and S. Rafii (2010). "Slitrk5 deficiency impairs corticostriatal circuitry and leads to obsessive-compulsive-like behaviors in mice." Nat Med **16**(5): 598-602, 591p following 602.

Sivak, J. M., L. F. Petersen and E. Amaya (2005). "FGF signal interpretation is directed by Sprouty and Spred proteins during mesoderm formation." Dev Cell **8**(5): 689-701.

Skolnik, E. Y., C. H. Lee, A. Batzer, L. M. Vicentini, M. Zhou, R. Daly, M. J. Myers, Jr., J. M. Backer, A. Ullrich, M. F. White and et al. (1993). "The SH2/SH3 domain-containing protein GRB2 interacts with tyrosine-phosphorylated IRS1 and Shc: implications for insulin control of ras signalling." EMBO J **12**(5): 1929-1936.

Stokoe, D., S. G. Macdonald, K. Cadwallader, M. Symons and J. F. Hancock (1994). "Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane." Science **264**(5164): 1463-1467.

Sudhof, T. C. (2012). "The presynaptic active zone." Neuron **75**(1): 11-25.

Taylor, S. (2013). "Molecular genetics of obsessive-compulsive disorder: a comprehensive meta-analysis of genetic association studies." Mol Psychiatry **18**(7): 799-805.

Temeles, G. L., J. B. Gibbs, J. S. D'Alonzo, I. S. Sigal and E. M. Scolnick (1985). "Yeast and mammalian ras proteins have conserved biochemical properties." Nature **313**(6004): 700-703.

Tu, J. C., B. Xiao, S. Naisbitt, J. P. Yuan, R. S. Petralia, P. Brakeman, A. Doan, V. K. Aakalu, A. A. Lanahan, M. Sheng and P. F. Worley (1999). "Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the Shank family of postsynaptic density proteins." Neuron **23**(3): 583-592.

Ullrich, A. and J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." Cell **61**(2): 203-212.

Ullrich, M., K. Bundschu, P. M. Benz, M. Abesser, R. Freudinger, T. Fischer, J. Ullrich, T. Renne, U. Walter and K. Schuh (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**(11): 9477-9488.

Ullrich, M., M. Weber, A. M. Post, S. Popp, J. Grein, M. Zechner, H. Guerrero Gonzalez, A. Kreis, A. G. Schmitt, N. Uceyler, K. P. Lesch and K. Schuh (2018). "OCD-like behavior is caused by dysfunction of thalamo-amygdala circuits and upregulated TrkB/ERK-MAPK signaling as a result of SPRED2 deficiency." Mol Psychiatry **23**(2): 444-458.

van Grootheest, D. S., D. C. Cath, A. T. Beekman and D. I. Boomsma (2005). "Twin studies on obsessive-compulsive disorder: a review." Twin Res Hum Genet **8**(5): 450-458.

Wakioka, T., A. Sasaki, R. Kato, T. Shouda, A. Matsumoto, K. Miyoshi, M. Tsuneoka, S. Komiya, R. Baron and A. Yoshimura (2001). "Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling." Nature **412**(6847): 647-651.

Wang, Y., X. Liu, T. Biederer and T. C. Sudhof (2002). "A family of RIM-binding proteins regulated by alternative splicing: Implications for the genesis of synaptic active zones." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14464-14469.

Welch, J. M., J. Lu, R. M. Rodriguiz, N. C. Trotta, J. Peca, J. D. Ding, C. Feliciano, M. Chen, J. P. Adams, J. Luo, S. M. Dudek, R. J. Weinberg, N. Calakos, W. C. Wetsel and G. Feng (2007). "Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice." Nature **448**(7156): 894-900.

Wellbrock, C., M. Karasarides and R. Marais (2004). "The RAF proteins take centre stage." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 875-885.

Willumsen, B. M., A. Christensen, N. L. Hubbert, A. G. Papageorge and D. R. Lowy (1984). "The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association." Nature **310**(5978): 583-586.

Wood, J. and S. E. Ahmari (2015). "A Framework for Understanding the Emerging Role of Corticolimbic-Ventral Striatal Networks in OCD-Associated Repetitive Behaviors." Front Syst Neurosci **9**: 171.

Yao, Z. and R. Seger (2009). "The ERK signaling cascade--views from different subcellular compartments." Biofactors **35**(5): 407-416.

Yoon, S. and R. Seger (2006). "The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions." Growth Factors **24**(1): 21-44.

Yoshida, T., T. Hisamoto, J. Akiba, H. Koga, K. Nakamura, Y. Tokunaga, S. Hanada, H. Kumemura, M. Maeyama, M. Harada, H. Ogata, H. Yano, M. Kojiro, T. Ueno, A. Yoshimura and M. Sata (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**(45): 6056-6066.

Zhang, J. C., W. Yao and K. Hashimoto (2016). "Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF)-TrkB Signaling in Inflammation-related Depression and Potential Therapeutic Targets." Curr Neuropharmacol **14**(7): 721-731.

Zhang, W. and H. T. Liu (2002). "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells." Cell Res **12**(1): 9-18.

Zuccato, C. and E. Cattaneo (2009). "Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurol **5**(6): 311-322.

Ullrich, M. (2014). Identification of SPRED2 as a Novel Regulator of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity and of Body Homeostasis.

Martin Trepel. Neuroanatomie, Struktur und Funktion. Elsevier Verlag, Auflage 2017.
Renate Lüllmann-Rauch. Taschenlehrbuch für Histologie. Thieme Verlag, 2. Auflage 2006.

Löffler G., Petrides P.E., Heinrich P.C., Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, Springer Verlag, Regensburg 2007.

Anna Leichsenring, 2013. Tiermodelle in der präklinischen Forschung Grundlagenforschung und Entwicklung neuer Therapeutika. GIT-Labor – Portal für Anwender in Wissenschaft und Industrie.

¹ „Aufbau und Funktion der chemischen Synapse“ Serlo.org. Lizenz: cc-by-sa-4.0.

7. ANHANG

7.1. DANKSAGUNG

Ich möchte mich hiermit bei Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh ganz herzlich bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen sowie für die freundliche Unterstützung.

Besonderen Dank auch an Frau Dr. rer. nat. Melanie Ullrich für die hervorragende Betreuung, Geduld und ständige Hilfsbereitschaft.

Diese Gelegenheit möchte ich nutzen, Frau Prof. Dr. med. Nurcan Üçeyler, für Ihre Kooperation in diesem Projekt sowie Bereitstellung der nötigen Materialien für die Durchführung der RT-PCR.

Ich möchte mich bei der AG Schuh für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ganz besonders danke ich meiner Mutter Mónica, die mich immer bedingungslos unterstützt, sowie meiner Frau Maria, die meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte.