

**Fto beeinflusst hippocampale Funktionen
über die Bdnf-Prozessierung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

André Sychala

aus Düsseldorf

Düsseldorf, Juni 2017

aus dem Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Ulrich Rüter
Korreferent: Prof. Dr. Thomas Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 23.08.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	7
1.1. Das “ <i>Fat mass and obesity associated</i> “-Gen	7
1.2. Die Funktion von Fto	9
1.3. Erkenntnisse aus <i>Fto</i> -Mausmutanten	10
1.4. Die Rolle von Fto im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen	13
1.5. Stress	16
1.6. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse	17
1.7. Der Hippocampus.....	21
1.8. „ <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> “ (Bdnf).....	24
1.9. Zielsetzung	29
2. Material und Methoden.....	30
2.1. Arbeiten mit Mäusen	30
2.1.1. Tierschutz	30
2.1.2. Tierhaltung und Verpaarung.....	30
2.1.3. Präparation von Mäusen	31
2.1.4. Verhaltensanalysen.....	32
2.1.4.1. Radial Arm Maze	32
2.1.4.2. Morris Water Maze	32
2.1.4.3. Enriched Environment	33
2.2. Isolation und Aufreinigung von Nukleinsäuren	34
2.2.1. DNA-Isolation und Aufreinigung aus Schwanzspitzenbiopsien.....	34
2.2.2. RNA-Isolation aus dem Hippocampus	35
2.2.3. Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren....	37
2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	37

2.3.1. PCR-Amplifikation.....	38
2.3.2. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	40
2.3.3. Reverse Transkription	40
2.3.4. Quantitative „Real-time“-PCR-Untersuchungen.....	41
2.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	44
2.5. Zellkulturtechniken	45
2.5.1. Kultivierung und Passagieren von MEFs	46
2.5.2. Kultivierung der Zellen auf Deckgläschen und Induktion der Ziliogenese .	46
2.6. Immunfluoreszenzanalysen	47
2.6.1. Immunfluoreszenzanalysen auf Zellen.....	47
2.6.2. Immunfluoreszenzfärbung auf Gefrierdünnschnitten.....	48
2.6.2.1. Anfertigung von Gefrierdünnschnitten	48
2.6.2.2. Immunfluoreszenzfärbung	49
2.7. Bromdesoxyuridin-Analysen.....	51
2.8. Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (EIA).....	53
2.9. Proteinbiochemie.....	54
2.9.1. Extraktion von Proteinen.....	54
2.9.2. Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford	55
2.9.3. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	55
2.9.4. Western Blot	58
2.9.5. Immunnachweis von Proteinen	59
2.10. Fotodokumentation und Bildbearbeitung.....	60
2.11. Bildanalysen	61
2.12. Statistische Auswertung	61
3. Ergebnisse	62
3.1. Der Verlust von Fto führt zu einer Hyperaktivierung der Hypothalamus– Hypophysen–Nebennierenrinden–Achse	62

3.2. Fto ist ein wichtiger Faktor für die Funktion des Arbeitsgedächtnisses	63
3.3. Fto hat keinen direkten Einfluss auf das Langzeitgedächtnis	66
3.4. Fto ist ein wichtiger Faktor für die Differenzierung und Reifung von neuronalen Vorläuferzellen im Hippocampus.....	68
3.5. <i>Fto</i> ^{-/-} -Mäuse weisen einen mBdnf-Prozessierungsdefekt im Hippocampus auf ...	70
3.6. Der MAPK/Erk-Signalweg ist durch den mBdnf-Prozessierungsdefekt in <i>Fto</i> ^{-/-} -Hippocampi gestört.....	72
3.7. Der Transkriptionsfaktor Creb wird unabhängig vom MAPK/Erk-Signalweg in <i>Fto</i> ^{-/-} -Mäusen aktiviert.....	74
3.8. Externe Stimuli beeinflussen die Stresshormon-Menge und mBdnf-Mengen in <i>Fto</i> ^{-/-} -Mäusen negativ.	76
3.9. Fto beeinflusst die Prozessierung von Bdnf über die Matrix-Metalloproteinase-9...	79
4. Diskussion	85
4.1. Fto ist ein wichtiger Faktor für die Funktion der neuroendokrinen Stressantwort	85
4.2. Fto beeinflusst die Zelldifferenzierung und kognitive Leistungsfähigkeit des Hippocampus.....	87
4.3. Fto beeinflusst die extrazelluläre Prozessierung von proBdnf zu mBdnf im Hippocampus.....	90
4.4. Die gestörte Bdnf-Prozessierung in <i>Fto</i> ^{-/-} -Mäusen beeinflusst die Aktivität der Bdnf-abhängigen Signalwege im Hippocampus	94
5. Zusammenfassung.....	96
5.1. Abstract	97
6. Abkürzungen und Einheiten.....	98
7. Literaturverzeichnis.....	102
8. Anhang	116
8.1. Initiale Studien	116

8.1.1.	Kortikosteron-Messungen	116
8.1.2.	Elevated Plus Maze-Test	117
8.1.3.	Cage Emergence-Test.....	118
8.1.4.	<i>Bdnf</i> -Expressionsanalysen im Hippocampus	119
8.2.	Ergänzende Analysen	120
8.2.1.	Gewichtsdaten während des Enriched Environment.....	120
9.	Danksagung	121
10.	Eidesstattliche Erklärung.....	122

1. Einleitung

1.1. Das “*Fat mass and obesity associated*“-Gen

Das *Fto*-Gen wurde 1999 erstmals als eines von 6 deletierten Genen in der *Fused-toes* (*Ft*) Mausmutante beschrieben (Peters et al., 1999). Diese Mäuse zeigen bei heterozygoter Ausprägung eine Fusion der ersten drei bis vier Zehen an den anterioren Gliedmaßen, sowie eine Vergrößerung (Hyperplasie) des Thymus (van der Hoeven et al., 1994). Homozygote *Ft*-Mausmutanten sind embryonal letal und sterben zwischen Embryonaltag 10 und 14,5 an ihren schweren Missbildungen. Zu diesen gehören unter anderem gravierende kraniofaziale Fehlbildungen, eine gestörte oder gänzlich ausbleibende Hirnentwicklung, sowie Defekte in der Rechts-Links-Asymmetrie (van der Hoeven et al., 1994; Heymer et al., 1997). Mit insgesamt 250 Kb ist *Fto* das größte der 6 deletierten Gene, weshalb es nach seiner Identifizierung vorerst als *Fatso* bezeichnet wurde. Es codiert für ein 502 Aminosäuren großes Protein, welches primär im Zellkern lokalisiert ist. Trotz seiner Größe beläuft sich der kodierende Teil des Gens auf nur 1506 Basenpaare, welche sich auf neun Exons verteilen. Auffallend ist dabei, dass vor allem die ersten und letzten beiden Exons durch eine über 100 Kb lange Intronsequenz getrennt sind. Vergleiche mit dem humanen *FTO*-Gen zeigten eine Homologie von 85 % in den proteinkodierenden Bereichen des murinen *Fto*-Gens. Sowohl in Menschen, als auch in Mäusen wird es ubiquitär in embryonalem und adultem Gewebe exprimiert, wobei es vor allem im Hirn eine hohe Expressionsrate aufweist. Das *Fto*-Gen ist in den meisten Vertebraten und Algen hochkonserviert, konnte jedoch in Invertebraten, Pilzen und Grünpflanzen nicht nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass es bereits seit mindestens 450 Millionen Jahren existiert (Peters et al., 1999; Peters et al., 2002; Frayling et al., 2007; Gerken et al., 2007; Fredriksson et al., 2008).

Trotz der molekularen Entschlüsselung konnten bis ins Jahr 2007 keine konkreten Erkenntnisse zu den genauen Funktionen von *Fto* oder dessen Involvierung in Signalwegen gewonnen werden. Dann jedoch rückte das Gen weltweit in den Fokus der Wissenschaft, als vier unabhängige Arbeitsgruppen nahezu zeitgleich veröffentlichten, dass in genomweiten Assoziationsstudien ein signifikanter Zusammenhang zwischen Polymorphismen im ersten Intron des humanen *FTO*-Gens und dem Body-Mass-Index (BMI) besteht (Dina et al., 2007; Frayling et al., 2007; Hinney et al., 2007; Scuteri et al., 2007). Dabei konnte unter anderem gezeigt werden, dass Träger des homozygoten

Risikoallels im Durchschnitt 3-4 kg mehr wiegen und ein um 1,67-fach erhöhtes Risiko aufweisen an Adipositas zu erkranken. Des Weiteren konnten verschiedene, mit Adipositas assoziierte Syndrome identifiziert werden, welche mit *FTO* Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism*; SNP) in Verbindung stehen. Dazu gehören unter anderem ein veränderter Leptin-, Insulin- und Glukosespiegel, sowie ein verringerter Plasma-HDL-Cholesterol-Spiegel, Veränderungen in der Energie und Nahrungsaufnahme und dem Sättigungsgefühl. Dabei konnten die Symptome bereits im Kindesalter ab zwei Wochen nach der Geburt beobachtet werden (Cecil et al., 2008; Freathy et al., 2008; Jacobsson et al., 2008; Speakman et al., 2008; den Hoed et al., 2009; Haupt et al., 2009; Tanofsky-Kraff et al., 2009; Wardle et al., 2009). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden zahlreiche Populationen unterschiedlicher ethnischer Herkunft, unterschiedlichen Alters und Geschlechts bezüglich Assoziationen von *FTO*-Polymorphismen mit Fettleibigkeit und mit Fettleibigkeit assoziierten Erkrankungen beschrieben (Cornes et al., 2009; Tonjes et al., 2010; Jacobsson et al., 2012; Kamura et al., 2016; Reuter et al., 2016; Saldana-Alvarez et al., 2016). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Individuen trotz eines homozygot vorliegenden Risikoallels von *FTO*, durch körperliche Betätigung oder einer energiearmen Diät einem fettleibigen Phänotyp entgegenwirken können (Kilpelainen et al., 2011; Phillips et al., 2012).

Im Gegensatz zu den eindeutigen Ergebnissen aus genomweiten Assoziationsstudien, dass *FTO*-Polymorphismen mit Fettleibigkeit assoziiert sind, konnten in verschiedene Expressionsanalysen bis heute keine einheitlichen Aussagen getroffen werden, welche einen Zusammenhang zwischen dem *FTO*-Genotyp und der *FTO*-Expression beschreiben (Grunnet et al., 2009; Zabena et al., 2009). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die *FTO*-Expression unabhängig vom Genotyp im viszeralen Fettgewebe von fettleibigen Individuen im Gegensatz zu nicht fettleibigen erhöht ist (Terra et al., 2010). Expressionsanalysen in Teilen des Gehirns, welche für die Nahrungsaufnahme und Sättigungsregulation zuständig sind, zeigten bisher, dass die Expression von *FTO* durch Fasten im *Nucleus arcuatus* (Ansammlung von Nervenzellkörpern im Hypothalamus) beeinflusst wird. Die Ergebnisse der einzelnen Gruppen zeigten jedoch gegensätzliche Ergebnisse, sodass die *FTO* Expression nach dem Fasten sowohl positiv, als auch negativ reguliert werden kann (Stratigopoulos et al., 2008; Olszewski et al., 2009; McTaggart et al., 2011; Wang et al., 2011).

1.2. Die Funktion von Fto

Nach der Entschlüsselung der Aminosäuresequenz, konnte anhand von bioinformatischer Analysen gezeigt werden, dass Fto homolog zu Enzymen der Fe(II)- und 2-Oxogluterat-abhängigen Dioxygenasen-Superfamilie ist. Hierbei ähnelt die *Fto*-Sequenz vor allem der in *Escherichia coli* (*E. coli*) vorkommenden Dioxygenase AlkB und den eukaryotischen Homologen ALKBH1, ALKBH2 und ALKBH3 im Menschen (Gerken et al., 2007; Sanchez-Pulido und Andrade-Navarro, 2007; Han et al., 2010). Enzyme dieser Familie spielen eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur, der Genregulation und der epigenetischen Modifikation von Genen. In 2007 konnten Gerken und Kollegen erstmalig *in vitro* nachweisen, dass murines Fto eine Demethylase-Funktion hat und die Demethylierung von 3-Methylthymidin (3-meT) in ssDNA katalysiert (Gerken et al., 2007). Anschließende Analysen konnte zeigen, dass humanes Fto neben 3-meT in ssDNA auch 3-Methyluridin (3-meU) in ssRNA demethyliert und dabei eine 2-fach höhere Präferenz für die ssRNA als für die ssDNA aufweist (Jia et al., 2008). Durch die Entschlüsselung der kristallinen Struktur von Fto konnten Han und Kollegen zeigen, dass für diese Selektivität eine bisher unbekannt Tertiärstruktur am C-terminalen Ende von Fto verantwortlich ist. Diese verhindert den Zugang von doppelsträngiger nicht-methylierter DNA oder RNA zum katalytischen Zentrum in der N-terminalen Domäne (Han et al., 2010). Spätere *in vitro*- und *in vivo*-Analysen konnten N⁶-Methyladenosin (m⁶A) als primäres Substrat von Fto identifizierten, welches die am häufigsten vorkommende Methylierungsform in mRNA darstellt. Durch die Transfektion von *Fto*-spezifischer siRNA oder *Fto*-exprimierenden Vektoren in Zellen konnte gezeigt werden, dass die Menge der m⁶A-Methylierung in zellulärer mRNA abhängig von der *Fto*-Expression ist (Jia et al., 2011). Diese Erkenntnis konnte ein Jahr später durch eine m⁶A-Lokalisationsstudie des gesamten Transkriptoms in *FTO*-überexprimierenden HEK-Zellen ("*Human Embryonic Kidney*"-Zellen) bestätigt werden. Mayer und Kollegen konnten dabei zeigen, dass die Überexpression von *FTO* in diesen Zellen zu einer rapiden Abnahme der m⁶A-Methylierung im gesamten Transkriptom führt (Meyer et al., 2012). Neben der Funktion als Demethylase gibt es einige Hinweise darauf, dass Fto eine Funktion als Sensor für Wachstumsmechanismen besitzt. So konnte in MEFs („*mouse embryonic fibroblasts*“) und HEKs gezeigt werden, dass sowohl die Expression, als auch die Translation von Fto von der Verfügbarkeit von Glucose und Aminosäuren beeinflusst wird. Der Entzug dieser Wachstumsfaktoren führt in den Zellen zu einer Reduktion der

Fto-mRNA und der *Fto*-Proteinmenge (Cheung et al., 2013). Weitere Analysen konnten zeigen, dass die Aktivität von *Fto* direkt Einfluss auf zwei, für das Wachstum entscheidende Regulatoren hat: Den MSC (engl. *multi-synthetase complex*) und mTORC1 (engl. *mechanistic target of rapamycin complex 1*). So führte eine *Fto*-Defizienz *in vitro* zu einer verringerten Aktivität des MSC. Dieser Komplex organisiert die Funktion der Aminoacyl-tRNA-Synthetase, welche bei der Translation die tRNA-Moleküle entsprechend ihrer Anticodon-Sequenz mit den korrekten Aminosäuren verknüpft. mTORC1 hingegen gilt als entscheidendes Signaltransduktionsenzym, welches in Zellen abhängig von der Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren, Signalkaskaden für das Zellwachstum oder bei Mangel an Wachstumsfaktoren für die Apoptose aktiviert. Hier konnte gezeigt werden, dass eine durch Aminosäurenmangel hervorgerufene Herunterregulation von mTORC1, durch die Expression von *Fto* verhindert werden kann (Gulati et al., 2013). Wie *Fto* auf molekularer Ebene die Verfügbarkeit von Aminosäuren an den mTORC1-Signalweg koppelt ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Die Erkenntnisse könnten jedoch eine Erklärung für die phänotypische Ausprägung der postnatalen Wachstumsretardierung in *Fto*-defizienten Mäusen sein.

1.3. Erkenntnisse aus *Fto*-Mausmutanten

Trotz der Erkenntnisse, dass *Fto* als eine Demethylase mit m⁶A als primärem Substrat fungiert, eine Funktion als Sensor für Wachstumsmechanismen besitzt und *FTO*-SNPs mit dem BMI assoziiert sind, konnten keine klaren Aussagen getroffen werden, für welche spezifischen physiologischen Vorgänge *Fto* von Bedeutung ist. Die Untersuchung von gentechnisch veränderten Tieren stellt eine gute Möglichkeit dar, um die *in vivo*-Funktionen eines Gens genauer zu untersuchen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden verschiedene *Fto*-Mausmutanten analysiert, welche teils *Fto*-defizient sind und teils *Fto* überexprimieren. Eine der ersten *Fto*-Mausmutanten wurde im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf generiert und charakterisiert (Fischer et al., 2009). Durch die Deletion von Exon 2 und 3 des *Fto*-Gens und das Einsetzen einer Neomycin-Resistenzkassette konnte eine vollständige Geninaktivierung in den Mausmutanten erzeugt werden. Während *Fto*^{+/-}-Mäuse keinen signifikanten Unterschied zu *Fto*^{+/+}-Mäusen zeigten, konnte bei *Fto*^{-/-}-Mäusen ein

komplexer Phänotyp beschrieben werden. So wurde gezeigt, dass $Fto^{-/-}$ -Mausembryonen zwar im erwarteten Mendel-Verhältnis geboren werden, jedoch eine erhöhte postnatale Sterblichkeit von bis zu 50 % im Vergleich zu $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{+/-}$ -Mausembryonen zeigen. Des Weiteren wurde eine signifikante Wachstumsretardation ab dem zweiten Tag nach der Geburt beobachtet. Im Alter von sechs Wochen wiegen $Fto^{-/-}$ -Mäuse durchschnittlich 30-40 % weniger als $Fto^{+/+}$ -Mäuse, was sowohl an einer Reduktion des weißen Fettgewebes (engl.: *white adipose tissue*; WAT), als auch an einer geringeren Muskelmasse (engl.: *lean mass*) liegt. Durch eine zwölfwöchige kalorienreiche Diät konnte gezeigt werden, dass $Fto^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu $Fto^{+/+}$ -Mäusen weniger Gewicht zunehmen und signifikant weniger WAT anreichern. Außerdem konnten im Blutplasma erhöhte Adrenalin- und Noradrenalin-Werte ermittelt werden (siehe Abbildung 1.1).

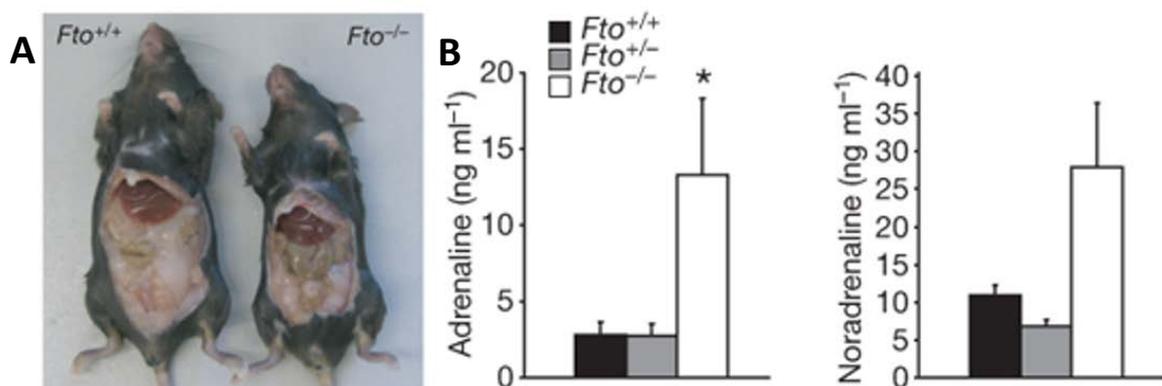


Abbildung 1.1: Vergleich von $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäusen bezüglich des äußeren Phänotyps und der Stresshormone Adrenalin und Noradrenalin.

In A ist deutlich zu erkennen, dass $Fto^{-/-}$ -Mäuse eine Wachstumsretardation und weniger weißes Fettgewebe aufweisen als $Fto^{+/+}$ -Mäuse. In B zeigen $Fto^{-/-}$ -Mäuse im Blutplasma signifikant erhöhte Adrenalinwerte und tendenziell höhere Noradrenalinwerte im Vergleich zu $Fto^{+/+}$ -Mäusen. Modifiziert nach Fischer et al., 2009.

Weitere kalorimetrische Analysen ergaben, dass $Fto^{-/-}$ -Mäuse an einer relativen Hyperphagie leiden, mehr Sauerstoff verbrauchen und mehr Kohlendioxid produzieren als $Fto^{+/+}$ -Mäuse, obwohl sie eine geringere Bewegungsaktivität aufweisen. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass der schlanke Phänotyp der $Fto^{-/-}$ -Mäuse aus einem erhöhten Energieumsatz resultiert, eine Fto -Defizienz vor Fettleibigkeit schützt und Fto eine wichtige Rolle im Energiehaushalt hat (Fischer et al., 2009).

In einer weiteren *Fto*-Mausmutante wurde mittels ENU-(engl.: *N-ethyl-N-nitrosourea*) Mutagenese die katalytische Aktivität von *Fto* reduziert, indem eine Substitution von Phenylalanin für Isoleucin an Position 367 des *Fto*-Proteins erfolgte (Church et al., 2009). Diese Mäuse zeigten ebenfalls eine Reduktion des weißen Fettgewebes und einen erhöhten Energieumsatz, jedoch keine der weiteren phänotypischen Ausprägungen der *Fto*^{-/-}-Mäuse.

In Mäusen durchgeführte Expressionsanalysen konnten zeigen, dass *Fto* in den meisten Geweben des Körpers exprimiert wird. Die höchsten Expressionsraten konnten dabei im Hirn festgestellt werden, wobei vor allem Regionen mit einer hohen neuronalen Dichte, wie dem Hypothalamus, dem Hippocampus und dem Cerebellum eine auffallend hohe Expression aufweisen (McTaggart et al., 2011). Aufgrund der Erkenntnisse aus den GWASs und den *Fto*-Mausmutanten, dass *Fto* eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel hat, wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt primär die Funktion und Expression von *Fto* im Hypothalamus, als Schlüsselregion für die Regulation des Energiehaushalts, untersucht. Die in den Tieren durchgeführten Expressionsanalysen zeigten jedoch teils widersprüchliche Ergebnisse. So publizierten verschiedene Gruppen eine Abnahme der *Fto*-Expression im Hypothalamus nach einem Futterentzug (Gerken et al., 2007; Stratigopoulos et al., 2008), während eine andere Gruppe eine Zunahme der Expression nach einem Futterentzug feststellte (Fredriksson et al., 2008). So konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt zwar gezeigt werden, dass die *Fto*-Expression im Hypothalamus durch die Nahrungsaufnahme beeinflusst wird, jedoch bleibt bis heute unklar, ob Veränderungen der *Fto*-Expression die Ursache für Fettleibigkeit sind oder nur eine Folge dieser.

Die teils widersprüchlichen Ergebnisse aus den Analysen des Hypothalamus und die Tatsache, dass *Fto* noch in anderen wichtigen Hirnarealen exprimiert wird, geben Grund zur Vermutung, dass *Fto* den Energiehaushalt bzw. den Energieumsatz noch über Hypothalamus-unabhängige Modulationen beeinflusst und für stoffwechselunabhängige Prozesse im Hirn von großer Bedeutung ist.

1.4. Die Rolle von *Fto* im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen

Neben den Zusammenhängen von *Fto* mit Stoffwechselfparametern gibt es einige Analysen, welche einen Zusammenhang von *Fto* mit neurologischen Erkrankungen und Entwicklungsstörungen zeigen. Während in den *Fto*^{-/-}-Mäusen hauptsächlich metabolisch relevante Prozesse charakterisiert wurden, konnten bei Menschen mit *FTO*-Mutationen primär Entwicklungs- und Funktionsstörungen des zentralen Nervensystems beschrieben werden. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind insgesamt nur zwei Fälle mit pathogenen *FTO*-Mutationen beim Menschen beschrieben. Im Jahre 2009 wurde erstmals eine *FTO*-Mutation im Menschen charakterisiert, welche zu einem vollständigen Verlust der *FTO*-Funktion führte (Boissel et al., 2009). Boissel und Kollegen entdeckten in acht Individuen einer palästinensischen Großfamilie eine Punktmutation an Position 947 der *FTO*-cDNA die zur Folge eine Substitution von Arginin zu Glutamin an Position 316 der *FTO*-Aminosäuresequenz hatte. Phänotypisch äußerte sich der Verlust der *FTO*-Funktion in allen acht Individuen durch postnatale Wachstumsretardation, eine verzögerte neuronale Entwicklung, postnatale Mikrozephalie, sowie psychomotorische Retardierung in Form von Störungen des extrapyramidalmotorischen Systems. Letztgenanntes System organisiert grundlegende motorische Funktionen, wie zum Beispiel das aufrechte Sitzen und das Gleichgewicht. Neben diesen neuronalen Defekten konnten auch Kardiomyopathien und proportionale Fehlbildungen des Gesichts beschrieben werden, sowie eine postnatale Sterblichkeit nach spätestens drei Jahren. Im Gegensatz zu den Mäusen zeigte keines der acht humanen Individuen mit *Fto*-Verlust einen auffälligen metabolischen Phänotyp in Form von Fettleibigkeit oder Untergewicht. Im Gegenzug wurden in den *Fto*^{-/-}-Mäusen keine Entwicklungs- oder Funktionsstörungen im zentralen Nervensystem oder dem kardiovaskulären System beschrieben (Fischer et al., 2009). Einzig erhöhte Plasma-Adrenalin und -Noradrenalin Werte, sowie eine Beeinträchtigung des dopaminergen Systems im Mittelhirn deuten auf eine wichtige Funktion von *Fto* in metabolisch unabhängigen Gehirnfunktionen hin (Fischer et al., 2009; Hess et al., 2013). Weitere Analysen geben Grund zur Vermutung, dass es einen Zusammenhang von *Fto* mit neurologischen Veränderungen wie der Neuroplastizität gibt (Rask-Andersen et al., 2011).

Diese Hypothesen werden durch Untersuchungen von *FTO*-Polymorphismen gestützt. Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass *FTO*-SNPs mit diversen strukturellen und funktionellen neuronalen Erkrankungen assoziiert sind. So konnten Variationen von *FTO* mit einem erhöhten Risiko für Alzheimer, einem reduzierten Gehirnvolumen, eingeschränkten kognitiven Fähigkeiten und psychischen Erkrankungen wie der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) in Verbindung gebracht werden (Zimmermann et al., 2009; Ho et al., 2010; Benedict et al., 2011; Keller et al., 2011). Welche molekularen Signalwege *Fto* bezüglich neuronaler Funktionen dabei beeinflusst oder in welchen Hirnarealen *Fto* dabei eine wichtige Funktion hat, ist bisher nicht genauer untersucht worden.

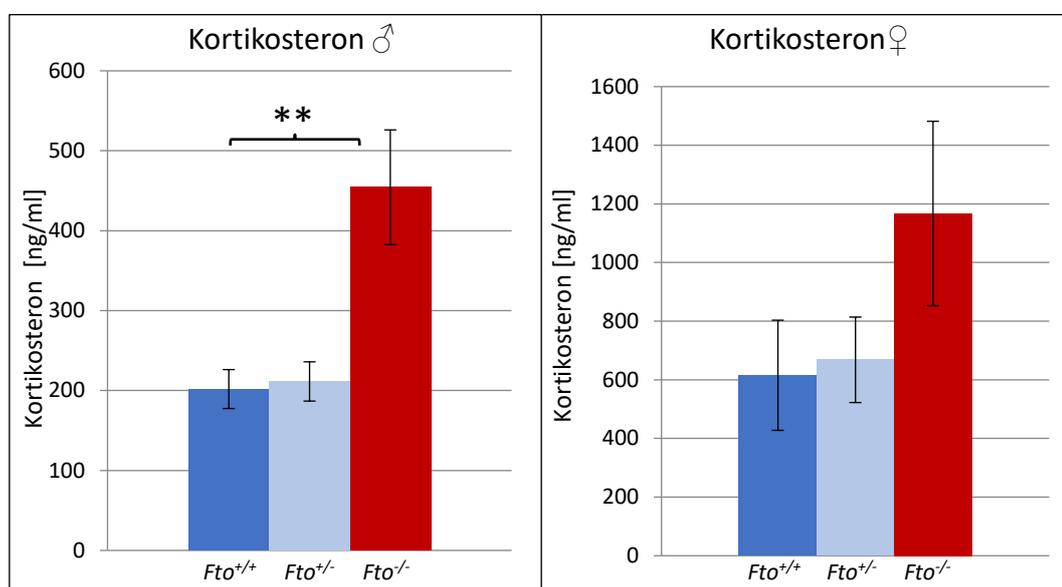


Abbildung 1.2: Kortikosteron-Konzentration im Blutplasma von *Fto*^{+/+}-, *Fto*^{+/-}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen.

Mittels Enzym-gekoppeltem Immunadsorptionstest wurde die Kortikosteron-Konzentration im Blutplasma von *Fto*^{+/+}-, *Fto*^{+/-}- und *Fto*^{-/-}-Mäuse in ng/ml gemessen ($n(\text{♂}) = 16/5/19$; $n(\text{♀}) = 5/9/6$). Männliche *Fto*^{-/-}-Mäuse weisen eine signifikant erhöhte Kortikosteron-Konzentration im Blutplasma auf (p -Wert = 0,0039) (Spychala, 2013).

In initialen Analysen konnte beobachtet werden, dass sich *Fto*^{-/-}-Mäuse unter normalen Haltungsbedingungen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen häufiger kratzen und putzen. Besonders in Stresssituationen, wie der Labor-üblichen Handhabung, zeigten *Fto*^{-/-}-Mäuse ein deutlich nervöseres Verhalten, Myoklonie (rasche unwillkürliche Muskelzuckungen), häufiges Springen ohne Grund und eine niedrigere Aggressionsgrenze (Schwanzschlagen) im Vergleich zu wildtypischen Mäusen (Spychala, 2013). Aus diesem Grund wurden verschiedene Stressparameter in

Fto^{-/-}-Mäusen genauer untersucht (Spychala, 2013). Es zeigte sich, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse chronisch erhöhte Werte des neuroendokrinen Stresshormons Kortikosteron im Blutplasma aufweisen (siehe Abbildung 1.2). Des Weiteren konnte in zwei unkontingierten Verhaltenstests gezeigt werden, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse ein erhöhtes Angstverhalten zeigen (siehe Abbildung 1.3). Alle zuletzt genannten Verhaltensauffälligkeiten sind ein typisches Anzeichen für eine erhöhte Stress-Sensibilität in *Fto*^{-/-}-Mäusen.

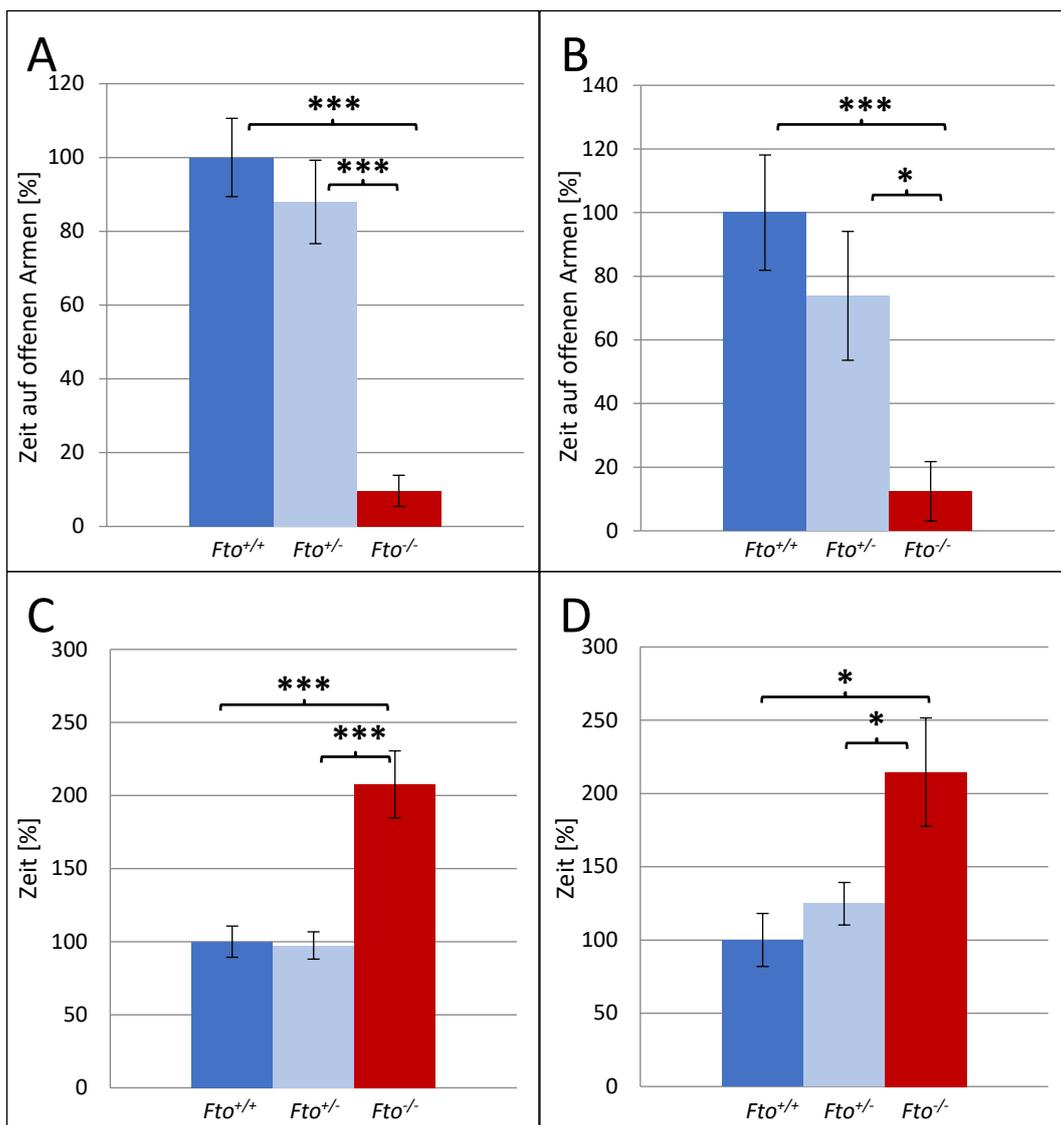


Abbildung 1.3: Initiale Verhaltenstests zur Quantifizierung des Angstverhaltens.

A-B: Dargestellt sind die Ergebnisse des Elevated Plus Maze Tests mit Mäusen im Alter von (A) 8 Wochen und (B) 16 Wochen. *Fto*^{-/-}-Mäuse zeigen ein deutlich gesteigertes Angstverhalten indem sie weniger Zeit auf den offenen Armen des Elevated Plus Maze verbringen. n (A) = 6 / 8 / 6; n (B) = 12 / 10 / 9. C-D: Dargestellt sind die Ergebnisse des Cage Emergence

Test im Alter von (C) 8 Wochen und (D) 16 Wochen. *Fto*^{-/-}-Mäuse zeigen ein deutlich gesteigertes Angstverhalten, da sie mehr Zeit benötigen, bis sie aus einem sicheren Bereich ein offenes Areal erkunden. n (C) = 24 / 21 / 20; n (D) = 11 / 12 / 18 (Spsychala, 2013).

1.5. Stress

Stress wird als eine nicht spezifische Reaktion eines Körpers auf äußere Reize definiert (Selye, 1976). In der Natur ist die schnelle Reaktion eines Lebewesens auf äußere Reize überlebenswichtig, wie z. B. beim plötzlichen Kontakt eines Beutetiers mit einem Prädator. Aus diesem Grund kommt es in einer Stresssituation zu einer Intensivierung der Körperfunktionen, welche die Reaktionsfähigkeit eines Tieres in Bezug auf Kampf oder Flucht erhöhen und das Tier aus seinem dynamischen Gleichgewicht, der so genannten Homöostase, bringt. Die Intensivierung der Körperfunktionen kann sowohl auf endokrinem, also durch Hormone vermitteltem Weg oder auf neurologischem Weg erfolgen und ist abhängig von der Art des Stressreizes. Neben der Quantität und Intensität spielt auch die Qualität des Stressreizes eine wichtige Rolle für die darauffolgende Reaktion. Qualitativ wird dabei zwischen physikalischen (Strom, Lärm, Kälte), chemischen (Gift, Narkose), sozialen (Isolation) und psychischen (Angst) Stressoren unterschieden (Carrasco und Van de Kar, 2003).

Die subjektive Intensität eines Stressors für Tiere zu bestimmen, gilt als schwierig. Aus diesem Grund hat in Tierversuchen die Dauer des einwirkenden Stressors eine größere Bedeutung für die Beurteilung seiner Wirkung, als der Stressor selbst. Häufig wird dabei nur zwischen akutem und chronischem Stress unterschieden. Bei chronischen Stressoren kann es über einen gewissen Zeitraum zu einer Desensibilisierung des Tieres kommen, was zu einer verminderten Stressreaktion führt. Dieser Anpassungsprozess ist jedoch sehr Stressor-spezifisch und hat keine Auswirkungen auf die allgemeine Stressantwort.

Bei der Verarbeitung und Vermittlung von Stresssignalen spielt vor allem das zentrale Nervensystem eine entscheidende Rolle. Ein sehr wichtiger Schaltkreis ist dabei die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse).

1.6. Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse ist ein Regulationskreislauf, der für die Umwandlung der durch Stress ausgelöste Nervenimpulse in hormonelle Signale zuständig ist. Dieser Vorgang wird auch als neuroendokrine Kopplung bezeichnet, welche vom Hypothalamus als Schlüsselregion im Hirn initiiert wird. Der Hypothalamus wird von verschiedenen Hirnregionen beeinflusst und setzt je nach Reiz unterschiedliche Hormone frei. Im Falle von Stress, welcher emotional vom Amygdala/Hippocampus-Komplex des limbischen Systems und Hirnstammbereichen des sympathischen Nervensystems verarbeitet wird, kommt es in parvizellulären Kernarealen des paraventriculären Nukleus (PVN) im Hypothalamus zur Sekretion des *Corticotropin-releasing Hormone* (CRH). Das CRH gelangt über den hypophysären Pfortaderkreislauf in den Hypophysenvorderlappen, wo es in den basophilen Zellen die Synthese von Adrenokortikotropin (ACTH, Adrenokortikotropes Hormon) initiiert. ACTH wird daraufhin in den Blutkreislauf sekretiert und wirkt als glandotropes Hormon auf ein weiteres endokrines Organ, die Nebennierenrinde. Hier bindet ACTH als ein Agonist der Melanokortinrezeptoren an den Melanokortinrezeptor 2 und initiiert die Bildung und Sekretion von Glukokortikoiden, Mineralokortikoiden und Sexualhormonen (Chrousos, 1995). Von diesen Hormonen sind jedoch hauptsächlich die Glukokortikoide für die Vermittlung von Stress verantwortlich (siehe Abbildung 1.4).

Das bei der Stressantwort in Nagetieren wichtigste Glukokortikoid ist das zur Gruppe der Steroidhormone gehörende Kortikosteron. Die Relevanz von Kortikosteron für die Umsetzung der glukokortikoiden Wirkung ist dabei in den einzelnen Tierarten sehr unterschiedlich. Während in Nagetieren Kortikosteron ca. 95 % und Kortisol ca. 5 % der Glukokortikoid-Aktivität ausmachen, ist das Verhältnis im Menschen umgekehrt. Kortikosteron hat sowohl eine mineralokortikoide, als auch eine glukokortikoide Wirkung und wird deshalb sowohl den Mineralokortikoiden als auch den Glukokortikoiden zugesprochen. Als wichtigstes Stresshormon in Nagetieren aktiviert Kortikosteron vor allem katabole Stoffwechselfvorgänge und beeinflusst die körpereigene Energiebereitstellung positiv. So fördert Kortikosteron die Glukoneogenese aus Aminosäuren in der Leber, was zu einem erhöhten Glukosespiegel im Blut führt. Des Weiteren wirkt Kortikosteron katabol auf die Muskulatur, wodurch Aminosäuren freigesetzt werden und lipolytisch auf das Fettgewebe. Dies führt zu einer Erhöhung der

freien Fettsäuren im Blut, welche als weitere Energiespender fungieren können (Munck et al., 1984; Klinka et al., 2005).

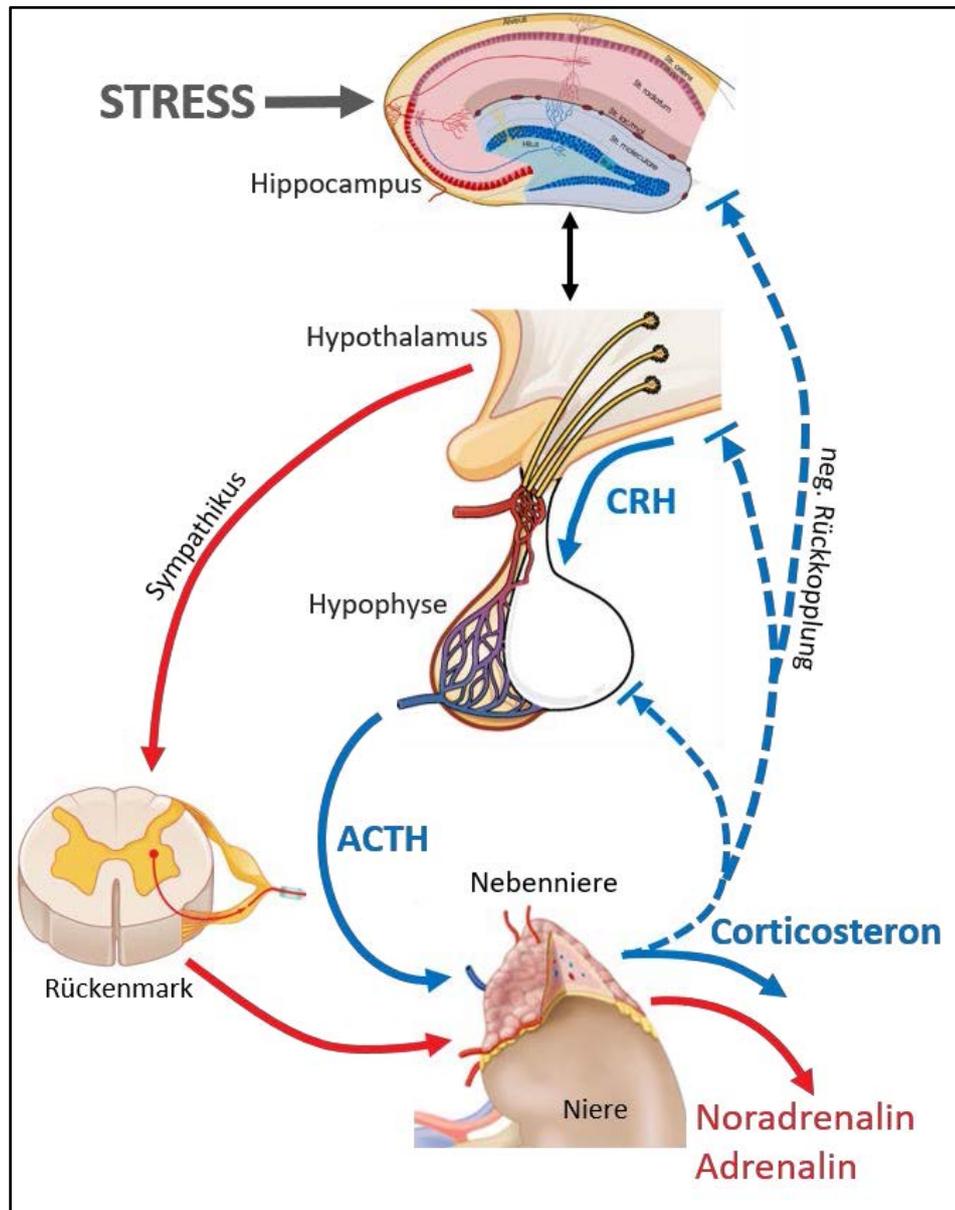


Abbildung 1.4: Schematische Übersicht der neuroendokrinen Vorgänge der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHN-Achse).

Dargestellt ist die HHN-Achse und die Sekretion der einzelnen neuroendokrinen Faktoren während einer Stressreaktion und dessen Rückkopplung (blauer Kreislauf). Außerdem ist die sympathische Stressreaktion vereinfacht skizziert (Rot). Modifiziert nach (OpenStax College, 2016; Veterinär-Anatomisches Institut Leipzig, 2017).

Neben der Funktion als Stresshormon mit Einfluss auf Stoffwechselfunktionen hat Kortikosteron auch eine supprimierende Wirkung auf die Immunantwort, indem es die Proliferation von Lymphozyten hemmt und die Freisetzung von Zytokinen verhindert.

Diese Wirkung ist Teil eines wichtigen Kontrollsystems, da im Falle einer Entzündung in einem Gewebe vermehrt Zytokine gebildet werden, welche durch die Aktivierung der HHN-Achse die Sekretion von Kortikosteron induzieren. Durch seine supprimierende Wirkung unterdrückt Kortikosteron daraufhin eine übermäßige Entzündungsreaktion oder allergische Reaktionen (Auernhammer und Melmed, 1999; Distelhorst, 2002).

Seine Wirkung realisiert Kortikosteron durch die Aktivierung von zwei verschiedenen Rezeptortypen, dem Glukokortikoid- (GR) und dem Mineralokortikoidrezeptor (MR) (Hollenberg et al., 1985). Während der MR primär Unterschiede in der basalen Sekretion von Kortikosteron registriert und darauf reagiert, wird der GR nur aktiviert, wenn es zu einem starken Anstieg des Kortikosteronspiegels im Blut kommt, wie im Falle einer Stresssituation. Dies liegt unter anderem daran, dass der MR eine zehnfach höhere Affinität zum Kortikosteron hat als der GR. Somit hat der GR während einer Stresssituation eine wichtigere Rolle als der MR und ist für die negative Rückkopplung und die Vermittlung der Stressreaktionen verantwortlich (Reul und de Kloet, 1985; Arriza et al., 1988). Um diese zu realisieren, wird der GR ubiquitär im Körper in den meisten Zelltypen exprimiert, wobei er die höchste Dichte in definierten Bereichen des Gehirns hat. Dort kommt der GR vor allem in Zellen des zerebralen Kortex, des Thalamus, des paraventriculären Kerns des Hypothalamus und im Hippocampus vor.

Die gesamte neuroendokrine Stressreaktion über die HHN-Achse verläuft in unterschiedlichen Zeitabschnitten. Dabei erfolgt die Ausschüttung von CRH im Hypothalamus und die darauffolgende Synthese von ACTH in der Hypophyse innerhalb von 10 Sekunden (Van de Kar und Blair, 1999). Die Sekretion der Glukokortikoide aus der Nebennierenrinde ist zeitlich jedoch sehr variabel und erfolgt verzögert. Um dennoch auf Stresssituation angemessen schnell reagieren zu können, gibt es neben der HHN-Achse noch eine weitere, wichtige Stressachse, welche im Körper sehr viel schneller eine Stressantwort auslösen kann, die Sympathikus-Nebennierenmark-Achse.

Das im Hypothalamus ausgeschüttete CRH bewirkt neben der Synthese von ACTH in der Hypophyse auch die Ausschüttung von Noradrenalin im Locus coeruleus. Dies führt zu einer gesteigerten Sympathikusaktivität, wodurch umgehend die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nebennierenmark ins Blut sekretiert werden (siehe Abbildung 1.4). Zusammen mit neuronalen Signalen aus dem Sympathikus bewirken diese Hormone verschiedenste körperliche Reaktionen. Unter anderem wird dabei der Herzschlag erhöht, es kommt zur Glykolyse in Muskeln und Leber, Fettsäuren des Fettgewebes werden mobilisiert und die Blutgefäße der Skelettmuskeln erweitern

sich. All diese Maßnahmen führen zu einer gesteigerten, körperlichen Leistungsfähigkeit, um auf eine plötzliche Gefahrensituation möglichst schnell reagieren zu können.

Die Beendigung der neuroendokrinen und sympathischen Stressantwort erfolgt durch eine negative Rückkopplung zwischen den aus der Nebennierenrinde sekretierten Glukokortikoiden und den einzelnen Strukturen der HHN-Achse. Vor allem Kortisol bzw. Kortikosteron bewirkt mit der Bindung an spezielle Glukokortikoidrezeptoren im Hypothalamus, der Hypophyse und in Teilen des Amygdala/Hippocampus-Komplexes eine Hemmung der CRH-Sekretion im Hypothalamus und führt damit zu einer negativen Beeinflussung der HHN-Achse (De Kloet et al., 1998; Tsigos und Chrousos, 2002).

Dieser empfindliche Regelkreis stellt für jedes Individuum eine überlebenswichtige Funktion dar, denn er garantiert sowohl die schnelle Reaktion auf einen Stressor durch die Sekretion von Kortikosteron und anderen Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde, als auch eine möglichst zügige Rückkehr zur Homöostase durch die direkte Rückkopplung, um so wenig Energie wie möglich für eine angemessene Reaktion zu verbrauchen. Eine Fehlregulation der HHN-Achse hätte schwerwiegende Folgen für den gesamten Organismus. So würde eine chronische Hyperaktivierung der HHN-Achse und die damit verbundene dauerhafte Ausschüttung von Kortikosteron schnell zu einer Suppression des Immunsystems, zur Unterdrückung anaboler Prozesse im Körper und der damit verbundenen Erschöpfung der Energiereserven führen (Jacobson und Sapolsky, 1991; Kofman, 2002). Neben diesen metabolischen Effekten sind verschiedene neuronale Auswirkungen mit einer Fehlregulation der HHN-Achse assoziiert, welche teils zu psychologischen Erkrankungen führen. So konnte gezeigt werden, dass eine krankhafte Hyperaktivierung der HHN-Achse zum Beispiel durch chronischen Stress zu Depressionen (Kendler et al., 1999), Schizophrenie (Holtzman et al., 2013), bipolaren Störungen (Agnew-Blais und Danese, 2016) und Angsterkrankungen (Moreno-Peral et al., 2014) führen kann. Durch chronisch erhöhte Glukokortikoide als Folge einer Fehlregulation der HHN-Achse kann es auch auf zellulärer und molekularer Ebene zu pathogenen Veränderungen im Gehirn kommen. Vor allem in Kompartimenten mit einer hohen GR-Dichte tritt bei einer lang andauernden Stress-Exposition eine Atrophie der Dendriten auf, welche zusammen mit einer verringerten Neurogenese zu einer Abnahme der neuronalen Plastizität führt (Stockmeier et al., 2004; Lucassen et al., 2010; Sterner und Kalynchuk, 2010). Häufig führen diese Effekte in der betroffenen Hirnregion zu einer verringerten Funktionalität. Speziell der Hippocampus, welcher die höchste Dichte an GR im Hirn aufweist, ist davon betroffen. So konnte gezeigt werden, dass die durch Stress

induzierte verringerte neuronale Plastizität im Hippocampus zu eingeschränkten kognitiven Leistungen wie dem Orientierungssinn und dem Erinnerungsvermögen führt (Korte et al., 1995; Kim und Diamond, 2002; Sapolsky, 2003). Der Hippocampus hat für die negative Rückkopplung der HHN-Achse eine entscheidende Bedeutung, indem er inhibierend auf die CRH-Ausschüttung des Hypothalamus wirkt. Somit kann eine gestörte hippocampale Funktionalität sowohl Folge als auch Auslöser einer HHN-Achsen-Dysfunktion sein (Pittenger und Duman, 2008).

1.7. Der Hippocampus

Der Hippocampus ist Teil des limbischen Systems im Gehirn und liegt als bilaterale Struktur in beiden Hemisphären als Teil des medialen Temporallappens vor. Er ist eine zentrale Schaltstelle im Gehirn und ist vor allem für kognitive Fähigkeiten wie die Emotionsverarbeitung, die Verhaltenssteuerung und die Gedächtnisbildung verantwortlich. Dabei transferiert er Informationen aus dem Kurzzeitgedächtnis ins Langzeitgedächtnis, weshalb er auch als „Tor zur Erinnerung“ bezeichnet wird. Des Weiteren hat der Hippocampus bei Tieren eine große Bedeutung für die räumliche Orientierung und spielt wie in Abschnitt 1.6 erwähnt, eine wichtige Rolle in der Induktion und der negativen Rückkopplung der HHN-Achse.

Innerhalb der Klasse der Säugetiere ist die Anatomie, sowie der zytoarchitektonische Aufbau des Hippocampus weitestgehend konserviert (Manns und Eichenbaum, 2006). Insgesamt lässt sich der Hippocampus in drei verschiedene Areale unterteilen, welche zusammen auch als Hippocampusformation bezeichnet werden: dem Gyrus dentatus, das Cornu Ammonis und das Subiculum (siehe Abbildung 1.5).

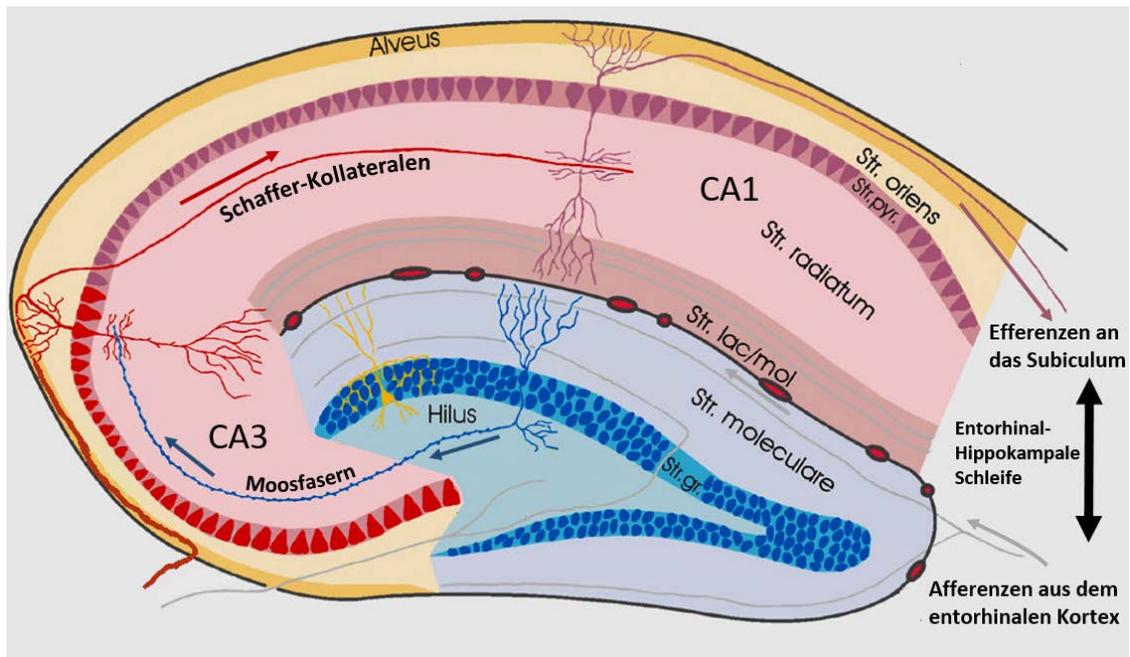


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Hippocampus.

Gezeigt ist eine vereinfachte Darstellung des Hippocampus mit den beiden Arealen Gyrus dentatus (bläulich) und Cornu Ammonis (rötlich). Die Pfeile markieren den Informationsfluss vom entorhinalen Kortex durch den Gyrus dentatus, über die Moosfaser und Schaffer-Kollaterale durch das Cornu Ammonis bis hin zum Subiculum. Die Körnerzellen sind in blau dargestellt und die Pyramidenzellen in rot in der CA3-Region bzw. in lila in der CA1-Region. Modifiziert nach (Veterinär-Anatomisches Institut Leipzig, 2017).

Der Gyrus dentatus ist für die initiale Informationsverarbeitung innerhalb der Hippocampusformation verantwortlich. Er empfängt Informationen aus dem benachbarten entorhinalen Kortex und projiziert diese, abhängig von der Intensität an die CA3-Region des Cornu Ammonis. Als trilaminare Struktur lässt sich der Gyrus dentatus in drei unterschiedliche Schichten einteilen: die äußere Molekularzellschicht (Stratum moleculare), die mittlere Körnerzellschicht (Stratum granulare) und der innere Hilus. Dabei machen die Körnerzellen den Großteil der hippocampalen Zellen aus. Diese liegen in der gleichnamigen Körnerzellschicht und bilden apikale Dendriten in die Molekularzellschicht und Axone (Moosfasern) in den Hilus aus. Die apikalen Dendriten der Körnerzellen empfangen in der Molekularzellschicht zahlreiche kortikale Afferenzen aus dem entorhinalen Kortex welche über den Tractus perforans in die Molekularzellschicht geleitet werden. Von den Körnerzellen des Gyrus dentatus werden

diese Signale weiter über sogenannte Moosfasern, durch den Hilus zum Cornu Ammonis geleitet.

Das Cornu Ammonis oder auch Ammonshorn erstreckt sich vom Gyrus dentatus C-förmig zum Subiculum. Entlang dieser Achse wird das Ammonshorn nochmals in drei Regionen unterteilt, beginnend am Gyrus dentatus mit der CA3-Region, über die CA2- zur CA1-Region am Übergang zum Subiculum. Es besteht ebenfalls aus drei unterschiedliche Schichten: dem Stratum radiatum, dem Stratum pyramidale und dem Stratum oriens. Wie beim Gyrus dentatus sind auch beim Ammonshorn die Zellsomata nur in einer der drei Schichten lokalisiert. In der zellreichen mittleren Schicht Stratum pyramidale liegen zahlreiche Pyramidenzellen, welche mit ihren apikalen Dendriten in das Stratum radiatum einstrahlen. In der CA3-Region empfangen diese Dendriten der Pyramidenzellen die Signale der Moosfasern aus dem Gyrus dentatus und leiten diese über Axone weiter. Zum einen werden die Efferenzen der CA3-Region zum Fornix projiziert, welcher die erste Ausgangsstruktur der Hippocampusformation bildet, zum anderen werden die Signale über spezielle Axone (Schaffer-Kollaterale) zur CA1-Region geleitet, von wo die Informationen an das Subiculum projiziert werden.

Sowohl der Fornix, als auch das Subiculum bilden somit die Ausgangspunkte für Efferenzen aus der Hippocampusformation. Vom Fornix aus werden die Signale an subkortikalen Regionen wie die Amygdala (Chrobak et al., 2000), den Hypothalamus, den Hirnstamm (Swanson und Cowan, 1977) und den Thalamus (Shibata, 1996) geleitet. Das Subiculum ist die zweite Hauptquelle für Efferenzen aus der Hippocampusformation. Von hier werden die zuvor im Gyrus dentatus und Ammonshorn prozessierten Informationen an kortikale Strukturen und zurück an den entorhinalen Kortex projiziert. Durch diese Rückkopplung an den entorhinalen Kortex entsteht ein Informationskreislauf, welcher auch als entorhinal-hippokampale Schleife bezeichnet wird. Dieser Schaltkreis ist entscheidend für Lernprozesse und für die Überführung von Informationen aus dem Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis. Durch wiederholte Aktivierung bestimmter Synapsen kommt es zu einer Verstärkung dieser, wobei gleichzeitig weniger genutzte Synapsen abgebaut werden. Dieser Vorgang wird auch als Langzeit-Potenzierung bezeichnet und ist verantwortlich für die Modulation der synaptischen Plastizität, welche für die Gedächtnisformation verantwortlich ist (Malenka und Bear, 2004).

Wie in Abschnitt 1.6 erwähnt, spielt der Hippocampus durch seine Verbindung zum Hypothalamus, die hohe Dichte an Glukokortikoidrezeptoren, sowie die Verarbeitung

von sensorischen Reizen auch eine entscheidende Rolle in der negativen Rückkopplung der HHN-Achse. Eine chronische Hyperaktivierung der HHN-Achse und die damit verbundene dauerhafte Sekretion von Kortikosteron ins Blut führt im Hippocampus zu einer Reduktion der Langzeitpotenzierung und einer verminderten Plastizität, was sich negativ auf das Gedächtnis auswirkt (Kim und Diamond, 2002; Sapolsky, 2003). Neben der subventrikulären Zone ist der Gyrus dentatus des Hippocampus die einzige Region im adulten Gehirn in der sich neuronale Stammzellen befinden und über die gesamte Lebenszeit Neurogenese stattfindet. Die proliferierten Zellen differenzieren sich innerhalb kürzester Zeit zu Körnerzellen aus und tragen zur neuronalen Plastizität im Hippocampus bei. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass es durch erhöhte Kortikosteron-Werte in Folge einer Hyperaktivität der HHN-Achse, zu einer Reduktion der hippocampalen Neurogenese und zu einer verlangsamten Differenzierung kommt. Auf Dauer wird die gesamte Funktion des Hippocampus beeinträchtigt, wodurch auch die negative Rückkopplung der HHN-Achse ausbleibt. Somit potenzieren sich chronisch hohe Kortikosteron-Werte und Hippocampus-Fehlfunktionen gegenseitig, was zu depressionsartigen Verhaltensstörungen, Angstverhalten und zu Einschränkungen in den kognitiven Funktionen, wie Lern- und Gedächtnisfunktionen führen kann (Gould et al., 1997; Kempermann, 2002; Lucassen et al., 2010).

Neben erhöhten Glukokortikoiden in Folge einer HHN-Achsen Fehlregulation können auch verschiedene andere Faktoren sich negativ auf den Hippocampus auswirken und seine Funktion beeinträchtigen. Der wichtigste molekulare Faktor für die korrekte Funktion des Hippocampus ist das Neurotrophin „*Brain-derived neurotrophic factor*“ (Bdnf).

1.8. „*Brain-derived neurotrophic factor*“ (Bdnf)

„*Brain-derived neurotrophic factor*“ (Bdnf) wurde 1982 erstmals von Barde und Kollegen als eines von vier Neurotrophinen beschrieben (Barde et al., 1982; Leibrock et al., 1989). Es wird ubiquitär im Gehirn exprimiert, wobei die Expression im Hippocampus am höchsten ist. Für die korrekte Funktion von neuronalen Netzwerken ist Bdnf von entscheidender Bedeutung. Es wirkt protektiv auf Neuronen und fördert damit den Erhalt embryonaler Nervenzellpopulationen (Schinder und Poo, 2000). Des Weiteren ist Bdnf in pre- und postsynaptischen Mechanismen involviert, welche die synaptische

Plastizität regulieren (Bramham und Messaoudi, 2005; Jourdi et al., 2009). So konnte gezeigt werden, dass Bdnf die Remodellierung vorhandener Dendriten-Verknüpfungen unterstützt (Bosch und Hayashi, 2012). Dieser Vorgang ist vor allem für die in Abschnitt 1.7 erwähnte Langzeitpotenzierung im Hippocampus wichtig. Die Funktionen von Bdnf machen es zum wichtigsten Neurotrophin für den Hippocampus und tragen dazu bei, dass Bdnf ein entscheidender Faktor für kognitive Funktionen wie das Lernvermögen und die Orientierung ist (Neeper et al., 1995; Linnarsson et al., 1997). Verringerte Bdnf-Mengen sind außerdem mit verschiedenen psychischen Erkrankungen, wie der Ausprägung von Angst und Depressionen, Schizophrenie und epileptischen Anfällen assoziiert (Chan et al., 2006; Ansorge et al., 2007; Owen et al., 2011). Neben diesen neurologischen Effekten scheint Bdnf auch in metabolischen Signalwegen von Bedeutung zu sein. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass *Bdnf* abhängig von der Belastung im Skelettmuskel exprimiert wird und als Protein die Oxidation von Fettsäuren beeinflusst (Matthews et al., 2009). Auch konnte nachgewiesen werden, dass Bdnf einen positiven Einfluss auf die Blutglukose-Regulation hat (Tonra et al., 1999).

Die Synthese und Expression von Bdnf ist im gesamten Nervensystem stark reguliert (Leibrock et al., 1989; Lessmann und Brigadski, 2009). Wie alle Neurotrophine wird Bdnf am Endoplasmatischen Retikulum als eine Vorstufe, dem preproBdnf, synthetisiert und anschließend zum Vorläuferprotein proBdnf prozessiert. Über den Golgi-Apparat wird proBdnf daraufhin in konstitutive oder sekretorische Vesikel transportiert, welche sowohl passiv, als auch aktiv, bzw. reguliert Bdnf sekretieren (Heymach et al., 1996; Mowla et al., 1999; Balkowiec und Katz, 2002). Die weitere Prozessierung von proBdnf zu mBdnf erfolgt durch proteolytische Prozessierungsschritte, welche sowohl intrazellulär, als auch extrazellulär realisiert werden können. Intrazellulär kann die Prozessierung im Trans-Golgi-Netzwerk durch die Endoprotease Furin oder in unreifen sekretorischen Vesikeln durch Proproteinkonvertasen erfolgen (Seidah et al., 1996; Mowla et al., 2001). Extrazellulär wird die Prozessierung durch die proteolytische tPA/Plasmin (engl.: *tissue plasminogen activator/plasmin*) Kaskade oder durch die Matrix-Metalloproteinasen -3, -7 und -9 realisiert (Lee et al., 2001; Pang et al., 2004). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass der größte Teil der Prozessierung von proBdnf zu mBdnf im Nervensystem extrazellulär erfolgt und abhängig von der neuronalen Aktivität ist (Pang et al., 2004; Nagappan et al., 2009).

Bis zum Jahr 2005 wurde davon ausgegangen, dass nur die mBdnf-Isoform biologisch aktiv ist. Dann konnten zwei verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass proBdnf

Apoptose in Neuronen induziert und Langzeit-Depression (LTD) im Hippocampus fördert (Teng et al., 2005; Woo et al., 2005). Aufgrund der gegensätzlichen Wirkung von proBdnf und mBdnf auf die Funktion von Neuronen, rückte die Regulation der Prozessierung von Bdnf und die Involvierung in Signalwegen stärker in den Fokus der Forschung, um mögliche neue Ansatzpunkte für die Behandlung neurologischer Erkrankungen zu finden (Lu et al., 2005).

Ihre Wirkung vermitteln proBdnf und mBdnf über zwei verschiedene Klassen von Rezeptoren: die Tyrosin Rezeptor Kinase B (TrkB) und den p75 Neurotrophin Rezeptor (p75^{NTR}).

Die Familie der Trk-Rezeptoren wurde erstmals als Onkoproteine in menschlichen Tumoren entdeckt und umfasst drei verschiedene Typen: TrkA, welcher als Rezeptor für NGF (engl.: *nerve growth factor*) fungiert, TrkB, als Rezeptor für mBdnf und Neurotrophin-4 (NT-4) und TrkC, als Rezeptor für Neurotrophin-3 (NT-3) (Martin-Zanca et al., 1986; Klein et al., 1989; Kaplan et al., 1991; Lamballe et al., 1991). TrkB als Rezeptor für mBdnf wird im gesamten Nervensystem exprimiert und besitzt im zytoplasmatischen Teil eine Tyrosin-Kinase, welche bei der Bindung von mBdnf für die Autophosphorylierung des Rezeptors verantwortlich ist (Allen et al., 1994; Nakagawara et al., 1995). Diese Phosphorylierung führt zur Interaktion mit den Proteinen SHC und PLC γ , welche daraufhin verschiedenen Signalwege aktivieren (siehe Abbildung 1.6) (Wu et al., 1996; Yamada et al., 2002). SHC aktiviert dabei den MAPK/Erk- und den PI3K/Akt-Signalweg und PLC γ aktiviert den PLC/PKC-Signalweg (Araki et al., 2000; Groth und Mermelstein, 2003; Ou und Gean, 2006). Jeder dieser Signalwege vermittelt eine unterschiedliche Wirkung, welche jedoch primär positiv auf die Funktion der Zelle wirkt. So fördert der PI3K/Akt-Signalweg die Proliferation sowie das Überleben von Neuronen und aktiviert zusätzlich den mTOR-Signalweg und infolgedessen die Proteinsynthese (Yamada et al., 2001; Takei et al., 2004). Der MAPK/Erk-Signalweg ist für die Regulation einer Vielzahl von Prozessen verantwortlich. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung dieses Signalwegs über mBdnf unter anderem das Wachstum (Sugimoto et al., 2001), die Differenzierung (Yin et al., 2010), die Zellinvasion (Zhang et al., 2010), den Schutz (Szatmari et al., 2007) und die Freisetzung von Neurotransmittern (Jovanovic et al., 2000) in Neuronen reguliert. Die Aktivierung des PLC γ -Signalwegs wiederum führt zu einer Freisetzung von intrazellulärem Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Cytoplasma, was zu einer Aktivierung der Kinase CaMKII führt, welche daraufhin den Transkriptionsfaktor Creb phosphoryliert

und damit aktiviert (Finkbeiner et al., 1997). Der PLC γ -Signalweg beeinflusst außerdem die Migration von Neuronen (Zhao et al., 2009) und die Aufrechterhaltung der neuronalen Plastizität (Groth und Mermelstein, 2003).

proBdnf vermittelt seine Wirkung über den membranständigen Rezeptor p75^{NTR}, welcher zu allen Neurotrophinen, beziehungsweise ihren Vorläufer proNGF, proNT-3, proNT-4 und proBdnf eine geringe Affinität aufweist (Chao et al., 1986; Terenghi, 1999; Reichardt, 2006). p75^{NTR} gehört zur Superfamilie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren und realisiert seine Wirkung nach der Aktivierung über drei verschiedene Signalwege: den NF κ B-, den Jun-Kinasen- und den RhoA-Signalweg (siehe Abbildung 1.6). Dabei führt die Aktivierung des Jun-Kinasen-Signalwegs zu einer verstärkten Expression von

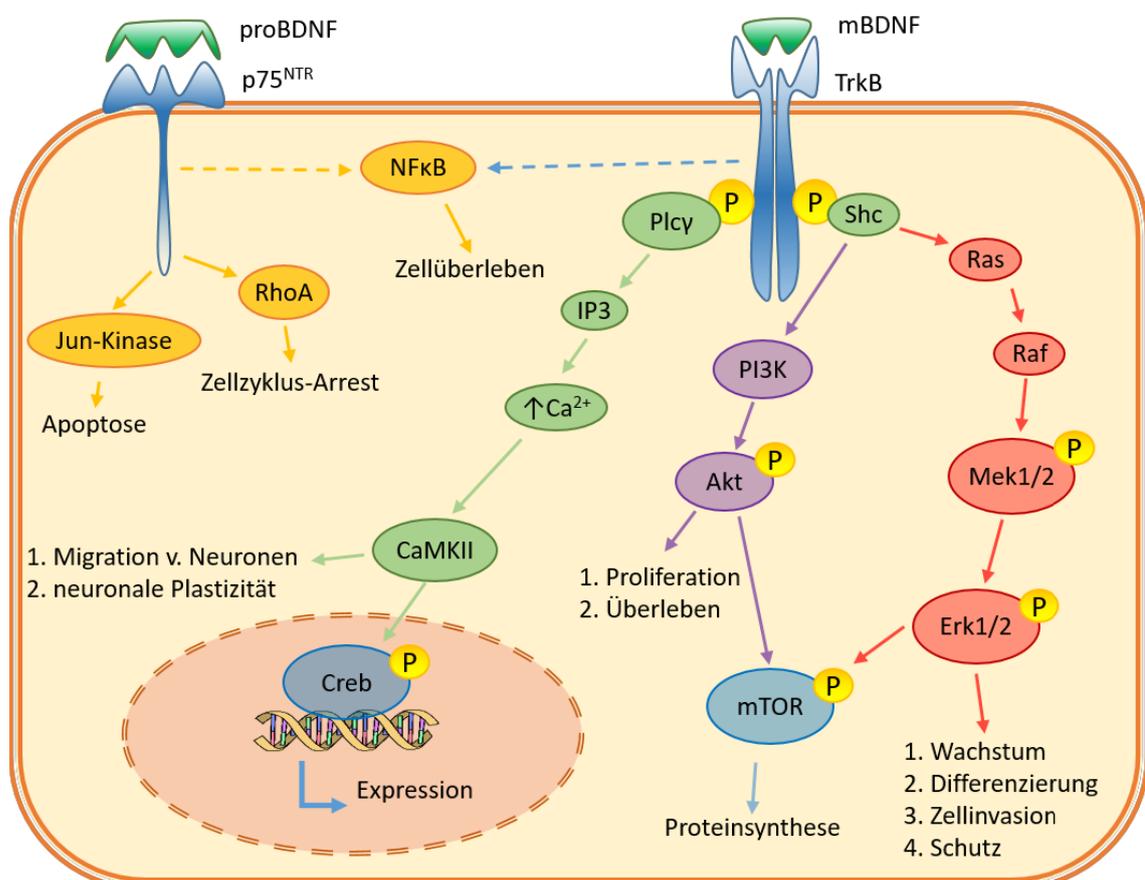


Abbildung 1.6: Schematischer Überblick der Signalwege von mBdnf und proBdnf im Hippocampus.

Dargestellt sind die verschiedenen Signalwege von mBdnf und proBdnf, sowie ihre Rezeptoren TrkB und p75^{NTR} und ihre unterschiedlichen Wirkungen. Für mBdnf ist der MAPK/Erk- (rot), der PI3K/Akt- (lila) und PLC γ -Signalweg (grün) skizziert. Für proBdnf sind die Signalmoleküle Jun-Kinase, RhoA und NF κ B in gelb dargestellt. Durch mBdnf aktivierte Signalwege sind hauptsächlich förderlich für die neuronale Plastizität im Hippocampus, während die Aktivierung von p75^{NTR} durch proBdnf primär negative Wirkungen vermittelt.

proapoptischen Genen und die Aktivierung von RhoA zu einem Zellzyklus-Arrest (Casaccia-Bonnet et al., 1996; Yamashita et al., 1999). Der NF κ B-Signalweg dagegen aktiviert Gene für das Zellüberleben, wobei gezeigt werden konnte, dass dieser Signalweg auch abhängig von der Aktivität des Trk-Signalwegs ist (Yoon et al., 1998; Hamanoue et al., 1999; Middleton et al., 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mBdnf und proBdnf gegensätzliche Effekte in Zellen auslösen, wobei durch mBdnf und TrkB primär Signalwege für das Zellüberleben, die Differenzierung und die neuronale Plastizität und durch proBdnf und p75^{NTR} Signalwege für Apoptose und Zellzyklus-Arrest aktiviert werden. Dieses komplexe Zusammenspiel wird reguliert durch die Prozessierung von proBdnf zu mBdnf, sowie durch weitere sekundäre Faktoren, wie zum Beispiel Stresshormone.

1.9. Zielsetzung

Vorangegangene Analysen konnten einen Zusammenhang zwischen Fto mit erhöhten Stresshormonen und begleitenden Verhaltensauffälligkeiten in Mäusen aufzeigen (Spsychala, 2013). Dies legt eine Funktion von Fto in dafür spezifischen Hirnarealen nahe. Der Hippocampus gilt als wichtigste Hirnregion für die negative Rückkopplung der HHN-Achse und ist für verschiedene kognitive Leistungen verantwortlich. Eine eingeschränkte Hippocampus-Funktion geht daher meist einher mit einer Dysregulation der HHN-Achse und Verhaltensauffälligkeiten, wie Depression und Lerndefizite. Zu Beginn dieser Arbeit waren keine Einflüsse von Fto auf den Hippocampus und die HHN-Achse bekannt. Zielsetzung dieser Arbeit war daher, den Einfluss von Fto auf den Hippocampus und die HHN-Achse zu evaluieren, um mögliche neue Funktionen von Fto aufzudecken und die Bedeutung von Fto für verschiedene Signalwege zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

Für die folgenden, molekularbiologischen Arbeiten wurde, falls nötig, hochreines Wasser aus einer Millipore-MilliQ-Anlage eingesetzt. Soweit erforderlich wurden die verwendeten Lösungen, Gefäße und Verbrauchsmaterialien durch Autoklavieren bei 121 °C, 2 bar für 30 Minuten sterilisiert. Geräte und Verbrauchsmaterialien, die in diesem Kapitel nicht benannt werden, sind üblich in einem molekularbiologischen Labor.

2.1. Arbeiten mit Mäusen

2.1.1. Tierschutz

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen an Mäusen wurden gemäß § 8 Abs. 1 des Deutschen Tierschutzgesetzes in der Neufassung des Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006, BGBl. I S. 1206 von Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV) genehmigt. Für die Durchführung der Versuche wurde gemäß § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes in der Neufassung vom 25.05.1998, BGBl. I S. 1105 eine ordnungsbehördliche Ausnahmegenehmigung erteilt.

2.1.2. Tierhaltung und Verpaarung

Die für diese Arbeit benötigten Mäuse wurden in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftlichen Tierschutzaufgaben (ZETT) der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten und gezüchtet. Die $Fto^{+/-}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäuse entstanden aus einer Verpaarung von weiblichen $Fto^{+/-}$ -NMRI-Mäusen mit männlichen $Fto^{+/-}$ -C57BL/6J-Mäusen, welche im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf generiert wurden (Fischer et al. 2009). Die Haltung erfolgte in Makrolon-Käfigen des Typs 2 bzw. 3, welche mit entstaubtem und entkeimtem Weichholzgranulat (Fa. Altromin, Lage/Lippe) ausgestreut waren, bei definierten Bedingungen von 22 – 24 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 – 80 %, sowie einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit, wobei die Intensität in der Helligkeitsphase im Käfig 50 bis 100 Lux erreichte. Das Futter bestand aus speziell für Ratten und Mäuse hergestellten Pellets (Alleinfuttermittel Haltung, Fa. Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und die Tiere hatten dauerhaft Zugang zu Futter und Trinkwasser *ad libitum*. Im Alter von 3 Wochen

wurden die Tiere durch Ohrmarkierungen nummeriert und Schwanzspitzen-Biopsien zur Genotypisierung genommen.

2.1.3. Präparation von Mäusen

Die Mäuse wurden im Alter zwischen 8 und 16 Wochen für die einzelnen Analysen präpariert. Hierzu wurden die Tiere zunächst in einer Kammer durch die Einleitung einer Inhalationsnarkose mit Isofluran getötet. Anschließend wurde der Thorax geöffnet, das Herz freipräpariert und das Blut aus dem rechten Ventrikel mit einer Spritze mit Kanüle entnommen. Um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern wurde die Spritze inklusive Kanüle zuvor mit 250 mM EDTA ausgespült. Das Blut wurde gekühlt und nach Beendigung der Präparation für 10 min bei 2000 x g zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Vor der weiteren Präparation wurden die Mäuse mit Hilfe einer Flügelkanüle mit 4 % PFA perfundiert. Anschließend wurde der Kopf der Maus abgetrennt und das Hirn heraus präpariert. Für die einzelnen Analysen wurde entweder das ganze Gehirn zur weiteren Verwendung in 4 % PFA überführt und bei 4 °C gelagert oder die beiden Hippocampi aus der rechten und linken Gehirnhälfte auf Eis isoliert und sofort in ein Eppendorf-Gefäß überführt und in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Verwendete Materialien:

EDTA:	250 mM in H ₂ O, pH 8	AppliChem #A2937.1000
4 % PFA:	4 % Paraformaldehyd in PBS (w/v)	Merck #8.18715
Spritze	0,01-1 ml, Omnifix-F	Braun #3B18048
Kanüle	0,45 x 25 mm	Braun #4657683
Flügelkanüle	0,8 x 19 mm, Surflo	Terumo #SV-21BL

2.1.4. Verhaltensanalysen

2.1.4.1. Radial Arm Maze

Die kognitive Leistung bezüglich des Arbeitsgedächtnisses der Mäuse wurde mit Hilfe eines 8-Arm Radial Maze analysiert (Morris, 1984). Dieses bestand aus einer oktogonalen zentralen Plattform und acht davon ausgehenden Armen. Die einzelnen Arme hatten einen Winkel von 45° zueinander und waren von undurchsichtigen Seitenwänden umgeben. Um die Orientierung der Tiere im Radial Maze zu gewährleisten wurden vier visuelle Landmarken an den Enden von vier der acht Arme kreuzständig angebracht. Außerdem befanden sich im Versuchsraum weitere distale visuelle Orientierungspunkte wie Regale, Tisch, Tür und Wand. Die Bewegungen der Tiere während des Versuchs wurden von einer Videokamera, welche ca. 1,5 Meter über dem Radial Maze montiert war, dokumentiert. Zu Beginn des Versuchs wurden die Mäuse einzeln in das Zentrum des Maze gesetzt, welches sie darauf hin für höchstens 5 Minuten frei explorieren durften. Idealerweise würden die Mäuse bei der Erkundung des Maze jeden Arm vom Zentrum aus genau einmal betreten, bevor sie in einen bereits erkundeten Arm erneut eintreten würden. Das Eintreten in einen bereits erkundeten Arm bevor alle 8 Arme einmal erkundet wurden, wurde dabei als Fehler definiert. Außerdem wurde die Zeit gemessen, welche das Versuchstier benötigte, um mindestens einmal alle acht Arme aufgesucht zu haben. Sowohl eine erhöhte Anzahl an Wiedereintritten in bereits besuchte Arme, als auch ein erhöhter Zeitaufwand für die Erkundung jedes Armes wurden dabei als Defizit in der Leistung des Arbeitsgedächtnisses verstanden. Die Auswertung erfolgte nach den Tests anhand der Videoaufnahmen. Zwischen den einzelnen Versuchsläufen wurde das Radial Maze mit 70 % Ethanol gereinigt.

2.1.4.2. Morris Water Maze

Die kognitive Leistung der Mäuse bezüglich des räumlichen Lernens und Gedächtnisses wurde mit Hilfe des Morris Water Maze-Test analysiert (Olton und Samuelson, 1976). Dieser Test gilt als Standard-Paradigma für die Quantifizierung der Hippocampus-abhängigen Gedächtnisleistung bei Nagetieren und beruht auf dem Prinzip, dass die Tiere in einem mit Wasser gefüllten Becken eine unter der Wasseroberfläche versteckte Plattform finden müssen, welche es ihnen ermöglicht aus dem Wasser zu entkommen. Dabei soll sich die Position der Plattform anhand von stabilen visuellen

Orientierungspunkten gemerkt werden, sodass diese nach mehreren Versuchsdurchgängen von den Tieren schneller gefunden werden kann. Im Vergleich zu anderen Gedächtnistests hat der Morris Water Maze den Vorteil, dass die Tiere automatisch eine aversive Lernmotivation aufweisen, da durch die erzeugte Stresssituation ein möglichst schnelles Verlassen des Wassers von den Tieren angestrebt wird.

Für die Durchführung des Tests wurde ein rundes Becken mit einem Durchmesser von ca. 130 cm genutzt. Dieser wurde mit 19-22 °C warmen Wasser bis zu einer Höhe von 25 cm gefüllt und das Wasser durch die Zugabe von Titandioxid eingetrübt. Die 1 cm unter der Wasseroberfläche versteckte Plattform hatte einen Durchmesser von 10 cm und war an der Oberseite mit einem Stück weißen Styropor beklebt, um den Tieren einen sicheren Halt zu gewährleisten. Zur Orientierung wurden vier unterschiedliche visuelle Orientierungspunkte kreuzständig am Rand des Beckens angebracht. Des Weiteren konnten die Tiere sich an distalen Orientierungspunkten im Raum orientieren, welche aus Regalen, Tisch, Tür und Wand bestanden. Aufgrund einer Klimaanlage im Raum konnten die Tiere sich auch an einem auditiven Reiz orientieren. Der Test fand über einen Zeitraum von 5 Tagen statt, wobei jedes Tier pro Tag einmal getestet wurde. Es wurde dafür mit dem Kopf zum Rand des Beckens täglich an unterschiedlichen Punkten ins Wasser gesetzt und durfte für maximal 180 Sekunden das Becken erkunden. Wenn nach dieser Zeit die Plattform nicht erreicht werden konnte, wurde das Tier manuell zur Plattform geführt. Nach Erreichen der Plattform durften die Tiere 10 Sekunden auf dieser verweilen um sich zu orientieren und die Position zu merken. Der ganze Versuch wurde mit Hilfe einer Kamera, welche über dem Becken montiert war videodokumentiert und anschließend ausgewertet, indem die Zeit bis zum Erreichen der Plattform gemessen und zwischen den Tieren verglichen wurde.

2.1.4.3. Enriched Environment

Um zu untersuchen, in wie weit Fto die Auswirkungen von sensorischen Reizen auf die neuroendokrine Stressantwort und Bdnf beeinflusst, wurde eine Gruppe von Mäusen für 6 Wochen unter Enriched Environment Bedingungen gehalten und anschließend mit Mäusen aus Standard-Haltungsbedingungen verglichen. Beim Enriched Environment handelt es sich um Haltungsbedingungen mit erhöhter kognitiver, sensorischer und motorischer Stimulation, welche sowohl Einfluss auf die neuroendokrine Stressantwort,

als auch auf die Neuroplastizität und Expressionsmuster im Hippocampus haben können (Tang et al., 2001; Lee et al., 2003; Rossi et al., 2006). Für das Enriched Environment wurden die Tiere in einem größeren Käfig (Makrolonkäfig Typ 4) gehalten, welcher mit Gegenständen bestückt war, die das Explorationsverhalten der Tiere fördert. Dazu zählten verschiedene Tunnel aus Holz und Pappe, Zellstofftücher für den Nestbau, kleine Kunststoffbälle, Klettermöglichkeiten sowie 2 Glocken für die akustische Stimulation. Außerdem war der Käfig mit einem Laufrad ausgestattet, um den Tieren eine erhöhte motorische Stimulation zu bieten. Neben diesen räumlichen Veränderungen erfuhren die Tiere eine gesteigerte soziale Interaktion durch eine erhöhte Gruppengröße von 8 Tieren im Käfig. In dieser Arbeit wurden die Tiere im Alter von 4 Wochen für insgesamt 6 Wochen unter diesen Bedingungen gehalten. Dabei wurden alle Bestandteile des Käfigs einmal wöchentlich gereinigt und in einer neuen Variante arrangiert, um eine Gewöhnung zu vermeiden. Das Gewicht der Tiere wurde zu Beginn des Enriched Environment und von da an jeweils einmal wöchentlich dokumentiert. Als Kontrolltiere dienten Mäuse, welche im selben Alter unter Standard-Bedingungen (siehe 2.1.2) in einer Gruppengröße von drei Tieren gehalten wurden. Nach sechs Wochen unter Enriched Environment wurden die Tiere präpariert (siehe 2.1.3) und das Blutplasma bezüglich der Kortikosteron-Menge und der Hippocampus bezüglich der Bdnf-Menge analysiert.

2.2. Isolation und Aufreinigung von Nukleinsäuren

In dieser Arbeit wurden sowohl Desoxyribonukleinsäuren (DNA), als auch Ribonukleinsäuren (RNA) aufgereinigt und analysiert. Dabei wurde besonders beim Arbeiten mit RNA darauf geachtet, möglichst zügig und bei niedrigen Temperaturen (auf Eis) zu arbeiten, um ein Degradieren der RNA durch RNasen, welche als Teil unseres Immunsystems zum Beispiel auf der menschlichen Haut vorkommen, zu verhindern.

2.2.1. DNA-Isolation und Aufreinigung aus Schwanzspitzenbiopsien

Zur Isolierung der DNA aus den Schwanzspitzenbiopsien wurden diese in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 750 µl „Tail“-Puffer und 30 µl Proteinase-K versetzt. Zum vollständigen Zell- und Membranaufschluss erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 56 °C unter leichtem Schütteln. Am nächsten Tag wurde dem Ansatz 250 µl gesättigte NaCl-Lösung (>6 M) hinzugefügt, der Ansatz invertiert und 10 min bei 13000 U/min

zentrifugiert (Eppendorf #5415D). Dadurch wurden ausgefällte Proteine, Salze und Haare pelletiert. Aus dem Überstand wurden 750 µl entnommen, in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol präzipitiert. Durch eine anschließende 10-minütige Zentrifugation bei 13000 U/min wurde die DNA pelletiert, der Überstand verworfen und die pelletierte DNA durch die Zugabe von 500 µl 70 %igem Ethanol und einer erneuten Zentrifugation über 10 Minuten bei 13000 U/min gewaschen. Abschließend wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet eine halbe Stunde bei 50 °C getrocknet, bevor es in 300 µl ddH₂O resuspendiert wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurde die gelöste DNA bei 4 °C aufbewahrt.

Verwendete Materialien:

Tail-Puffer:	100 mM NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 8 100 mM EDTA 1 % SDS (w/v)	
SDS		Serva Electrophoresis #20760
HCl		Prolabo #20252.290
Tris		Prolabo #103156
ProtK	10 mg/ml	Roche #1000144
EDTA		AppliChem #A2937.1000
NaCl-Lösung, gesättigt:	NaCl, >6 M demin. H ₂ O	Prolabo #27810.295
Isopropanol		Fuka #59300
70 % Ethanol	70 ml Ethanol 30 ml demin. H ₂ O	Sigma-Aldrich #32213

2.2.2. RNA-Isolation aus dem Hippocampus

Je nach Analyse wurden die Hippocampi im Alter zwischen 8 und 16 Wochen heraus präpariert, direkt in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert. Die Homogenisierung der Hippocampi erfolgte mit Hilfe des Precellys24-Dual Systems (Peqlab Biotechnologie, #EQ03119.200.RD000.0). Dafür wurden die Organe mit 600 µl RLT Puffer und β-Mercaptoethanol (1/100) versetzt und anschließend im Precellys24-

Dual bei 5000 U/min für 30 Sekunden homogenisiert. Der Precellys24-Dual wurde zuvor mittels Cryolys (Peqlab Biotechnologie, EQ05068-200-RD000.0) auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurden die Zellfragmente mittels 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 U/min pelletiert, der RNA-haltige Überstand in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und mit 350 µl 70 % Ethanol versetzt und gemischt. Das Lysat wurde danach auf eine Säule gegeben, für 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um Verunreinigungen der RNA durch genomische DNA zu verhindern, wurde daraufhin ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurden die Säulen mit 350 µl RW1-Puffer beladen und 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden 80 µl eines DNase-Gemischs (hergestellt nach den Angaben des Herstellers) auf die Säulen gegeben und diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgten 2 Waschschrte mit je 350 µl und 700 µl RW1-Puffer und anschließender Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10000 U/min. Abschließend wurden die Säulen 2-mal mit 500 µl RPE-Puffer beladen und je 15 Sekunden bei 10000 U/min zentrifugiert. Bis zu diesem Schritt wurden alle Durchflüsse verworfen. Die RNA wurde schließlich, nach einem erneuten Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 10000 U/min, mit Hilfe von RNA-freiem Wasser aus der Säule gewaschen und in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt. Hierzu wurden die Säulen 2-mal mit je 15 µl RNase-freiem Wasser beladen und je 1 Minute bei 10000 U/min zentrifugiert. Die Konzentration der aufgereinigten RNA wurde direkt im Anschluss mittels spektralphotometrischer Konzentrationsbestimmung analysiert (siehe 2.2.3). Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C aufbewahrt.

Verwendete Materialien:

70% EtOH	70 ml Ethanol, 30 ml demin. H ₂ O	Sigma-Aldrich #32213
RNase-Free DNase Set		Qiagen #79254
RNeasy Kit		Qiagen #74104

2.2.3. Spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmungen der in Abschnitt 2.2.2. isolierten RNA-Proben erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers (Pharmacia, Ultrospec2000). Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die Messung der Absorption erfolgte in einer Quarzglasküvette (Japan Spectroscopic Co.) mit einer Schichtdicke von 1 cm. Eine Absorptionseinheit A_{260} entspricht dabei nach Abzug des Referenzwertes für das verwendete Lösungsmittel einer Konzentration von ca. 25 $\mu\text{g RNA/ml}$.

2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) wurde 1987 von Kary B. Mullis entwickelt. Mit dieser Methode ist es möglich, selbst geringste Mengen DNA *in vitro* zu amplifizieren. Durch den Einsatz von sequenzspezifischen Primern gelingt es, aus einem Gemisch von Nukleinsäuren nur bestimmte Sequenzabschnitte auf der DNA zu amplifizieren. Dafür werden die DNA-Doppelstränge einer Ausgangsprobe (Template) durch kurzzeitiges Erhitzen voneinander getrennt. Bei einer definierten Temperatur lagern sich die sequenzspezifischen Primer an das 3'- und 5'-Ende des zu amplifizierenden Bereiches der DNA-Einzelstränge an. Dieser Vorgang wird auch als Annealing bezeichnet. Die Primer fungieren als künstlich geschaffene Ansatzpunkte für eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, welche an das freie 3'-OH-Ende der Primer bindet. DNA-Polymerasen gehören zur Gruppe der Replikasen und kommen in allen Lebewesen vor. Sie sind verantwortlich für die Replikation der DNA vor jeder Zellteilung. Dazu nutzen sie den vorhandenen DNA-Einzelstrang als Matrize und katalysieren die Verknüpfung neuer Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) zu einem neuen, komplementären Strang unter Abspaltung von Diphosphaten. Dieser Schritt wird auch als Elongation bezeichnet. So entstehen aus den beiden zuvor getrennten DNA-Einzelsträngen zwei neue DNA-Doppelstränge. Diese werden im nächsten Zyklus erneut voneinander getrennt und wieder als Matrize von der DNA-Polymerase genutzt. Es kommt zu einer exponentiellen Amplifikation des, durch die Primer festgelegten, DNA-Abschnittes. Zusammenfassend lässt sich die PCR in folgendes Schema unterteilen:

1. Denaturierung: Auftrennung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge.

2. Annealing: Anlagern spezifischer Primer am 5'- und 3'-Ende des zu amplifizierenden Bereiches der als Einzelstränge vorliegenden DNA.
3. Elongation: Verlängern der angelagerten Primer mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase bei Anwesenheit freier dNTPs.

Diese drei Phasen werden in mehreren Zyklen durchlaufen. Um eine automatisierte und ununterbrochene Durchführung der PCR zu ermöglichen, sind alle heutzutage eingesetzten DNA-Polymerasen hitzestabil. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurde ausschließlich die sogenannte P-*Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus* verwendet, welche im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Tiere an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nach dem Protokoll von Pluthero et al., 1993 hergestellt wurde.

2.3.1. PCR-Amplifikation

Alle Reaktionen wurden in dünnwandigen 0,2 ml PCR-Gefäßen in Thermocyclern der Marke MWG Biotech (Primus 25) oder Eppendorf (Mastercycler Gradient) realisiert. Für die Genotypisierung des *Fto*-Genotyps wurden zwei unabhängige PCRs durchgeführt, eine mit *Fto*-Primern, welche das wildtypische, intakte Allel amplifizieren und eine mit *Neo*-Primern, welche eine, zur Inaktivierung in das *Fto*-Gen eingesetzte, Neomycin-Kassette amplifizieren. Zur Kontrolle der PCR und des *Fto*-Genotyps wurde neben der Template-DNA zusätzlich eine Positiv- (bekannte DNA einer *Fto*^{+/-}-Maus) und eine Negativkontrolle (H₂O anstelle der Template DNA) angesetzt. Es wurden Standardansätze mit einem Volumen von 20 µl eingesetzt. Die einzelnen Bestandteile für den PCR-Ansatz wurden wie folgt zusammengesetzt:

2.3.2. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Für die Genotypisierung wurden folgende Primer verwendet:

Tabelle 2.3: verwendete Primersequenzen (von 5' nach 3')

Bezeichnung	Sequenz	Methode
FtoKO <i>fwd.</i>	CGCCTCTCCCCCATCTAAATCCT	<i>Fto</i> -Genotypisierung
FtoKO <i>rev.</i>	AAGCCAAGAACAAGTCCATACCTG	<i>Fto</i> -Genotypisierung
Neo <i>fwd.</i>	CTGTGCTCGACGTTGTCCTG	<i>Fto</i> -Genotypisierung
Neo <i>rev.</i>	GATCCCCTCAGAAGAAGTCTG	<i>Fto</i> -Genotypisierung

Für semiquantitative PCR-Analysen wurden nachstehende Primer verwendet:

Tabelle 2.4: Primersequenzen für semiquantitative PCR-Analysen (von 5' nach 3')

Bezeichnung	Sequenz	Methode
Hprt <i>for.</i>	CACAGGACTAGAACACCTGC	<i>Hprt</i> -Abgleich
Hprt <i>rev.</i>	GCTGGTGAAAAGGACCTCT	<i>Hprt</i> -Abgleich

2.3.3. Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird zuvor isolierte RNA mittels einer speziellen Polymerase in komplementäre DNA (Abk.: cDNA) umgeschrieben. Die aus Viren stammende Polymerase nutzt dabei die vorhandene RNA als Matrize und kann mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase-Aktivität einen komplementären DNA-Strang transkribieren. Anschließend wird der RNA-Anteil dieses RNA-DNA-Hybridstrangs über eine unspezifische Endoribonuklease-Aktivität der reversen Transkriptase hydrolysiert. Abschließend wird der freie DNA-Einzelstrang als Matrize genutzt und durch eine zusätzliche inhärente DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität der reversen Transkriptase zu einem DNA-Doppelstrang synthetisiert.

In dieser Arbeit wurde die reverse Transkription mit Hilfe des „*Expand Reverse Transcriptase*“-Systems (Roche #11785826001) realisiert. Es wurde ca. 1 µg Hippocampus-RNA und 25 pmol Oligo(dT)-Oligonukleotide (Sequenz: 5'-TTT TTT

TTT TTT TTT T-3') in einem 10,5 µl Ansatz für 10 Minuten bei 65 °C in einem Thermocycler (Eppendorf Mastercycler Gradient) inkubiert. Anschließend erfolgte die reverse Transkription für 1 Stunde bei 42 °C nach Angaben des Herstellers. Für jede Reaktion lag folgender Ansatz zugrunde:

- 2 µl dNTPs (10 mM)
- 2 µl DTT
- 4 µl 5x Puffer
- 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl)
- 1 µl Reverse Transkriptase (50 U/µl)

Verwendete Materialien:

Expand Reverse Transcriptase	Roche #11785826001
Oligo(dT)-Oligonukleotide	MWG
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas #E00382

2.3.4. Quantitative „Real-time“-PCR-Untersuchungen

Die sogenannte „Real-time“-PCR basiert auf der von K. B. Mullis 1986 entwickelten herkömmlichen PCR. Bei dieser Abwandlung handelt es sich um eine quantitative PCR-Methode, welche es ermöglicht, primer-spezifisch die neu gewonnene DNA in der exponentiellen Phase von Zyklus zu Zyklus zu quantifizieren. Diese Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenz-Messungen am Ende der Elongation von jedem Zyklus. Die neu synthetisierte DNA wird dafür fluoreszierend markiert, so dass die Intensität der Fluoreszenz mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt. Dafür hybridisieren nicht nur sequenzspezifische Primer bei Temperaturen > 50 °C an einem Ziel-DNA-Strang, sondern auch einzelsträngige Oligonukleotide (Sonden), welche an ihren Enden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Für diese Fluoreszenzmarkierung können unterschiedliche Farbstoffe und Sonden verwendet werden. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen für die „Real-time“-PCR verwendet: sogenannte TaqMan-Sonden und SYBR-Green I.

Die TaqMan-Sonden sind am 5'-Ende mit einem Donor-Fluorochrom (im Falle der TaqMan-Sonden als „Reporter“ bezeichnet) markiert, welches durch eine Lichtquelle angeregt werden kann und einen Teil der frei werdenden Energie in Form von Fluoreszenz abgibt. Am 3'-Ende sind die Sonden über eine Thymidin-Base mit einem

Akzeptor-Fluorochrom (bei TaqMan-Sonden „Quencher“ genannt) markiert, welches einen Teil der vom Reporter freiwerdenden Energie aufnimmt. Durch diesen auch als „*Fluorescence resonance energy transfer*“ (FRET) bezeichneten Vorgang wird das Fluoreszenzsignal des Reporters während der PCR bis zur Annealing-Phase durch die Nähe zum Quencher bei einer intakten Sonde unterdrückt. Da die *Taq*-Polymerase außer ihrer Polymerase-Aktivität auch eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, kommt es in der Elongationsphase während der Synthese des komplementären Stranges am 5'-Ende zu einem Abbau der Sonde. Dabei wird der Reporterfarbstoff von der DNA abgelöst. Dies führt zu einer Vergrößerung des Abstandes zwischen dem Reporterfluorophor und dem Quencher, was wiederum zu einer Zunahme des Fluoreszenzsignals des Reporters führt. Auf diese Weise kommt es zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals entsprechend der vorhandenen Amplifikatsmenge.

Bei der SYBR-Green I-Methode nutzt man den Cyaninfarbstoff SYBR-Green, welcher in die kleine Furche von doppelsträngiger DNA interkalieren kann und durch Anregung grünes Licht bei 521 nm emittiert. Während der „*Real-time*“-PCR kommt es dadurch zu einem direkten Anstieg der Fluoreszenz proportional zur Anzahl der neu erzeugten PCR-Amplifikate.

Bei der Verwendung der TaqMan-Sonden wurde die cDNA in ein Gemisch aus TaqMan Universal PCR Master Mix, TaqMan Assay (Gen-spezifische Primer + Sonde) und H₂O gegeben.

Der Ansatz hatte folgendes Format:

3 µl cDNA

6 µl H₂O

10 µl TaqMan Universal PCR Master Mix

1 µl TaqMan Assay (Gen-spezifischer Primer + Sonde)

Folgende TaqMan Assays wurden verwendet:

Tabelle 2.5: Bestellnummern der verwendeten TaqMan Assays

Name des Gens	Name des Herstellers	Bestellnummer des TaqMan Assays
<i>Bdnf</i>	Applied Biosystems	Mm04230607_s1
<i>Gapdh</i>	Applied Biosystems	Mm99999915_g1

Für die „Real-time“-PCR mittels SYBR Green wurden folgender Ansatz und folgende Komponenten verwendet:

12,5 µl	SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)
0,75 µl	Forward Primer (0,3 µM)
0,75 µl	Reverse Primer (0,3 µM)
1 µl	cDNA Template (≤500 ng)
10 µl	H ₂ O (nuclease free)
25 µl	TOTAL

Tabelle 2.6: Verwendete Komponenten der SYBR Green "Real-time"-PCR

Produkt	Name des Herstellers	Bestellnummer
SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)	Thermo Fisher	#K0221
Mmp3 Primer	Sigma-Aldrich	#M_Mmp3_1
Mmp7 Primer	Sigma-Aldrich	#M_Mmp7_1
Mmp9 Primer	Sigma-Aldrich	#M_Mmp9_1

Die „Real-Time-PCR“ erfolgte im „StepOne Real-Time PCR System Thermal Cycling Block“ (Applied Biosystems #4376357). Dabei wurden alle Proben als Triplikate gemessen. Für die Quantifizierung der Amplifikationsraten der untersuchten Gene wurden die Messwerte als Ct-Werte (*Cycle Threshold*, zu Deutsch: Schwellenwert-Zyklus) angegeben. Diese beschreiben den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Um Unterschiede der absoluten cDNA-Menge in jeder Probe zu normalisieren, wurde neben dem Zielgen auch ein konstitutives Gen für jede Probe gemessen. Die

Quantifizierung der PCR erfolgte relativ mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Dabei werden die Ct-Werte des Haushalts-Gens von den Ct-Werten des zu untersuchenden Gens abgezogen. Die daraus resultierenden ΔCt -Werte der einzelnen Proben (wildtypischer, *Fto*-heterozygoter oder *Fto*-defizienter Hippocampus) werden anschließend erneut voneinander abgezogen, wodurch sich der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert ergibt. Dieser wird abschließend in die Gleichung „n-fache Expression (wildtypischer Hippocampus zu *Fto*-heterozygotem oder *Fto*-defizientem Hippocampus) = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ “ eingesetzt.

Verwendete Materialien:

TaqMan Universal PCR Master Mix

Applichem #A1091

2.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung der in der PCR amplifizierten Fragmente erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Bei diesem Verfahren werden die DNA-Moleküle in einem Agarosegel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Dabei wird sich zu Nutzen gemacht, dass DNA-Moleküle, aufgrund ihrer nach außen gerichteten Phosphatreste, im Grundgerüst negativ geladen sind und damit in einem elektrischen Feld in Richtung Anode (Pluspol) wandern. Die Trennung der DNA-Fragmente ihrer Größe nach erfolgt dabei durch die vernetzten Polymerketten des Agarosegels. Diese wirken wie ein engmaschiges Netz und bewirken, dass die Laufgeschwindigkeit kleiner DNA-Moleküle höher ist als die größerer DNA-Moleküle.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Agarosegele mit einer Konzentration von 1 % in TAE-Puffer verwendet. Dafür wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 % TAE-Puffer aufgekocht und dem noch flüssigen Agarosegel 0,05 $\mu\text{l/ml}$ GelRed zugesetzt. Dieses interkaliert während der Trennung in die DNA und verändert dadurch sein Anregungsspektrum, was für die spätere Detektion der Nukleinsäuren nötig ist. Das flüssige Gel wurde in einen Schlitten gegossen in dem die Proben-Taschen durch einen Kamm ausgespart wurden. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Schlitten in eine mit 1 % TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt. Die in der PCR amplifizierten Fragmente wurden in die Ladetaschen des im TAE-Puffer liegenden Agarosegels aufgetragen und bei einer Spannung von 120 V getrennt. Abschließend wurden die DNA-Fragmente durch die Fluoreszenz des interkalierten GelReds unter UV-

Licht (254 nm) sichtbar gemacht und mit einer PC gestützten Videodokumentationsanlage fotografiert.

Verwendete Materialien:

Agarose: PeQLab #35-120
GelRed:
TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat
2 mM EDTA
pH 8.2

2.5. Zellkulturtechniken

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-primären mausembryonalen Fibroblasten (MEFs) aus der Tg104N-Mauslinie gearbeitet. Die Zellen wurden zuvor bei -196 °C in flüssigem Stickstoff in einem Isoliertank aufbewahrt. Die anschließende Kultivierung erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % (v/v) CO₂. Alle verwendeten Medien wurden vor dem Gebrauch in einem sterilen Wasserbad auf 37 °C erwärmt und die Arbeiten erfolgten an einer sterilen Arbeitsbank (Heraeus, HeraSafe12).

Verwendete Materialien:

Kultivierungsmedium DMEM Gibco #41965
Streptomycin/Penicillin (30 U/ml) Gibco #15140-114
L-Glutamin (200 mM) Gibco # 25038-024
Nicht-essentielle Aminosäuren NEAA (100 mM) Gibco #11140-035
Natrium-Pyruvat (100 mM) Gibco #11360-039
50 ml fötales Kälberserum (FCS) PAA Laboratories #A15-080
Trypsin Invitrogen #25300
Zellkultur-PBS Biochrom #L1820

2.5.1. Kultivierung und Passagieren von MEFs

Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese in 10 cm Zellkulturschalen mit Kulturmedium überführt und bei 37 °C bei 5 % (v/v) CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden täglich auf ihre Konfluenz überprüft und das Medium spätestens nach 3 Tagen abgesaugt und durch frisches ersetzt. Wenn eine sehr dichte Konfluenz erreicht war, wurden die Zellen passagiert und verdünnt, um ein frühzeitiges Absterben zu verhindern. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen durch die Zugabe von 3 ml Trypsin und einer 4-minütigen Inkubation bei 37 °C vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Die Trypsinisierung wurde durch Zugabe von frischem Medium abgestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 800 U/min. pelletiert (Heraeus, Megafuge 1.0), das Medium im Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert. Abschließend wurden die Zellen im gewünschtem Verhältnis auf neue Zellkulturschalen aufgeteilt. Die Passagenzahl der Zellen ergibt sich aus der Anzahl der durchgeführten Überführungen auf eine neue Zellkulturschale. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden alle Zellen bis zur Passage 5 passagiert.

2.5.2. Kultivierung der Zellen auf Deckgläschen und Induktion der Ziliogenese

Für die Durchführung von Immunfluoreszenzanalysen mussten die Zellen auf Deckgläschen umgesetzt und fixiert werden. Dafür wurden die Zellen nach der Passage 4 auf autoklavierte Deckgläschen in 24-Loch-Platten inkubiert. Sobald die Zellen die gewünschte Konfluenz auf den Deckgläschen erreicht hatten, wurde die Ziliogenese durch einen Serumentzug von 24 Stunden induziert. Dazu wurde das alte Zellkulturmedium abgesaugt und durch neues mit nur 0,5 % FCS ersetzt. Die durch den Serumentzug ausgelöste Stresssituation in den Zellen veranlasst diese daraufhin zur Ausbildung von Zilien. Abschließend wurden die Zellen nach 24 Stunden für die jeweilige Immunfluoreszenzanalyse entweder mit Methanol für 5 Minuten bei -20 °C oder mit 4 % PFA für 60 Minuten bei 4 °C fixiert, mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in PBS bei 4 °C aufbewahrt.

2.6. Immunfluoreszenzanalysen

Mit dieser Methode können spezifische Zellen oder Proteine mittels Antikörper/Antigen-Bindungen selektiv sichtbar gemacht werden. Dazu binden spezifische Antikörper an Epitope des gewünschten Proteins (Antigens), welche daraufhin durch Spezies-spezifische Zweitantikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, detektiert werden können. Der Nachweis der untersuchten Proteine erfolgt daraufhin unter einem Fluoreszenzmikroskop, welches das am Zweitantikörper gekoppelte Fluorochrom mit definierten Licht-Wellenlängen anregt und somit sichtbar macht.

2.6.1. Immunfluoreszenzanalysen auf Zellen

Nach der Fixierung der Zellen auf Deckgläschen folgte ein 3-fach wiederholter Waschschrift mit PBS, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation in 0,5 % PBS-T zur Permeabilisierung der Zellmembran der Zellen. Nach weiteren drei Waschschriften mit 0,1 % PBS-T wurden die Zellen für 10 Minuten in 10 % Eseserum/PBS-T inkubiert um unspezifischen Bindungen vorzubeugen. Anschließend folgte die Inkubation mit den entsprechenden Erstantikörpern in 10 % Eseserum/PBS-T verdünnt über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut 3-fach mit 0,1 % PBS-T gewaschen, um die restliche Erstantikörperlösung zu entfernen. Es folgte eine 2 stündige Inkubation mit dem entsprechenden Zweitantikörper verdünnt in 10 % Eseserum/PBS-T bei Raumtemperatur und drei anschließende Waschschriften mit 0,1 % PBS-T. Abschließend wurden die Zellen mit Mowiol, welches falls nötig mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) versetzt wurde, auf Objektträgern eingedeckelt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

Für die Antikörperfärbungen auf Zellen wurden folgende Erstantikörper verwendet:

Tabelle 2.7: Für die Färbung auf Zellen verwendete Erstantikörper

Erstantikörper	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
anti-Ift88	1:100	Proteintech	13967-1-AP
anti-acetyliertes- α -Tubulin	1:2000	Santa Cruz	sc-23950

Folgende Fluorochrom-gekoppelte Zweitantikörper wurden verwendet:

Tabelle 2.8: Für die Färbung auf Zellen verwendetet Zweitantikörper

Zweitantikörper	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
Alexa Fluor® 488-konjugiert Esel anti-Maus IgG	1:200	Dianova	715-545-151
Cy®3-konjugiert Esel anti-Kaninchen IgG	1:200	Dianova	711-165-152
DyLight® 405-konjugiert Esel anti-Ziege IgG	1:50	Dianova	705-475-003

Verwendetet Materialien:

Mowiol	5 g Mowiol in 20 ml PBS gelöst 10 ml Glyzerin	Polysciences #17951
DAPI-Lösung	DAPI-Reagenz in PBS (0,1 µg/ml)	Merck #1246530100
PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl gelöst in ddH ₂ O pH 7,3 autoklav., 121°C, 2 bar; 30 min.	
Paraformaldehyd (PFA)	4 % (w/v) in PBS	Merck #104004
PBS-T	PBS 0,5 % (v/v) Triton-X-100	Sigma #234729
Eselserum		Millipore #S30100ML

2.6.2. Immunfluoreszenzfärbung auf Gefrierdünnschnitten

2.6.2.1. Anfertigung von Gefrierdünnschnitten

Nach der Präparation der Mäuse und der Isolation der Gehirne wurden diese für 4 Stunden in 4 % PFA bei 4 °C fixiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation in 30 %iger Saccharose Lösung für mindestens 36 Stunden bei 4 °C, um das Gewebe zu entwässern. Abschließend wurden die Organe in Einweg-Ausgießformen mit O. C. T. eingebettet und

in -90 °C kaltem Ethanol durchgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die gefrorenen Blöcke bei -80 °C aufbewahrt.

Vor der Anfertigung der Schnitte wurden die gefrorenen Organe im Kryostat (Leica CM 2050S) bei -20 °C für 20 Minuten vorinkubiert und anschließend mit Hilfe von flüssigem O. C. T. auf einen Objekthalter festgefroren. Abschließend wurden je nach Analyse 7-12 µm dünne Gefrierdünnschnitte angefertigt, mittels Objektträger (SuperFrost Plus, Roth #H867.1) aufgenommen und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Verwendete Materialien:

Paraformaldehyd (PFA)	4% (w/v) in PBS	Merck #104004
Saccharose	30% (w/v) in PBS	Merck #107651
O.C.T.-Einbettmedium		Sakura Finetechnical #4583
PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl gelöst in ddH ₂ O pH 7,3 autoklav., 121 °C, 2 bar; 30 min.	
Kryostat	CM 3050S	Leica
Objektträger	SuperFrost Plus	Roth #H867.1

2.6.2.2. Immunfluoreszenzfärbung

Die zuvor angefertigten Gefrierdünnschnitte wurden zunächst mit einem Fettstift (ImmEdge Pen, Vektor Laboratories) umrandet und dreimal für jeweils 10 Minuten mit PBS-T auf einer Wippe gewaschen, um restliches Einbettmedium zu entfernen. Anschließend wurden die Schnitte für 60 Minuten mit 10 % Eselserum in PBS-T inkubiert, um möglichen unspezifischen Antikörperbindestellen zu blockieren. Über Nacht wurde nachfolgend der in 1 % Eselserum in PBS-T verdünnte Erstantikörper aufgetragen und die Schnitte bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Erstantikörperlösung entfernt und die Schnitte erneut dreimal für jeweils

10 Minuten in PBS-T gewaschen. Darauf folgte eine 4-stündige Inkubation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit dem Zweitantikörper, welcher ebenfalls in 1 % Eselserum in PBS-T verdünnt worden war. Alle weiteren darauffolgenden Schritte wurden in abgedunkelten Räumen oder lichtundurchlässigen Kammern durchgeführt, um die fluoreszierenden Zweitantikörper zu schonen. Nach drei abschließenden Waschschritten in 1 % PBS-T wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt und über Nacht zum Aushärten bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert. Je nach Analyse enthielt das Mowiol zur Anfärbung der Zellkerne zusätzlich noch DAPI. Nach der Aushärtung wurden die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Die folgenden Erstantikörper wurden für die Immunfluoreszenzanalysen auf Gefrierdünnschnitten gebraucht:

Tabelle 2.9: Für die Färbung auf Gefrierdünnschnitten verwendete Erstantikörper

Erstantikörper	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
anti-Doublecortin	1:200	Santa Cruz	sc-8066
anti-Adenylyl-cyclase 3	1:200	Santa Cruz	sc-588
anti-BrdU	1:50	Developmental Studies Hybridoma Bank Universität Iowa	G3G4

Die folgenden Zweitantikörper wurden für die Immunfluoreszenzanalysen auf Gefrierdünnschnitten gebraucht:

Tabelle 2.10: Für die Färbung auf Gefrierdünnschnitte verwendete Zweitantikörper

Zweitantikörper	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
Cy®3-konjugiert Esel anti-Maus IgG	1:200	Dianova	715-165-151
Cy®3-konjugiert Esel anti-Kaninchen IgG	1:200	Dianova	711-165-152
Cy®3-konjugiert Esel anti-Ziege IgG	1:200	Dianova	705-165-147

Verwendete Materialien:

Fettstift	ImmEdge Pen	Vektor Laboratories #H-4000
Mowiol	5 g Mowiol in 20 ml PBS gelöst 10 ml Glycerin	Polysciences #17951
DAPI-Lösung	DAPI-Reagenz in PBS (0,1 µg/ml)	Merck #1246530100
PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl gelöst in ddH ₂ O pH 7,3 autoklav., 121°C, 2 bar; 30 min.	
PBS-T	PBS 0,1 % (v/v) Triton-X-100	Sigma #234729
Eselserum		Millipore #S30100ML

2.7. Bromdesoxyuridin-Analysen

Bromdesoxyuridin (BrdU) stellt ein Analogon zum natürlich in der DNA vorkommenden Nukleotid Thymidin bzw. dem sehr selten in der DNA vorkommenden Desoxyuridin dar. Aufgrund seiner Analogie kann es von der Zelle aufgenommen und während der S-Phase des Zellzyklus bei der Replikation der DNA in phosphorylierter Form anstelle des Nukleotids Desoxythymidintriphosphat (dTTP) in den neu synthetisierten Strang eingebaut werden. Anschließend kann dieses inkorporierte BrdU mittels spezifischer Antikörper detektiert und somit zur Quantifizierung der Zellproliferation genutzt werden. Für die Applikation des BrdUs, sowie die anschließend notwendige Denaturierung der DNA zur korrekten Bindung des Antikörpers sind spezielle Schritte notwendig, welche im Folgenden beschrieben werden.

Das BrdU wurde zunächst in einer Konzentration von 20 mg/ml in isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Da BrdU eine sehr schlechte Löslichkeit in Wasser hat, erfolgte dieser Schritt über Nacht auf einem Heizblock bei 50 °C unter leichtem Schütteln. Die Behandlung der Mäuse erfolgte über einen Zeitraum von 5 Tagen, wobei die Tiere täglich eine Dosis von 200 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert bekommen haben,

welche zuvor auf 36 °C erhitzt wurde. Am letzten Tag der Behandlung wurden die Tiere präpariert (siehe 2.1.3), das Gehirn in O. C. T. eingebettet und am Kryostat geschnitten (siehe 2.6.2.1).

Für die Detektion des BrdUs mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden die Schnitte mit einem Fettstift auf dem Objektträger umrandet und zweimal für 15 Minuten wippend in 0,5 % PBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation der Schnitte bei 65 °C in 50 % Formamid/2x SSC gefolgt von einer 30-minütigen Inkubation in 2N HCl bei 37 °C, um eine Denaturierung der DNA zu bewirken. Zur Neutralisation des pH-Werts der Schnitte folgte ein 2-facher Waschschrift in 0,1 M Boratpuffer für jeweils 5 Minuten. Das Blockieren unspezifischer Bindestellen erfolgte mit Hilfe einer 30-minütigen Inkubation in 10 % Eselserum in PBS-T, bevor der BrdU Antikörper über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten inkubierte. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für je 15 Minuten in PBS-T gewaschen und anschließend 4 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper im Dunkeln inkubiert. Nach 2 abschließenden Waschschriften von je 15 Minuten in PBS-T wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckelt und über Nacht zum Aushärten bei Raumtemperatur gelagert. Nach erfolgter Aushärtung wurden die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Verwendete Materialien:

BrdU		Fluorochem #092742
50 % Formamid/	50% (v/v) Formamid	
2x SSC	2x SSC, pH 4,5 in ddH ₂ O	
Salzsäure	2 N in H ₂ O	Sigma #30721-1L
Boratpuffer	0,1 M Na ₂ B ₄ O ₇ pH 8,5 in H ₂ O	Merck #106306
anti-BrdU (Erstantikörper)	4 µg/ml in 1 % Eselserum	Developmental Studies Hybridoma Bank University of Iowa #G3G4
Cy®3-konjugiert	1:200 in 1 % Eselserum	Dianova #715-165-151
Esel anti-Maus IgG		
Mowiol	5 g Mowiol in 20 ml PBS gelöst 10 ml Glyzerin	Polysciences #17951

PBS	4 mM NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 16 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 150 mM NaCl gelöst in ddH ₂ O pH 7,3 autoklav., 121°C, 2 bar; 30 min.	
PBS-T	PBS 0,1 % (v/v) Triton-X-100	Sigma #234729
Esenserum		Millipore #S30100ML

2.8. Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (EIA)

Für die Bestimmung der Konzentration von Kortikosteron im Blutplasma der zuvor präparierten Mäuse (siehe 3.1.3) wurde ein sogenannter Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (Abnova #KA0468) durchgeführt. Diese Technik erlaubt eine spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung eines Antigens mittels einer durch einen Antikörper vermittelten enzymatischen Substratumsetzung. Dabei werden die Proben auf eine mit einem Antikörper gegen das zu analysierende Antigen beschichteten Mikrotiterplatte gegeben. Zu den Proben wird außerdem ein biotinyliertes Kompetitor-Antigen hinzugefügt, welches strukturell dem zu analysierenden Antigen ähnelt, jedoch eine kovalente Bindung von Biotin besitzt. In den Vertiefungen der Mikrotiterplatte konkurriert das Analyt-Antigen mit dem Kompetitor-Antigen um eine freie Bindungsstelle am Antikörper. Anschließend wird das nicht gebundene Konjugat entfernt und ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat auf die Mikrotiterplatte gegeben. Das Peroxidase-gekoppelte Streptavidin hat eine sehr hohe Affinität zu Biotin und geht folglich eine starke, nicht-kovalente Bindung mit dem Biotin am Kompetitor-Antigen ein. Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin als chromogenes Substrat erfolgt eine Farbreaktion, welche abschließend photometrisch bestimmt werden kann. Dabei kommt es zu einer Reduktion von Wasserstoffperoxid durch die am Streptavidin gebundene Peroxidase. Die dabei freiwerdenden Protonen oxidieren das vorher fast farblose Chromogen Tetramethylbenzidin, welches sich daraufhin blau färbt. Diese Reaktion wird nach einer definierten Zeit durch die Zugabe von Salzsäure

(0,5 mol/l) gestoppt, wodurch es zu einem Farbumschlag des Tetramethylbenzidin von blau nach gelb kommt. Abschließend kann die Intensität der Färbung mit Hilfe eines Mikroplattenlesers (Rayto RT-6100) bei 450 nm bestimmt und die Konzentration des Antigens berechnet werden. Da es sich um einen kompetitiven Immunassay handelt, verhält sich die Intensität des Signals umgekehrt zur Analyt-Konzentration.

Die Durchführung des Kortikosteron-EIA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die spätere Konzentrationsbestimmung wurde bei jedem EIA eine Standardreihe aufgetragen. Sowohl die Konzentrationsbestimmung der Standardreihe, als auch die der Proben erfolgte mittels Zweifachbestimmung. Die Berechnung der Standardkurve erfolgte durch eine logistische 4-Parameter-Regressionskurve. Alle eingesetzten Lösungen wurden zu Beginn des EIA auf Raumtemperatur gebracht. Der EIA fand ebenfalls bei Raumtemperatur statt.

Verwendete Materialien:

Kortikosteron ELISA Kit

Abnova #KA0468

2.9. Proteinbiochemie

Die Proteinbiochemie umfasst die Charakterisierung von Proteinfunktionen, die Proteinlokalisierung und deren Quantifizierung, sowie die Entschlüsselung ihrer Aminosäuren-Sequenzen. In dieser Arbeit wurde speziell im Hippocampus das Neurotrophin Bdnf hinsichtlich seiner Quantität und posttranslationalen Modifikation untersucht, sowie verschiedene Komponenten von Bdnf-abhängigen Signalkaskaden und deren Aktivierungsgrad. Alle Arbeiten wurden dafür bei 4 °C oder auf Eis durchgeführt, um einen Abbau der Proteine durch Proteasen zu verhindern.

2.9.1. Extraktion von Proteinen

Nach der Präparation des Hippocampus (siehe 2.1.3) wurde dieser in kaltem PBS gewaschen und in Lysis-Puffer mit Proteinase- und Phosphatase-Inhibitoren überführt. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Hippocampi mit Hilfe des Precellys24-Dual Systems (PepLab Biotechnologie, #EQ03119.200.RD000.0) bei 2x 5000 U/min für 30 Sekunden. Der Precellys24-Dual wurde zuvor mittels Cryolys (PepLab

Biotechnologie, EQ05068-200-RD000.0) auf 4 °C gekühlt. Anschließend wurden die Zellfragmente mittels 1-minütiger Zentrifugation bei 10000 U/min pelletiert und das überstehende Proteinlysate in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20 °C verwahrt oder direkt zu Konzentrationsbestimmung mittels Bradford verwendet.

Verwendete Materialien:

Lysis-Puffer	50 mM HEPES pH 7,3	
	150 mM KCl	
	4 mM MgCl ₂	
	Proteinase-Inhibitor-Cocktail	Roche #11836153001
	(1 Tablette pro 10 ml Lösung)	
	Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	Roche #04906845001
	(1 Tablette pro 10 ml Lösung)	

2.9.2. Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Methode der Protein-Konzentrationsbestimmung nach Bradford beruht auf der Anfärbbarkeit von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie-Blue G250. Der negativ geladene Farbstoff ist in der Lage an die positiven Ladungen eines Proteins zu binden und verschiebt dadurch sein Absorptionsmaximum von $A_{\max}=465$ nm nach $A_{\max}=595$ nm. Dieser Farbumschlag kann photometrisch ermittelt werden und ist ein Indiz für die Proteinkonzentration einer Lösung. In dieser Arbeit wurden die Proteinkonzentrationen der Hippocampus-Protein-Lysate auf diese Weise photometrisch bestimmt und mittels Verdünnung aneinander angeglichen, so dass anschließend jede Probe die gleiche Proteinkonzentration hatte.

2.9.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung der Proteine erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, welche eine vertikale Gelelektrophorese darstellt und die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts auftrennt (Laemmli, 1970). Dabei wird sich zu Nutzen gemacht, dass das im Gel und im Puffer enthaltene SDS von den meisten

Proteinen gebunden wird und negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis entstehen. Die gleichmäßige negative Ladung der Proteine löst dabei mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen auf und eine zusätzliche Denaturierung der Proteine durch Hitze führt zur Linearisierung dieser. Dadurch unterscheiden sich die Proteine nur noch in ihrer Größe, was eine exakte Trennung durch eine poröse Polyacrylamidmatrix im elektrischen Feld ermöglicht. Zur Verbesserung der Probentrennung werden die Proteine zuerst in einem Sammelgel konzentriert, bevor sie im Trenngel entsprechend ihres Molekulargewichts getrennt werden. Je höher die Konzentration des Trenngels ist, desto besser können Proteine mit geringerem Molekulargewicht getrennt werden. In dieser Arbeit wurden, je nach Größe des zu analysierenden Proteins Trenngele mit einer Konzentration von 10-15 % verwendet.

Zur Herstellung des SDS-Polyacrylamid-Gels wurde zunächst das Trenngel zwischen zwei abgedichtete Glasplatten gegossen. Durch radikalische Polymerisation der Stoffe Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid (im Verhältnis 37,5:1) härten die Gele aus, wobei Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Polymerisierungskatalysator und Ammoniumpersulfat (APS) als Radikalstarter hinzugegeben wurden. Während des Aushärtens wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um sowohl eine gerade Gelkante zu erhalten, als auch den Kontakt mit Sauerstoff zu verhindern, welcher die Polymerisation durch das Abfangen der notwendigen Radikale beeinträchtigen könnte. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und mit Hilfe eines speziellen Kammes, Taschen für die Proben ausgespart. Nach dem Aushärten wurde das Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt und die aufbereiteten Proben in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Als Referenz wurde außerdem ein Proteinlängenmarker aufgetragen, der mehrere Proteine bekannter Größe beinhaltet. An die Elektrophorese-Apparatur wurde eine Spannung von 200 V angelegt und die Proteine so lange getrennt, bis die Lauffront das untere Ende des SDS-Gels erreicht hatte. Anschließend wurde das Gel für den folgenden Western Blot verwendet. Es wurde folgende Zusammensetzung für die SDS-Gele verwendet:

Tabelle 2.11: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelen

	Trenngel 10 %	Trenngel 12 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 5 %
ddH ₂ O	0,95 ml	0,6 ml	-	1,75 ml
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	-	0,3 ml
1 M Tris/HCl pH 8,8	2,8 ml	2,8 ml	2,8 ml	-
20 % SDS	30 µl	30 µl	30 µl	12,5 µl
Acrylamid	1,9 ml	2,25 ml	2,8 ml	0,4 ml
TEMED	3,75 µl	3,75 µl	3,75 µl	2,5 µl
10 % APS	30 µl	30 µl	30 µl	12,5 µl

Probenvorbereitung für die SDS-Page:

Vom Proteinlysat wurden 75 µl auf Eis aufgetaut und mit 25 µl 4x Laemmlipuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht, kurz abgekühlt und jeweils 10 µl pro Probe auf das SDS-Gel aufgetragen.

Verwendete Lösungen:

10 % APS	10 % Ammoniumpersulfat in ddH ₂ O	
20 % SDS	20 % SDS in ddH ₂ O	
Acrylamidlösung	Acrylamidlösung (30 %) Mix 37,5:1	Applichem #3626
Proteinstandard		Sigma #SDS6H2
TEMED		Merck #1.10732
Tris/HCl pH 6,8	Tris/HCl (1 M) in ddH ₂ O pH 6,8	
Tris/HCl pH 8,8	Tris/HCl (1 M) in ddH ₂ O pH 8,8	

Laemmli-Puffer	0,2 M Tris-HCl pH 6,8	
	8 % SDS	
	40 % (w/v) Glycerol	
	0,4 % Bromphenolblau	Merck #115925
	20 % β -Mercaptoethanol	Sigma #M7522

2.9.4. Western Blot

Beim Western Blot handelt es sich um einen gerichteten, elektrophoretischen Transfer von zuvor mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran. Dabei wird sich zu Nutze gemacht, dass die Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel durch die Komplexbildung mit SDS negativ geladen sind. Durch das Anlegen eines, senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichteten, elektrischen Feldes können Proteine aus dem Gel auf eine Membran übertragen werden. Dies wurde in einer speziellen Blot-Apparatur realisiert, wobei das Gel auf eine zuvor mit 100 % Methanol aktivierte PVDF-Membran platziert wurde. Die Membran und das Gel wurden anschließend zwischen unterschiedliche Lagen aus Whatman-Papier (VWR, #732-0591) gelegt. Dabei befanden sich 6 Lagen Whatman-Papier, welche á drei Lagen mit zwei unterschiedlichen Anodenpuffern getränkt waren, unter der PVDF-Membran und drei Lagen, welche mit Kathodenpuffer getränkt waren über dem Gel. Durch diese Aufteilung wurden eine optimale Leitung des Stroms und damit auch ein bestmöglicher Transfer der Proteine gewährleistet. Der Transfer der Proteine erfolgte anschließend bei 54 mA pro 9 cm² Membran für 70 Minuten (Bio-Rad Power Supply). Der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde anschließend mittels Ponceau-S-Färbung überprüft. Bei dieser Färbung bindet das Ponceau-Rot an die Proteine auf der Membran und macht sie dadurch sichtbar. Dieser Vorgang ist jedoch reversibel und beeinträchtigt eine anschließende Immundetektion nicht.

Verwendete Materialien:

Anodenpuffer 1	0,3 M Tris-Base
	20 % Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer 2	25 mM Tris-Base
	20 % Methanol, pH 10,4

Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base 20 % Methanol, pH 9,4 40 mM Aminokapronsäure	
Ponceau-S-Lösung	0,2 % (w/v) Ponceau-S 3% Trichloressigsäure (w/v) in ddH ₂ O	Applichem #A1405

2.9.5. Immunnachweis von Proteinen

Zur Detektion der Proteine wurde die PVDF-Membran zuerst mehrfach in 0,1 % Tween in PBS gewaschen, um mögliche Rückstände der Ponceau-S-Färbung zu entfernen. Anschließend erfolgte eine Blockierung aller freien Bindestellen auf der Membran durch eine einstündige Inkubation in 5 % Magermilchpulver in PBS/0,1 % Tween. Darauf folgte die Benetzung der Membran mit dem für das zu analysierende Protein spezifischen Primärantikörper über Nacht bei 4 °C verdünnt in 5 % Magermilchpulver in PBS/0,1 % Tween. Am nächsten Tag wurde die Antikörper-Lösung entfernt und die Membran 3-fach für je 15 Minuten in PBS/Tween 0,1 % gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran in der Sekundärantikörper-Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Diese enthielt einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, welcher an den Primärantikörper bindet und zur späteren Detektion die Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert. Abschließend wurde die Membran erneut 3-fach je 15 Minuten in PBS/0,1 % Tween gewaschen. Zur Detektion der spezifischen Proteine wurde nachfolgend eine ECL-Lösung („*enhanced chemie luminescence detection reagens*“) für 5 Minuten auf die Membran gegeben. Während dieses Vorgangs katalysiert die Peroxidase des Sekundärantikörpers die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form. Die dabei entstehende Lumineszenz konnte durch einen Luminescence Image Analyser (LAS-4000 mini, Fujifilm #8692184) visualisiert und digitalisiert werden. Abschließend wurden die Proteinmengen mit Hilfe der Software „ImageJ“ des National Institute of Health (NIH) USA quantifiziert.

Für die Western Blot Analysen wurden folgende Antikörper verwendet:

Tabelle 2.12: Für den Western Blot verwendete Antikörper

Name des Antikörpers	Verdünnung	Bezugsquelle	Bestellnummer
Anti-Bdnf	1:200	Santa Cruz	#sc-546
Anti-Phospho-CREB (Ser133)	1:200	Cell Signaling	#9198S
Anti-Phospho MEK1/2 (Ser217/221)	1:200	Cell Signaling	#9121
Anti-Actin	1:4000	Sigma	#A2066
Anti-HRP	1:2000	Dako	#P0448
Anti-Mmp7	1:200	Santa Cruz	#sc-515703
Anti-Mmp9	1:200	Santa Cruz	#sc-393859
Anti-Mmp3	1:200	Santa Cruz	#sc-21732
Anti-Furin	1:200	Santa Cruz	#sc-133142
Anti-Plasminogen	1:200	Santa Cruz	#sc-376324
Anti-Timp1	1:200	Santa Cruz	#sc-365905
Anti-PC1/3	1:200	Cell Signaling	#11914S

Verwendete Materialien:

PBS/0,1 % Tween	0,1 % (w/v) Tween20 In PBS	Applichem #A1389,0500
5 % Magermilchpulver	5 % Magermilchpulver in PBS/0,1 % Tween	
ECL-Reagenz		Amersham #RPN 2132

2.10. Fotodokumentation und Bildbearbeitung

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager.A2, Zeiss) visualisiert und die Bilder mit einer AxioCam MRm Top (Zeiss) erfasst. Dabei wurde das Fotoprogramm „AxioVision“ (Zeiss) genutzt. Für die

Überlagerung der einzelnen Farbkanäle diente das Programm „ImageJ“ des National Institute of Health (NIH) USA. Notwendige Nachbearbeitungen der Bilder erfolgten mit der Software „Photoshop CS6“ von Adobe.

2.11. Bildanalysen

Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten ziliärer Proteine erfolgte mit dem Programm „ImageJ“. Dabei wurde die totale Pixelintensität („RawIntDen“) der für das Protein spezifischen Färbung gemessen. Des Weiteren wurde die umliegende Hintergrund-Fluoreszenzintensität bei allen Messungen 3-fach bestimmt, gemittelt und von der spezifischen Fluoreszenzintensität der ziliären Proteine subtrahiert. Pro Ansatz wurden mindestens 25 Zilien ausgemessen. Bei der Bestimmung der Zilienlängen wurden für jeden Genotyp mindestens 100 Zilien gemessen.

2.12. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde die Standardabweichung (StabW) und der „*Standard Error of the Mean*“ (SEM) mit Hilfe des Programms Excel von Microsoft bestimmt. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des Student t-Tests verglichen und folgendermaßen festgelegt:

- $p \leq 0,05$ → * = signifikant
- $p \leq 0,01$ → ** = hochsignifikant
- $p \leq 0,001$ → *** = höchstsignifikant

3. Ergebnisse

In initialen Analysen konnten verschiedene phänotypische Auffälligkeiten in *Fto*-defizienten Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Mäusen beschrieben und quantifiziert werden (Spsychala, 2013). So konnte durch zwei etablierte, unkonditionierte Verhaltenstests ein signifikant erhöhtes Angstverhalten in *Fto*^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden. Außerdem zeigten Analysen des Blutplasmas erhöhte Werte des Stresshormons Kortikosteron in *Fto*^{-/-}-Mäusen, im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Mäusen.

3.1. Der Verlust von *Fto* führt zu einer Hyperaktivierung der Hypothalamus–Hypophysen–Nebennierenrinden–Achse

Diese erhöhten Kortikosteron-Werte im Blutplasma können verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte eine Hyperaktivität der HHN-Achse dazu führen, dass die Nebennierenrinde dauerhaft Kortikosteron in den Blutkreislauf sekretiert, zum anderen könnte die Funktion der Nebennierenrinde selbst durch den *Fto*-Verlust fehlerhaft sein, was zu einer vermehrten Kortikosteron-Freisetzung führen könnte.

Um zu untersuchen, was die Ursache der erhöhten Kortikosteron-Menge im Blutplasma von *Fto*^{-/-}-Mäusen ist, wurde ein Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (EIA) für das Peptidhormon Adrenokortikotropin (ACTH) im Blutplasma von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen durchgeführt. ACTH ist ein entscheidendes Hormon für die neuroendokrine Signalvermittlung der HHN-Achse und ist damit ein Indikator für die Aktivität dieser.

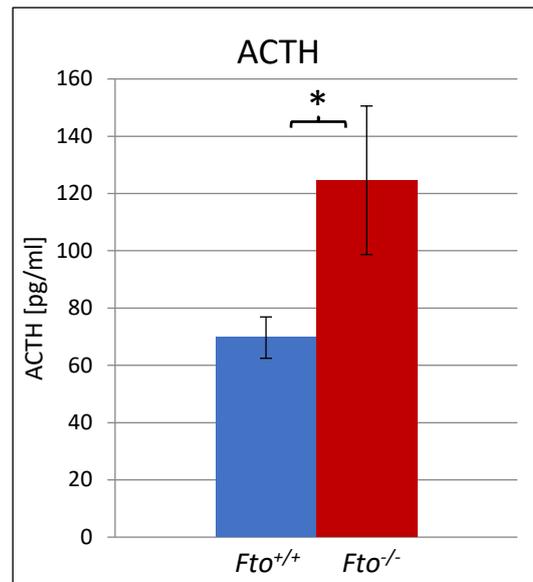


Abbildung 3.1: ACTH-Konzentration im Blutplasma von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen.

Mittels Enzym-gekoppeltem Immunadsorptionstest wurde die ACTH-Konzentration im Blutplasma von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäuse in pg/ml gemessen (n = 13/5). *Fto*^{-/-}-Mäuse weisen eine signifikant erhöhte ACTH-Konzentration im Blutplasma auf (p-Wert = 0,0117).

Das Ergebnis des EIA zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen der ACTH-Konzentration im Blutplasma von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen. Während *Fto*^{+/+}-Mäuse einen durchschnittlichen ACTH-Wert von ca. 70 pg/ml aufweisen, zeigen *Fto*^{-/-}-Mäuse einen deutlich erhöhten Wert von ca. 125 pg/ml (Abbildung 3.1). Dabei ist die Standardabweichung bei den *Fto*^{-/-}-Mäuse größer als bei den *Fto*^{+/+}-Mäuse, was sich durch die geringere Anzahl an Proben in dieser Gruppe erklären lässt. Die erhöhten ACTH-Werte vermitteln der Nebennierenrinde über Rezeptoren die Notwendigkeit von Glukokortikoiden, welche daraufhin in den Blutkreislauf sekretiert werden. Dieses Ergebnis zeigt klar, dass in *Fto*^{-/-}-Mäusen eine chronische Hyperaktivität der HHN-Achse vorliegt, welche unter anderem für die erhöhte Menge an Kortikosteron im Blutplasma von *Fto*^{-/-}-Mäusen verantwortlich ist.

3.2. Fto ist ein wichtiger Faktor für die Funktion des Arbeitsgedächtnisses

Sowohl erhöhte Kortikosteron-Werte als Folge einer Hyperaktivierung der HHN-Achse, als auch phänotypische Auffälligkeiten, wie ein erhöhtes Angstverhalten, sind mit eingeschränkten kognitiven Funktionen assoziiert. Verschiedene Gruppen konnten

zeigen, dass hohe Kortikosteron-Werte die Leistung des Arbeitsgedächtnisses negativ beeinflussen (Coburn-Litvak et al., 2003). Auch ein gesteigertes Angstverhalten, wie es in den initialen Analysen der Masterarbeit mit Hilfe des Elevated Plus Maze und des Cage Emergence Tests in $Fto^{-/-}$ -Mäuse nachgewiesen wurde, konnte mit Einschränkungen im Arbeitsgedächtnis in Verbindungen gebracht werden (Papaleo et al., 2011).

Um die Funktion des Arbeitsgedächtnisses in Abhängigkeit von Fto zu analysieren, wurden $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäuse in einem 8-Arm Radial Maze getestet. Während des Tests konnten die Tiere die Apparatur frei erkunden. Der Zeitpunkt und die Anzahl an Versuchen bis alle 8 Arme mindestens einmal erkundet wurden, wurde gemessen. Doppelte Eintritte in einen bereits erkundeten Arm galten dabei als Fehler und wurden als Maßstab für die Leistung des Arbeitsgedächtnisses interpretiert.

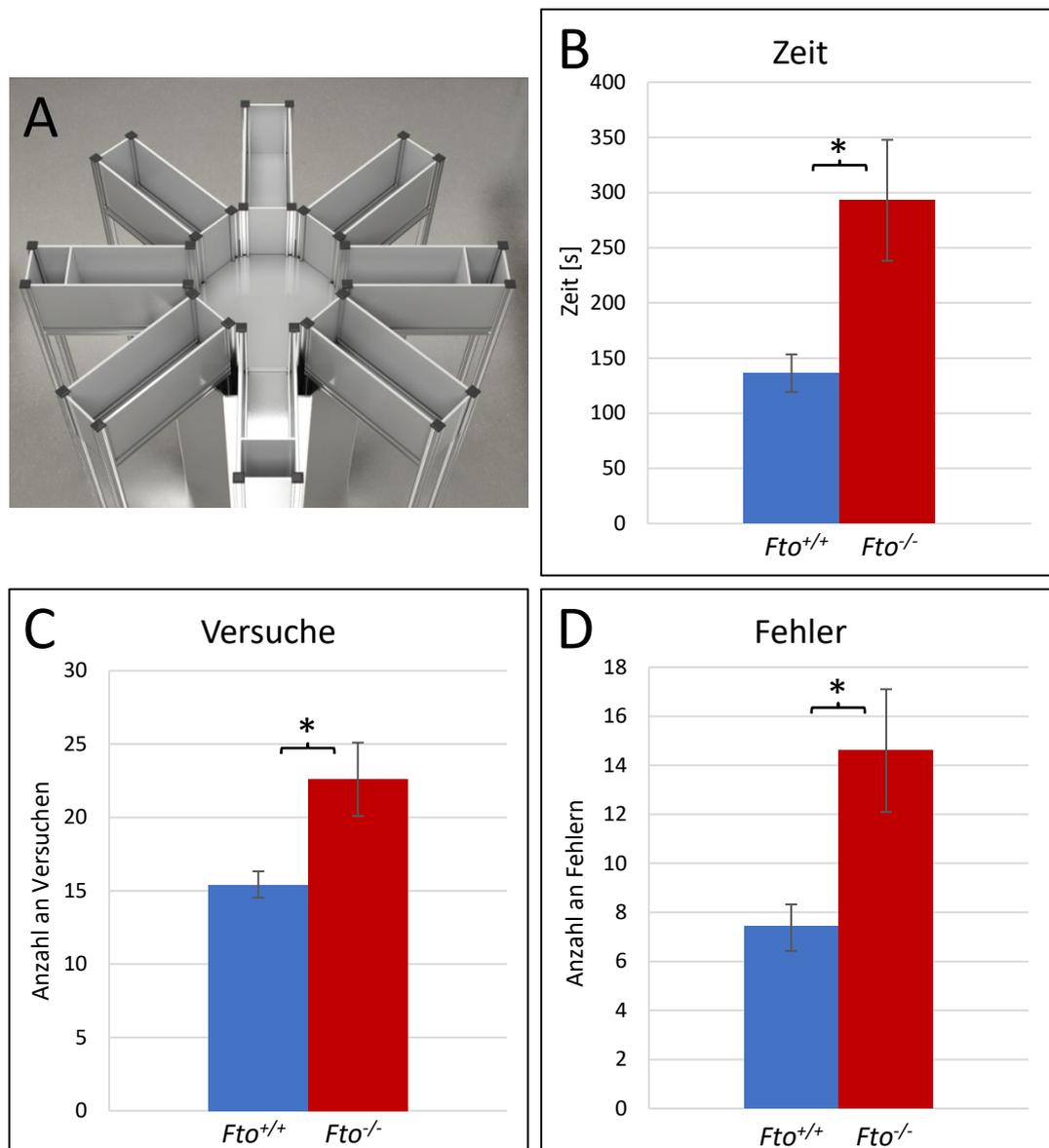


Abbildung 3.2: Kognitive Leistungen der *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäuse im Radial Arm Maze. (A) Beispielhafte Darstellung des verwendeten 8-Arm Radial Maze. (B) Dargestellt ist die benötigte Zeit der Mäuse in Sekunden, bis jeder der 8 Arme mindestens einmal erkundet wurde. *Fto*^{-/-}-Mäuse brauchten dafür signifikant länger als *Fto*^{+/+}-Mäuse (n = 7/5; p-Wert = 0,0103). (C) Dargestellt ist die Anzahl der Versuche, welche benötigt wurden, bis jeder der 8 Arme mindestens einmal besucht wurde. *Fto*^{-/-}-Mäuse benötigten dafür signifikant mehr Versuche als *Fto*^{+/+}-Mäuse (n = 7/5; p-Wert = 0,0117). (D) Dargestellt ist die durchschnittliche Anzahl an Fehlern, welche während des Tests bei *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen registriert wurden. Das erneute Eintreten in einen bereits zuvor besuchten Arm wurde dabei als Fehler gewertet. *Fto*^{-/-}-Mäuse machten insgesamt signifikant mehr Fehler als *Fto*^{+/+}-Mäuse (n = 7/5; p-Wert = 0,0117).

Die Ergebnisse zeigen, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse nach ca. 300 Sekunden alle acht Arme des Radial Maze mindestens einmal erkundet hatten. *Fto*^{+/+}-Mäuse benötigten für diese

Aufgabe mit ca. 140 Sekunden nur etwa die Hälfte der Zeit und waren damit signifikant schneller als *Fto*^{-/-}-Mäuse (Abbildung 3.2 B). Da die benötigte Zeit als Faktor auch von der physischen Verfassung der Mäuse beeinflusst wird, lässt sich durch dieses Ergebnis allein noch keine konkrete Aussage zum Einfluss von *Fto* auf das Arbeitsgedächtnis treffen. Die länger benötigte Zeit der *Fto*^{-/-}-Mäuse könnte auch durch die für *Fto*^{-/-}-Mäuse beschriebene kleinere Körpergröße oder durch motorische Einschränkungen verursacht werden. Um dies auszuschließen wurde die Anzahl der benötigten Versuche und die dabei gemachten Fehler ebenfalls dokumentiert. In Abbildung 3.2 C & D sind diese Daten dargestellt. Es lässt sich feststellen, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse sowohl mehr Versuche benötigen, als auch mehr Fehler begehen, bis alle acht Arme mindestens einmal besucht wurden. So machten *Fto*^{-/-}-Mäuse pro Durchgang durchschnittlich 15 Fehler, während *Fto*^{+/+}-Mäuse nur ca. 7 Fehler machten (Abbildung 3.2 D). Zusammengefasst zeigen diese Daten deutlich, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse sowohl signifikant länger benötigen, als auch mehr Versuche brauchen und mehr Fehler begehen als *Fto*^{+/+}-Mäuse, bis jeder der acht Arme mindestens einmal erkundet wurde. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese, dass *Fto* ein wichtiger Faktor für die korrekte Funktion des Arbeitsgedächtnisses ist und ein Fehlen von *Fto* in Mäusen die Funktion des Arbeitsgedächtnisses einschränkt.

3.3. *Fto* hat keinen direkten Einfluss auf das Langzeitgedächtnis

Neben dem Arbeitsgedächtnis kann durch chronischen Stress, welcher durch die erhöhten Kortikosteron-Werte in *Fto*^{-/-}-Mäuse impliziert wird, auch das Langzeitgedächtnis beeinträchtigt werden (de Quervain et al., 1998). Um zu analysieren in wie weit das Langzeitgedächtnis durch den *Fto*^{-/-}-Phänotyp beeinflusst wird, wurden die Mäuse im Morris Water Maze untersucht. In diesem Test mussten die Tiere in einem kreisrunden Becken schwimmen und an fünf aufeinander folgenden Tagen eine unter der Wasseroberfläche versteckte Plattform finden, welche es ihnen ermöglichte aus dem Wasser zu entkommen.

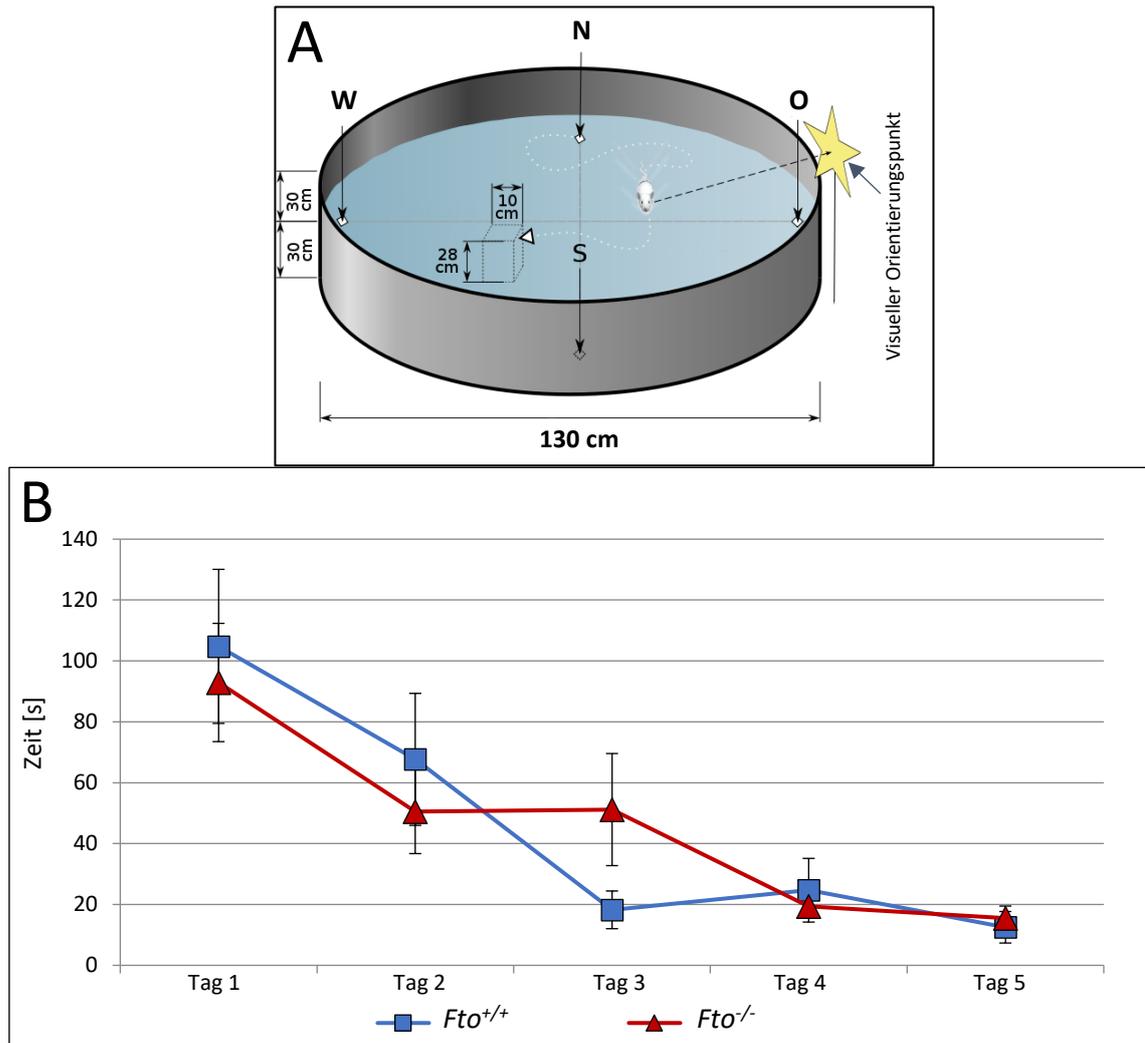


Abbildung 3.3: Kognitive Leistungen der $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäuse im Morris Water Maze Test.

(A) Beispielhafte, grafische Darstellung des verwendeten Water Maze Tests. Zur Orientierung der Mäuse waren in allen vier Himmelsrichtungen visuelle Orientierungshilfen angebracht. (B) Dargestellt ist die durchschnittlich benötigte Zeit in Sekunden bis das getestete Tier die versteckte Plattform unter der Wasseroberfläche gefunden hat. $Fto^{-/-}$ -Mäuse zeigten zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zu $Fto^{+/+}$ -Mäusen ($n = 9/12$).

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl $Fto^{+/+}$ -, als auch $Fto^{-/-}$ -Mäuse im Water Maze Test in der Lage waren sich die Position der unter der Wasseroberfläche versteckten Plattform zu merken. Dabei ähnelten sich die Messergebnisse der $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäuse, sodass an keinem Testtag ein signifikanter Unterschied auszumachen war (Abbildung 3.3). Während die Tiere beim ersten Versuch an Tag 1 durchschnittlich zwischen 90 und 105 Sekunden benötigten, waren es am 2. Tag nur noch durchschnittlich zwischen 50 und 70 Sekunden bis die Plattform gefunden bzw. erreicht wurde. Mit jedem zusätzlichen Testtag

wurde die benötigte Zeit in beiden Versuchsgruppen geringer, bis am Tag der letzten Messung (Tag 5) sowohl $Fto^{+/+}$ - als auch $Fto^{-/-}$ -Mäuse nur ca. 10 Sekunden benötigten, um zur Plattform zu gelangen. Der größte Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen konnte an Tag 3 ausgemacht werden. Hier waren $Fto^{+/+}$ -Mäuse mit ca. 20 Sekunden tendenziell schneller in der Lage die Plattform zu finden, als $Fto^{-/-}$ -Mäuse mit ca. 50 Sekunden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl $Fto^{+/+}$ -, als auch $Fto^{-/-}$ -Mäuse in diesem Test ein funktionell uneingeschränktes Langzeitgedächtnis aufwiesen und Fto kein entscheidender Faktor für die korrekte Funktion des Langzeitgedächtnisses in Mäuse ist.

3.4. Fto ist ein wichtiger Faktor für die Differenzierung und Reifung von neuronalen Vorläuferzellen im Hippocampus

Sowohl eine Hyperaktivität der HHN-Achse, als auch Einschränkungen der kognitiven Funktionen sind eng mit Veränderungen im Hippocampus assoziiert. Es konnte bereits beschrieben werden, dass chronischer Stress zu morphologischen Veränderungen in Form von Atrophie im Hippocampus führt, welche daraufhin kognitive Dysfunktionen zur Folge haben (McEwen und Sapolsky, 1995; Lupien et al., 1998). Vor allem Zellen in der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus reagieren sensitiv auf äußere Faktoren wie Stress oder andere äußere Reize, sowohl positiver, als auch negativer Natur (Simon et al., 2005; Schloesser et al., 2010). Die strukturellen Veränderungen im Hippocampus basieren hauptsächlich auf Modulationen der Neurogenese, welche sich in der subgranulären Zone in verschiedene Abschnitte unterteilen lässt: Proliferation, neuronale Differenzierung und Fortbestand, sowie die abschließende neuronale Reifung (Christie und Cameron, 2006). Um zu untersuchen, ob die bisher beschriebenen Auffälligkeiten in $Fto^{-/-}$ -Mäusen in Form von Hyperaktivität der HHN-Achse, erhöhte Kortikosteron-Werte, gesteigertes Angstverhalten, sowie Einschränkungen im Arbeitsgedächtnis, mit Veränderungen im Hippocampus einhergehen, wurde die Proliferation, sowie die Differenzierung der Zellen in der subventrikulären Zone in $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäusen genauer untersucht. Dazu wurden die Tiere mit BrdU behandelt und anschließend BrdU-positive Zellen in der subgranulären Zone des Hippocampus mittels Immunfluoreszenz-Antikörper detektiert. Um die Differenzierung und Reifung der proliferierten Zellen zu analysieren, wurde eine

Immunfluoreszenz-Antikörperfärbung gegen Doublecortin durchgeführt, welches ausschließlich in sich differenzierenden Zellen exprimiert wird.

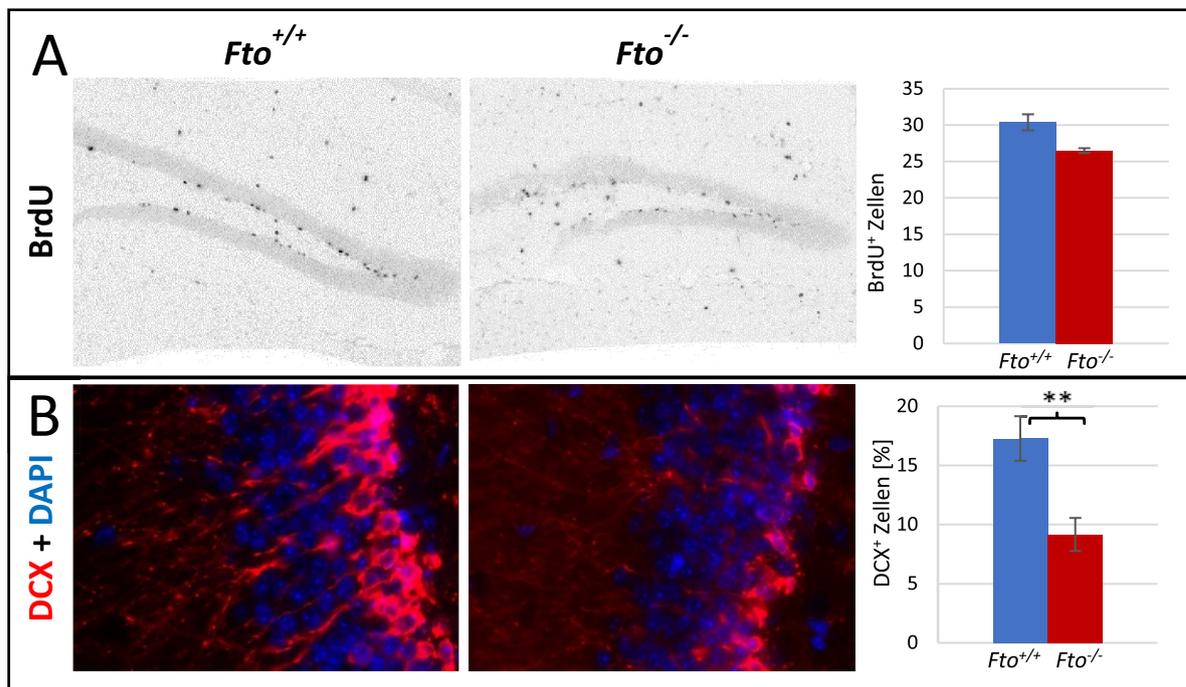


Abbildung 3.4: Immunfluoreszenzanalysen zur Quantifizierung der Proliferation und der Differenzierung von Zellen in der subgranulären Zone des Hippocampus in *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäuse.

(A) Dargestellt ist die Negativaufnahme der Immunfluoreszenzfärbung gegen BrdU im Gyrus dentatus von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen. Proliferierte Zellen mit BrdU sind in der Aufnahme schwarz dargestellt. In der quantitativen Auswertung ist kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der proliferierten Zellen pro Gyrus Dentatus zu erkennen (n = 3). (B) Dargestellt ist die Immunfluoreszenzfärbung gegen DAPI und Doublecortin in der subgranulären Zone des Hippocampus von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen. Mit DAPI angefärbte Zellkerne sind in blau und die mit Doublecortin detektierten sich differenzierenden Zellen in rot dargestellt. Die quantitative Auswertung zeigt eine hoch signifikant verringerte Anzahl an Doublecortin positiven Zellen in *Fto*^{-/-}- Mäusen im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Mäusen (n = 4/5; p-Wert = 0,0094)

Die Ergebnisse demonstrieren, dass *Fto* scheinbar keinen Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen in der subgranulären Zone des Hippocampus hat. Sowohl in *Fto*^{+/+}-, als auch in *Fto*^{-/-}-Mäusen konnten zwischen 26 und 30 proliferierte Zellen pro Hippocampus-Schnitt anhand von BrdU detektiert werden (Abbildung 3.4 A). Die Untersuchung der sich differenzierenden Zellen konnte jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen ausmachen. Die Auswertung der Doublecortin positiven Zellen ergab, dass deutlich weniger Zellen in der subgranulären

Zone von $Fto^{-/-}$ -Mäusen differenziert sind als in $Fto^{+/+}$ -Mäusen. Während in $Fto^{+/+}$ -Mäusen ca. 17 % aller Zellen des Gyrus dentatus mit dem Differenzierungsmarker Doublecortin detektiert werden konnten, sind es in $Fto^{-/-}$ -Mäusen nur ca. 9 % (Abbildung 3.4 B). Das entspricht nahezu einer Abnahme um den Faktor 2. Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass *Fto* scheinbar keinen direkten Einfluss auf die Proliferationsrate der Zellen im Gyrus Dentatus hat, jedoch die Anzahl an differenzierenden Zellen direkt oder indirekt, z. B. über Apoptose, beeinflusst.

3.5. $Fto^{-/-}$ -Mäuse weisen einen mBdnf-Prozessierungsdefekt im Hippocampus auf

Der Hippocampus ist eine entscheidende Hirnregion für kognitive Fähigkeiten. Er transferiert Informationen aus dem Kurzzeitgedächtnis ins Langzeitgedächtnis, hat eine wichtige Bedeutung bei der räumlichen Orientierung und ist in der Induktion und der negativen Rückkopplung der HHN-Achse beteiligt. Alle bisher in dieser Arbeit oder in den initialen Studien durchgeführten Analysen und aufgewiesenen Auffälligkeiten in $Fto^{-/-}$ -Mäuse stehen direkt oder indirekt mit dem Hippocampus in Verbindung: Hyperaktivität der HHN-Achse mit erhöhten ACTH- und Kortikosteron-Werten, ausgeprägtes Angstverhalten, sowie teilweise eingeschränkte kognitive Fähigkeiten (Spsychala, 2013). Um zu untersuchen, in wie weit *Fto* für die korrekte Funktion des Hippocampus verantwortlich ist, bzw. welche molekularen Faktoren durch den *Fto*-Verlust verändert sind und die Funktionen des Hippocampus möglicherweise einschränken, wurde der Hippocampus aus $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäusen isoliert und genauer analysiert. Mittels Western Blot-Analyse wurde das für die korrekte Funktion des Hippocampus und für Neuronen wichtigste Neurotrophin „*Brain-derived neurotrophic factor*“ (Bdnf) genauer untersucht.

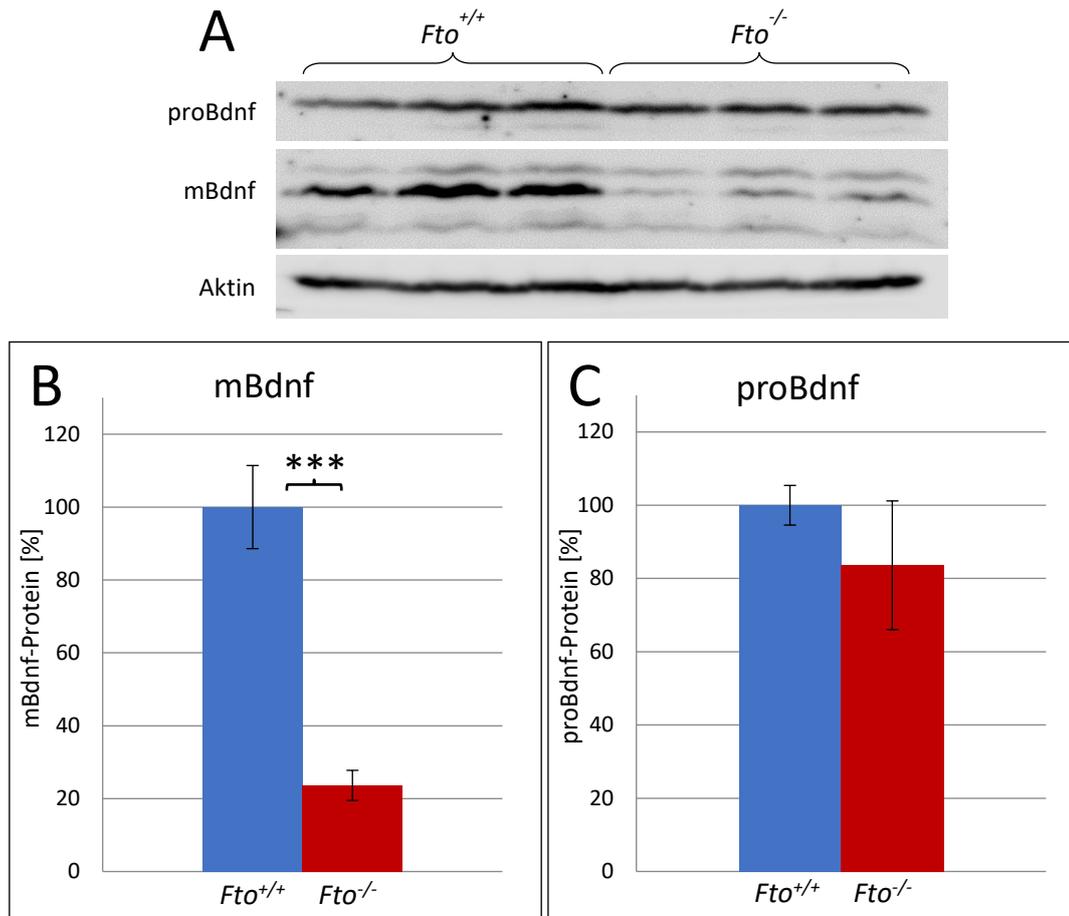


Abbildung 3.5: Bdnf-Western Blot-Analysen von Hippocampus-Proteinlysaten aus *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen.

(A) Western Blot-Analyse von Hippocampus-Proteinlysaten von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen. Dargestellt ist Aktin als Ladekontrolle sowie die beiden Bdnf-Isoformen mBdnf und proBdnf. Es ist deutlich zu erkennen, dass die mBdnf-Isoform bei *Fto*^{-/-}-Mäusen in geringerer Menge vorliegt. (B) Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Western Blots für mBdnf in *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen in Prozent. *Fto*^{-/-}-Mäuse zeigen eine höchstsignifikant geringere mBdnf-Menge als *Fto*^{+/+}-Mäuse (n = 6; p-Wert = 8,9x10⁻⁵). (C) Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Western Blots für proBdnf in *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen in Prozent. Es liegt kein signifikanter Unterschied in der Proteinmenge vor (n = 6; p-Wert = 0,39).

Die Ergebnisse zeigen, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse im Hippocampus eine höchst signifikant geringere Menge an mBdnf im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Mäusen aufweisen. Prozentual liegt der mBdnf-Proteinanteil bei *Fto*^{-/-}-Mäusen nur bei ca. 20 % im Vergleich zum Anteil bei *Fto*^{+/+}-Mäusen (Abbildung 3.5 B). Die Menge der Vorläuferform proBdnf scheint im Hippocampus von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen unverändert zu sein. Zwar zeigen *Fto*^{-/-}-Mäuse durchschnittlich nur ca. 80 % der proBdnf Proteinmenge im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-

Mäusen, jedoch zeichnet sich keine Signifikanz ab (Abbildung 3.5 C). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Verhältnis von proBdnf zu mBdnf im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen gestört ist. Da die mBdnf Isoform abhängig von verschiedenen Faktoren durch unterschiedliche Konvertasen aus der proBdnf Isoform prozessiert wird, deutet die signifikant geringere Menge an mBdnf bei unveränderter proBdnf-Menge auf einen Prozessierungsdefekt im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen hin.

3.6. Der MAPK/Erk-Signalweg ist durch den mBdnf-Prozessierungsdefekt in *Fto*^{-/-}-Hippocampi gestört

Um zu untersuchen, ob der geringere mBdnf-Gehalt im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen zu molekularen Konsequenzen im Hippocampus führt, wurde einer der wichtigsten Signalwege untersucht, der durch mBdnf im Hippocampus aktiviert wird. Der MAPK/Erk-Signalweg wird im Normalfall durch die Aktivierung des mBdnf-Rezeptors TrkB aktiviert und reguliert darauf hin verschiedene Transkriptionsfaktoren, die für das Wachstum, die Differenzierung und die Funktion von Neuronen verantwortlich sind (Segal und Greenberg, 1996; Blum und Konnerth, 2005).

Um zu untersuchen, in wie weit die Aktivität des Signalwegs durch die geringeren mBdnf-Mengen im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen beeinflusst wird, wurde die Menge an pMEK1/2 in den Proteinlysaten mittels Western Blot bestimmt. MEK1/2 ist eine Proteinkinase, welche innerhalb des MAPK/Erk-Signalwegs durch die Proteinkinase Raf (engl.: *rapidly accelerated fibrosarcoma*) phosphoryliert wird, wenn der Signalweg durch die Bindung von mBdnf an TrkB aktiviert wird.

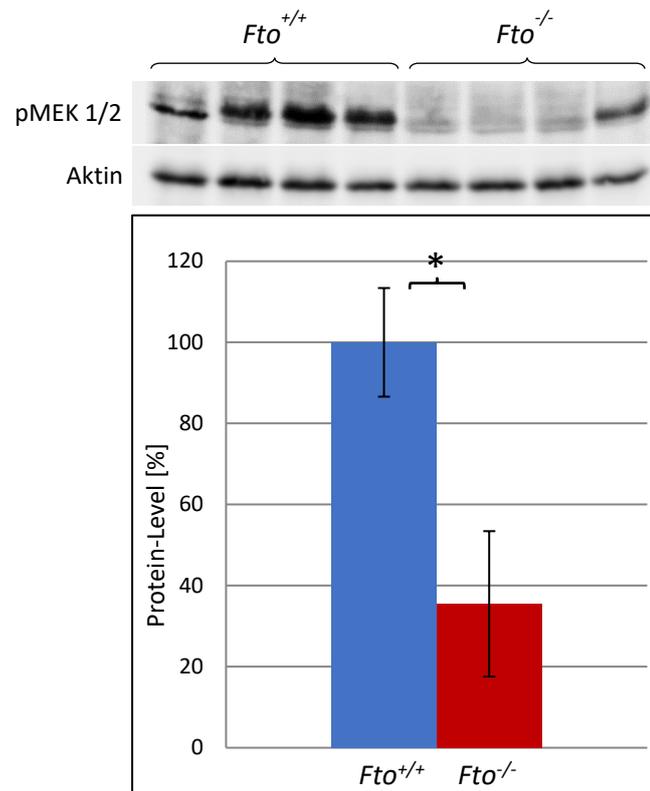


Abbildung 3.6: pMEK1/2-Western Blot-Analysen von Hippocampus-Proteinlysaten aus *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}- Mäusen.

Dargestellt ist die Western Blot-Analyse mit Aktin als Ladekontrolle und der phosphorylierten Form von MEK1/2 von Hippocampus-Proteinlysaten aus *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen. Die quantitative Auswertung des Western Blots zeigt eine signifikante Reduktion der pMEK1/2-Menge in den Hippocampus-Proteinlysaten von *Fto*^{-/-}-Mäusen (n = 4; p-Wert = 0,0279).

Das Ergebnis zeigt eine signifikant geringere Menge der phosphorylierten und damit aktivierten Form von MEK1/2 im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Mäusen. Dabei liegt die relative pMEK1/2-Menge in *Fto*^{-/-}-Mäusen nur bei ca. 35 % bezogen auf die Menge in *Fto*^{+/+}-Mäusen (Abbildung 3.6). Das Ergebnis demonstriert deutlich, dass der MAPK/Erk-Signalweg im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen eine geringere Aktivität aufweist als in *Fto*^{+/+}-Mäusen. Dies bestätigt die Annahme, dass die geringen mBdnf-Mengen im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen auch zu molekularen Konsequenzen führen.

3.7. Der Transkriptionsfaktor Creb wird unabhängig vom MAPK/Erk-Signalweg in *Fto*^{-/-}-Mäusen aktiviert

Der Transkriptionsfaktor Creb (engl.: *cyclic AMP response element-binding protein*) ist einer der wichtigsten und am besten untersuchten Transkriptionsfaktoren in der Tierwelt und beim Menschen. Er spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Genen welche für metabolische Prozesse, synaptische Plastizität und Langzeitpotenzierung, sowie den Tagesrhythmus der inneren Uhr verantwortlich sind (Liu et al., 1991; Silva et al., 1998; Kandel, 2001; Gau et al., 2002; Travnickova-Bendova et al., 2002). Die Aktivierung von Creb erfolgt in unterschiedlichen Zelltypen durch verschiedene äußere Signale, welche über diverse Signalwege letztendlich zu einer Phosphorylierung von Creb führen. In Nervenzellen sind dabei vor allem Neurotransmitter, Neuromodulatoren und Neurotrophine für die Aktivierung von Creb verantwortlich (Shieh et al., 1998; Shaywitz und Greenberg, 1999; Lonze und Ginty, 2002). Der MAPK/Erk-Signalweg ist eine der Signaltransduktionskaskaden, welche seine Wirkung durch die Phosphorylierung von Creb umsetzt (Xing et al., 1996; Deak et al., 1998).

Um zu untersuchen, in wie weit sich die Hypoaktivität des MAPK/Erk-Signalweg in *Fto*^{-/-}-Mäusen auch auf die Aktivität des Transkriptionsfaktor Creb auswirkt, wurde mittels Western Blot die Menge an phosphoryliertem Creb (pCreb) in Hippocampus-Proteinlysaten von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen analysiert.

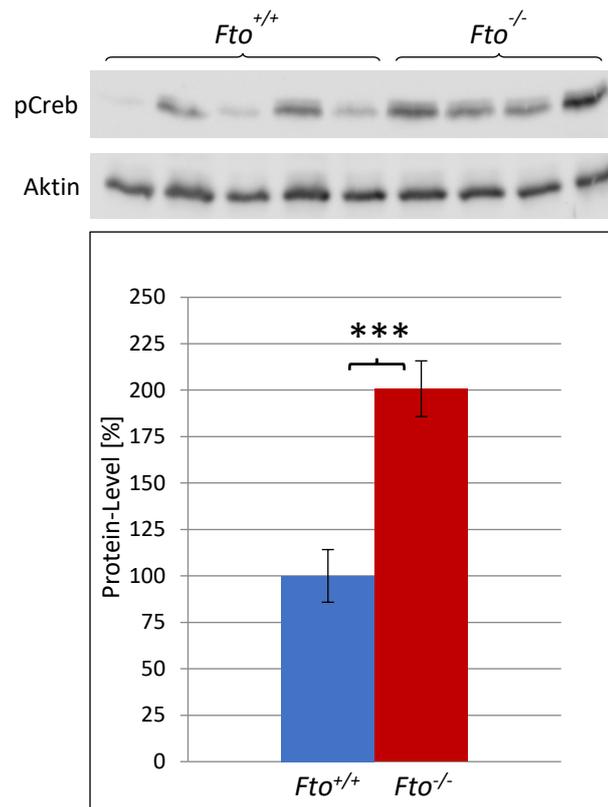


Abbildung 3.7: pCreb-Western Blot-Analysen von Hippocampus-Proteinlysaten aus *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}- Mäusen.

Dargestellt ist die Western Blot-Analyse mit Aktin als Ladekontrolle und der phosphorylierten Form von Creb von Hippocampus-Proteinlysaten aus *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen. Die quantitative Auswertung des Western Blots zeigt eine signifikante Zunahme der pCreb-Menge in den Hippocampus-Proteinlysaten von *Fto*^{-/-}-Mäusen (n = 10/8; p-Wert = 0,0001).

Das Ergebnis zeigt, dass die Hippocampus-Proteinlysate von *Fto*^{-/-}-Mäuse eine höchst signifikant erhöhte Menge an phosphoryliertem Creb im Gegensatz zu *Fto*^{+/+}-Mäusen aufweisen (Abbildung 3.7). Die aktivierte Form des Transkriptionsfaktors ist dabei ca. um den Faktor 2 in *Fto*^{-/-}-Mäusen erhöht. Unter der Voraussetzung, dass der MAPK/Erk-Signalweg in *Fto*^{-/-}-Mäusen eine geringere Aktivität aufweist (siehe 3.6), deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen der Transkriptionsfaktor Creb nicht primär durch den MAPK/Erk-Signalweg phosphoryliert wird, sondern ein weiterer Signalweg, die Phosphorylierung von Creb beeinflusst.

3.8. Externe Stimuli beeinflussen die Stresshormon-Menge und mBdnf-Mengen in *Fto*^{-/-}-Mäusen negativ.

Beim Enriched Environment handelt es sich um Haltungsbedingungen mit erhöhter kognitiver, sensorischer und motorischer Stimulation, welche sowohl Einfluss auf die neuroendokrine Stressantwort, als auch auf die Neuroplastizität und Expressionsmuster im Hippocampus haben können. Verschiedene Studien konnten bereits zeigen, dass Enriched Environment sowohl die Neurotrophin Menge im Hippocampus beeinflussen kann (Torasdotter et al., 1998; Pham et al., 1999; Ickes et al., 2000), als auch auf die Kortikosteron-Werte im Blutplasma wirkt (Emack und Matthews, 2011; Hutchinson et al., 2012; McQuaid et al., 2013). Dabei scheint vor allem der akute Stresszustand der Tiere und die korrekte Funktion der HHN-Achse einen bedeutenden Einfluss darauf zu haben, ob das Enriched Environment eine positive oder negative Wirkung auf diese Werte umsetzt.

Um zu untersuchen, in wie weit externe Stimuli in Form von Enriched Environment auf die erhöhten Kortikosteron-Werte und verringerten mBdnf-Werte in *Fto*^{-/-}-Mäusen wirken, wurden sowohl *Fto*^{+/+}- als auch *Fto*^{-/-}-Tiere für 6 Wochen unter Enriched Environment Bedingungen gehalten. Anschließend wurden die Kortikosteron-Werte im Blutplasma und die Bdnf-Menge in den Hippocampus-Proteinlysaten der einzelnen Tiere analysiert.

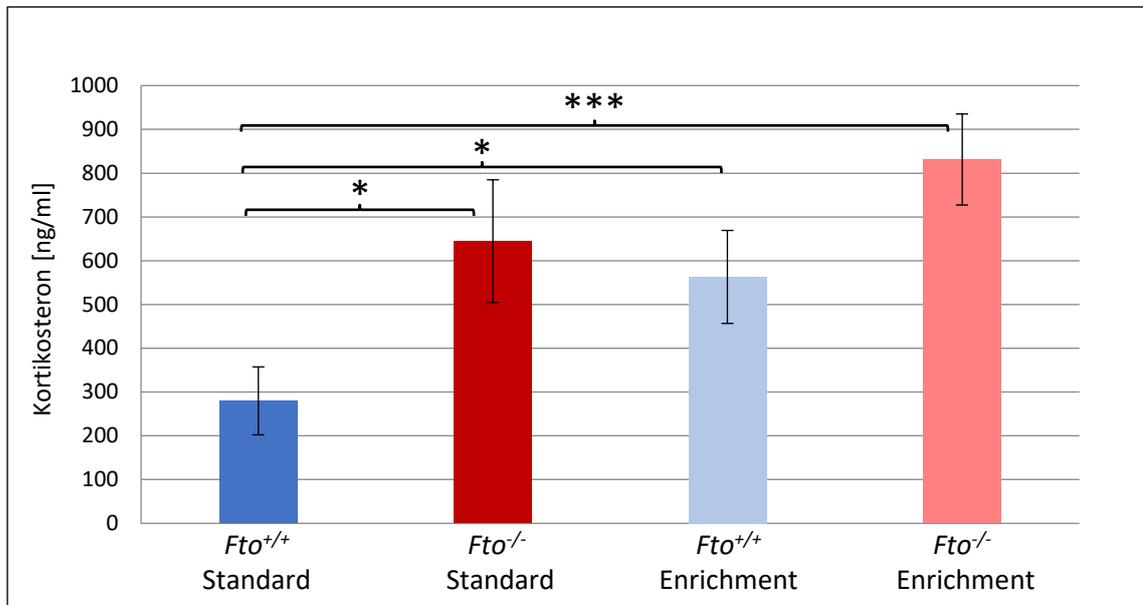


Abbildung 3.8: Kortikosteron-Konzentration im Blutplasma von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen unter Standardbedingungen und Enriched Environment.

Mittels Enzym-gekoppeltem Immunadsorptionstest wurde die Kortikosteron-Konzentration im Blutplasma von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäuse in ng/ml gemessen (n = 8/8/7/7). *Fto*^{-/-}-Mäuse und die Mäuse aus dem EE zeigen signifikant erhöhte Kortikosteron-Werte im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Mäusen unter Standardbedingungen (Standard-*Fto*^{+/+} - Standard-*Fto*^{-/-}: p-Wert = 0,0391; Standard-*Fto*^{+/+} - Enriched-*Fto*^{+/+}: p-Wert = 0,0473; Standard-*Fto*^{+/+} - Enriched-*Fto*^{-/-}: p-Wert = 0,0008). Tendenziell sind die Kortikosteron-Werte der Mäuse unter Enriched Environment höher als die der Mäuse unter Standardbedingungen.

Die Ergebnisse zeigen, dass unter Standardbedingungen, wie bereits in initialen Studien gezeigt, *Fto*^{-/-}-Mäuse einen signifikant erhöhten Kortikosteron-Wert aufweisen im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Mäusen (Abbildung 3.8). Dabei entspricht der Wert von ca. 640 ng/ml in *Fto*^{-/-}-Mäusen mehr als der doppelten Menge an Kortikosteron als in *Fto*^{+/+}-Mäusen mit ca. 280 ng/ml. Die Stimulation von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen durch Enriched Environment führt nur in *Fto*^{+/+}-Mäusen zu einem signifikant erhöhtem Kortikosteron-Wert im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Mäusen unter Standardbedingungen. In *Fto*^{-/-}-Mäusen konnte zwar ein tendenziell erhöhter Kortikosteron-Wert in der Enriched Environment Gruppe ermittelt werden, dieser zeigte jedoch keine Signifikanz im Vergleich zu *Fto*^{-/-}-Mäusen unter Standardbedingungen (p-Wert = 0,3159). Innerhalb der Enriched Environment-Gruppe konnte ebenfalls keine signifikante Differenz zwischen *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen analysiert werden (p-Wert = 0,0960).

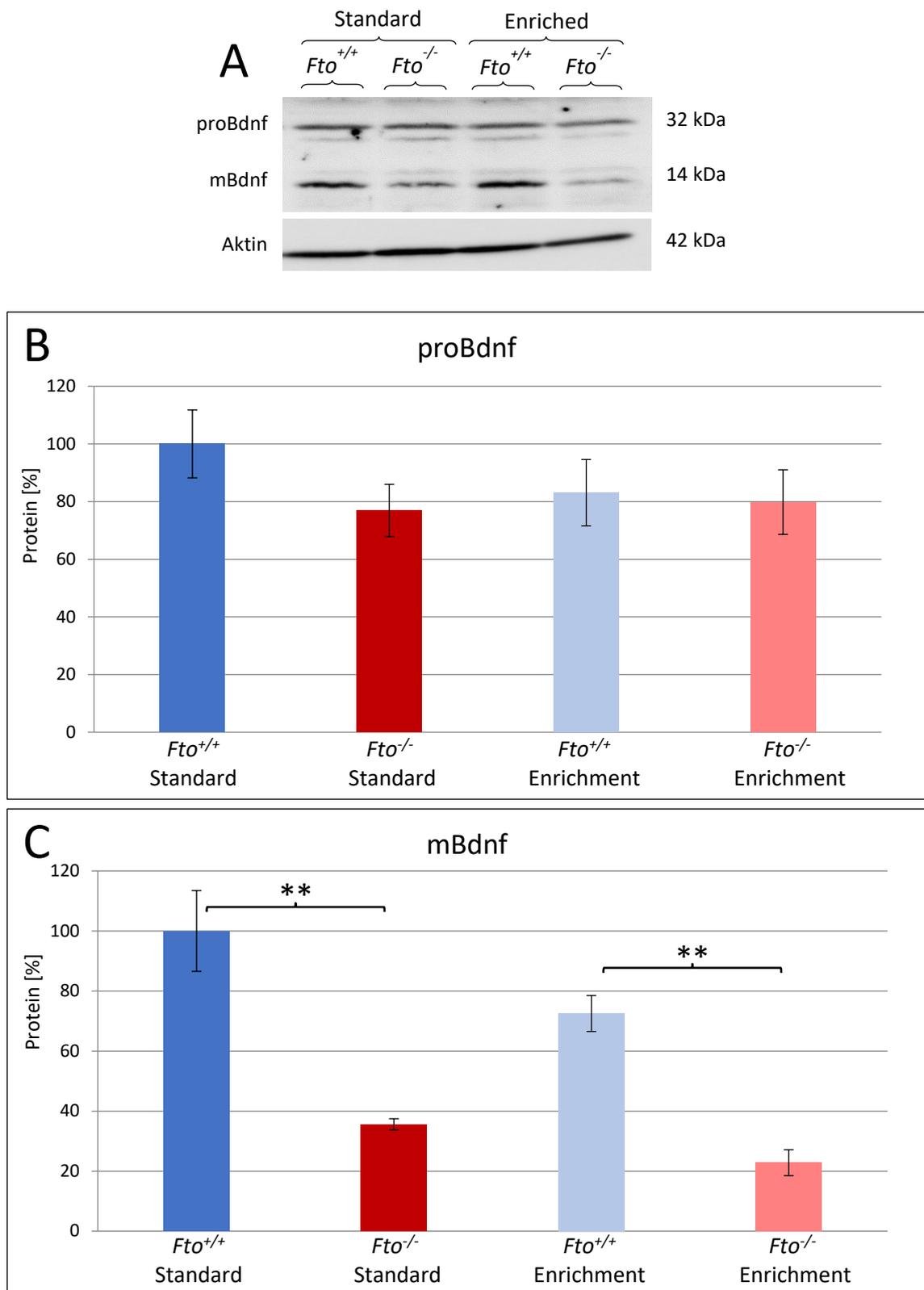


Abbildung 3.9: Bdnf-Western Blot-Analysen von Hippocampus-Proteinlysaten aus *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen unter Standardbedingungen und Enriched Environment.

(A) Western Blot-Analyse von Hippocampus-Proteinlysaten von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen. Dargestellt ist Aktin als Ladekontrolle sowie die beiden Bdnf Isoformen mBdnf und proBdnf. Es ist deutlich zu erkennen, dass die mBdnf-Isoform sowohl unter Standardbedingungen, als auch

unter Enriched Environment bei *Fto*^{-/-}-Mäusen in geringerer Menge vorliegt. (B) Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Western Blots für proBdnf in *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen in Prozent. Es liegt kein signifikanter Unterschied in der Proteinmenge vor (n = 3/3/3/3). (C) Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Western Blots für mBdnf in *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen in Prozent. *Fto*^{-/-}-Mäuse zeigen sowohl unter Standardbedingungen, als auch unter Enriched Environment eine signifikant geringere mBdnf Menge als *Fto*^{+/+}-Mäuse (n = 3/3/3/3; Standard-*Fto*^{+/+} - Standard-*Fto*^{-/-}: p-Wert = 0,0090; Enriched-*Fto*^{+/+} - Enriched-*Fto*^{-/-}: p-Wert = 0,0095).

Die Western Blot-Analysen demonstrieren, dass sowohl unter Standardbedingungen, als auch unter Enriched Environment *Fto*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Mäusen eine signifikant geringere Menge der mBdnf-Isoform im Hippocampus aufweisen (Abbildung 3.9 C). Dabei beläuft sich der mBdnf-Gehalt in *Fto*^{-/-}- Mäusen nur auf ca. 1/3 der Menge in *Fto*^{+/+}-Mäusen. Vergleicht man die beiden Versuchsgruppen untereinander, zeigt sich, dass sowohl *Fto*^{+/+}-, als auch *Fto*^{-/-}-Mäuse durch Enriched Environment eine tendenziell geringere Menge an mBdnf im Hippocampus aufweisen (Abbildung 3.9 C). Bezüglich der proBdnf Isoform lässt sich weder zwischen den Genotypen noch zwischen den beiden Versuchsgruppen eine Differenz ausmachen (Abbildung 3.9 B).

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass externe Stimuli in Form von Enriched Environment in dieser Versuchsgruppe einen eher negativen Effekt für die Physiologie der Tiere hat, welcher sowohl die Stresswerte, als auch die Neurotrophin-Mengen im Hippocampus beeinflusst. Dabei fällt auf, dass die erhöhten Kortikosteron-Werte, als auch die verringerten mBdnf-Werte im Hippocampus in der Enriched Environment-Gruppe sowohl bei *Fto*^{-/-}-Mäusen als auch bei *Fto*^{+/+}-Mäusen zu beobachten waren.

3.9. Fto beeinflusst die Prozessierung von Bdnf über die Matrix-Metalloproteinase-9

Die im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen quantifizierten, geringeren Mengen an mBdnf und die unveränderten proBdnf-Mengen deuten an, dass Fto einen Einfluss auf die Prozessierung von Bdnf hat. Wie bei vielen Neurotrophinen wird die Prozessierung von Bdnf durch verschiedene Proteasen und Konvertasen realisiert. (Mowla et al., 1999; Lee et al., 2001; Pang et al., 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb der Proteingehalt der wichtigsten Proteasen und Konvertasen, welche an der Prozessierung von Bdnf im Hippocampus beteiligt sind mittels quantitativer Real-Time PCR und Western Blot in $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäusen analysiert.

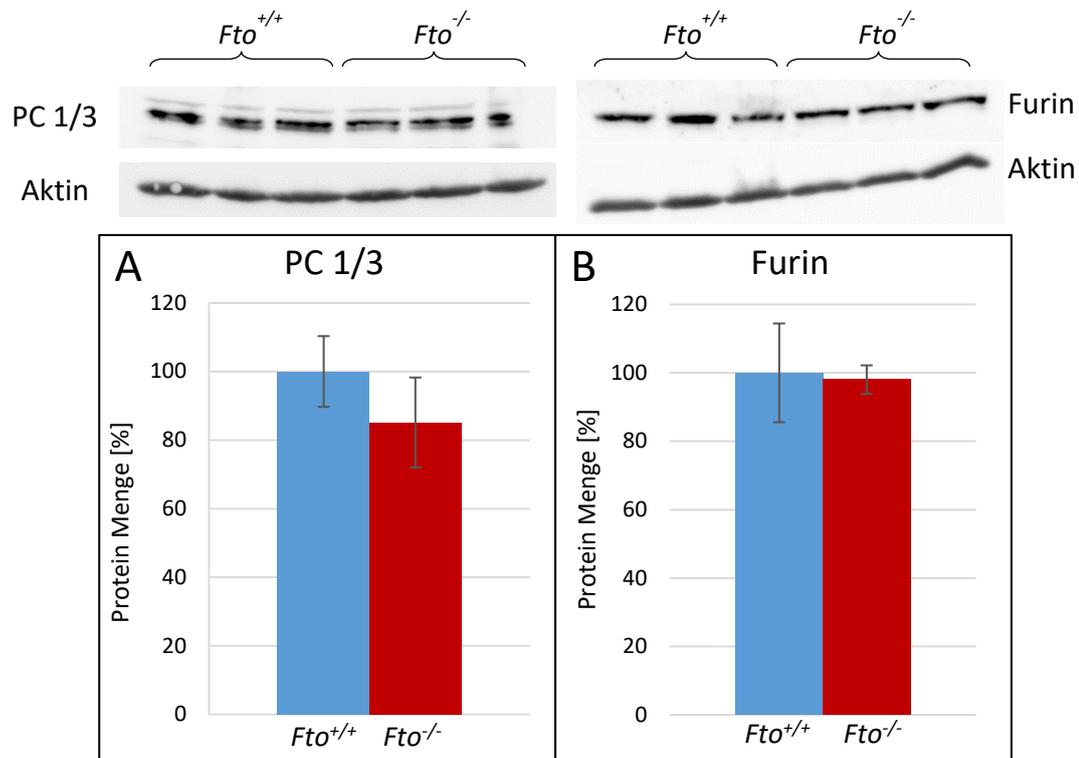


Abbildung 3.10: Western Blot-Analysen von Hippocampus-Proteinlysaten aus $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäusen für PC1/3 und Furin.

Dargestellt sind die Western Blot-Analysen für (A) PC1/3 und (B) Furin jeweils mit Aktin als Ladekontrolle von Hippocampus-Proteinlysaten aus $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäusen ($n = 3$). In keinem Fall war ein signifikanter Unterschied in der Proteinmenge auszumachen.

Die für die intrazelluläre Prozessierung von Bdnf verantwortlichen Konvertasen PC 1/3 und Furin zeigen keine Unterschiede bezüglich der Proteinmenge im Hippocampus von $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäusen (siehe Abbildung 3.10). Auch das Proenzym Plasminogen, welches eine Vorläuferform der extrazellulär-Bdnf-prozessierenden Peptidase Plasmin darstellt, ist in seiner Proteinmenge im Hippocampus der $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäuse unverändert (siehe Abbildung 3.11). Timp1 (engl.: *tissue inhibitors of metalloproteinases*) gilt als wichtigster Inhibitor von Matrix-Metalloproteinasen (Mmp), welche ebenfalls an der extrazellulären Prozessierung von proBdnf zu mBdnf beteiligt sind. Ebenso wie für Plasminogen, Furin und PC1/3 zeigte die Western Blot-Analyse von Timp1 keine Unterschiede in der Proteinmenge im Hippocampus von $Fto^{+/+}$ - und

Fto^{-/-}-Mäusen, was einen Einfluss von *Fto* auf diese Konvertasen und Proteasen ausschließt (Abbildung 3.11).

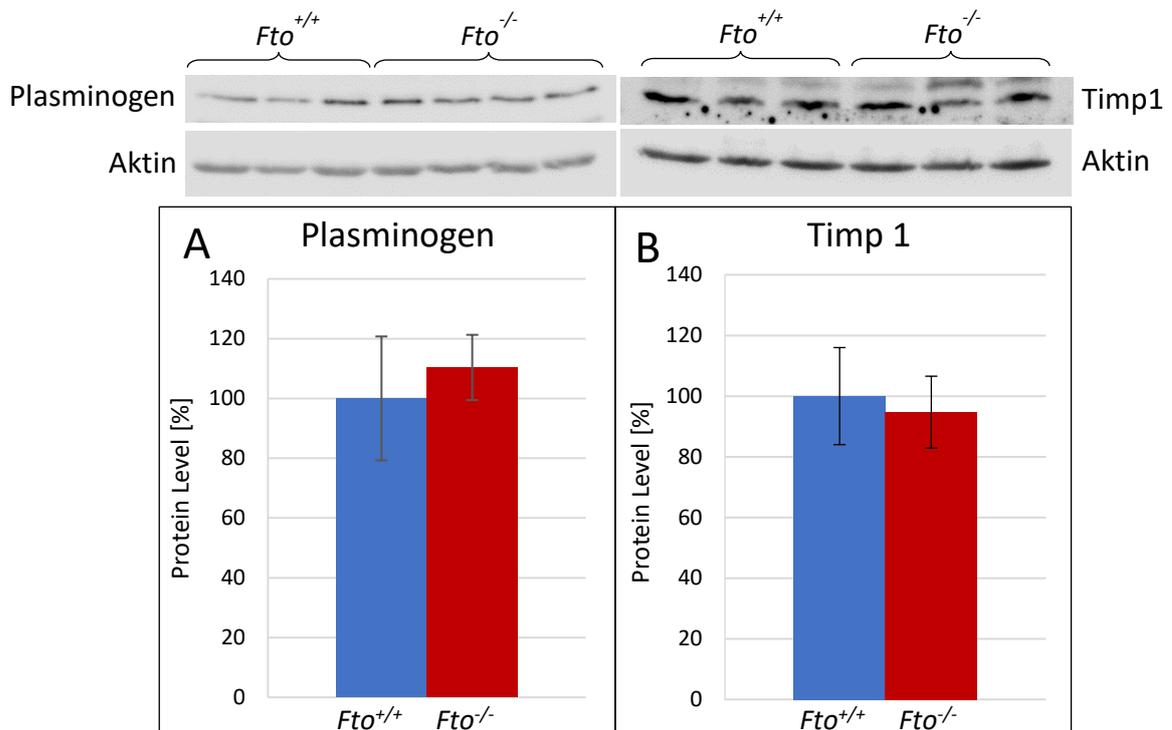


Abbildung 3.11: Western Blot-Analysen von Hippocampus-Proteinlysaten aus *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen für Plasminogen und Timp1.

Dargestellt sind die Western Blot-Analysen für (A) Plasminogen und (B) Timp1 jeweils mit Aktin als Ladekontrolle von Hippocampus-Proteinlysaten aus *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen (n = 3). In keinem Fall war ein signifikanter Unterschied in der Proteinmenge auszumachen.

Für Matrix-Metalloproteinasen konnte bereits beschrieben werden, dass sie proBdnf zu mBdnf prozessieren und wichtige Regulatoren für die neuronale Plastizität und die Funktion des Hippocampus sind (Szkarczyk et al., 2002; Bozdagi et al., 2007; Huntley, 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die Expression und der Proteingehalt der drei wichtigsten Matrix-Metalloproteinasen im Hippocampus mittels quantitativer Real-Time PCR und Western Blot in *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen analysiert.

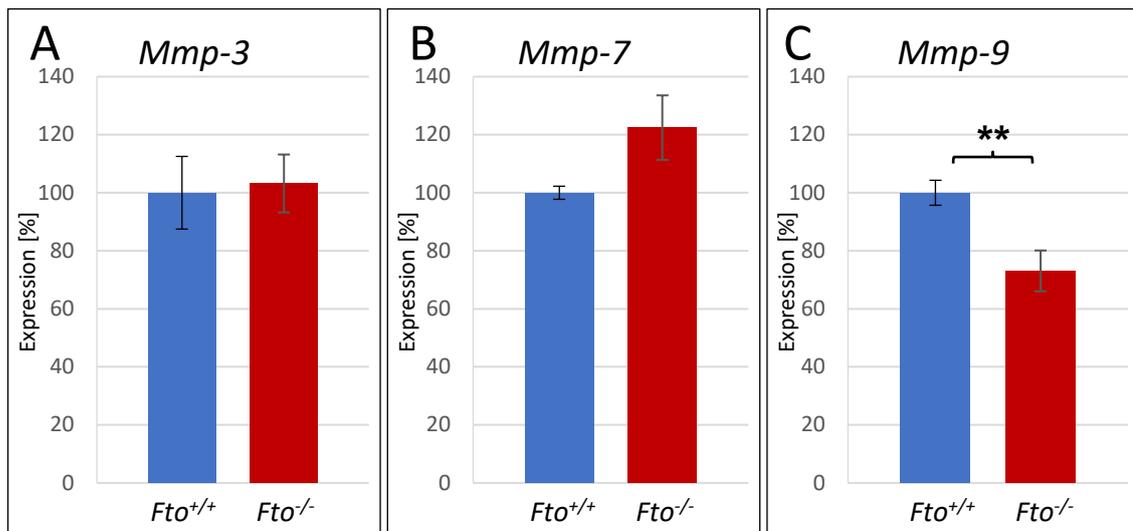


Abbildung 3.12: Expressionsanalysen für *Mmp-3*, *Mmp-7* und *Mmp-9* mittels quantitativer Real-Time PCR im Hippocampus von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen.

Dargestellt sind die Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR zur Bestimmung der Expressionsmengen von (A) *Mmp-3*, (B) *Mmp-7* und (C) *Mmp-9* im Hippocampus von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen. Während sich die Expression von *Mmp-3* und *Mmp-7* zwischen den beiden Genotypen nicht unterscheidet, ist die Expression von *Mmp-9* im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen signifikant reduziert im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Mäusen (n = 6/7; p-Wert = 0,0083).

Die quantitativen Real-Time PCR-Analysen zeigen, dass die RNA der beiden Matrix-Metalloproteinasen *Mmp-3* und *Mmp-7* keinen signifikanten Unterschied zwischen *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen in der Expression aufweist (Abbildung 3.12 A + B). Lediglich bei der RNA der Matrix-Metalloproteinasen 7 deutet sich eine Tendenz der erhöhten Expression in *Fto*^{-/-}-Tieren an (p-Wert = 0,09). Die Untersuchung der RNA der Matrix-Metalloproteinasen 9 demonstriert jedoch eine hoch signifikant geringere Expression im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Mäusen (Abbildung 3.12 C). Diese beläuft sich nur auf ca. 70 % der Expression im wildtypischen Genotyp. Das Ergebnis gibt einen ersten Hinweis darauf, dass *Mmp-9* ein Faktor sein könnte, welcher für die verringerte Prozessierung von proBdnf zu mBdnf in *Fto*^{-/-}-Mäusen verantwortlich ist.

Um dieses Ergebnis zu konkretisieren, wurde mittels Western Blot die Proteinmenge von *Mmp-7*, welche eine Tendenz zur höheren Expression zeigt und *Mmp-9*, welche signifikant geringer exprimiert wird, im Hippocampus von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen untersucht.

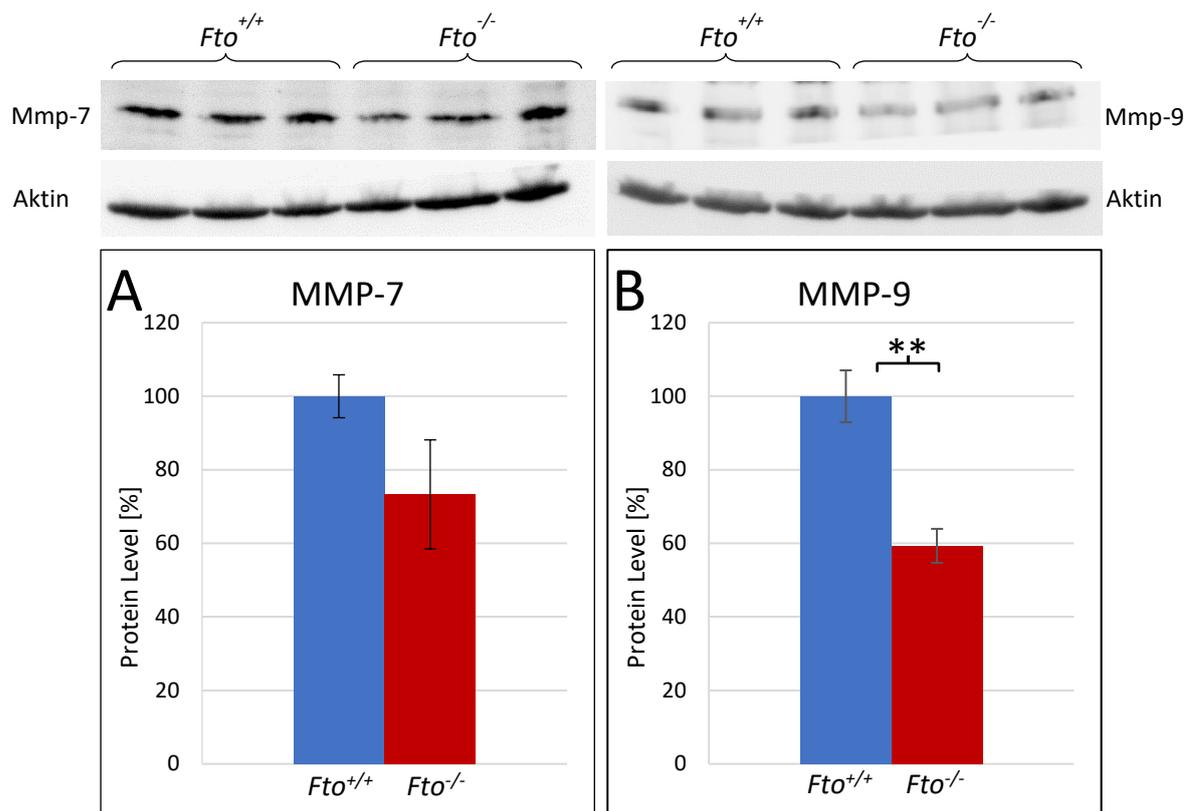


Abbildung 3.13: Western Blot-Analysen von Hippocampus-Proteinlysaten aus *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen für Mmp-7 und Mmp-9.

Dargestellt sind die Western Blot-Analysen für (A) Mmp-7 und (B) Mmp-9 jeweils mit Aktin als Ladekontrolle von Hippocampus-Proteinlysaten aus *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen (n = 3). (A) Die Proteinmenge an Mmp-7 zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Genotypen. (B) Die Menge an Mmp-9 ist hoch signifikant reduziert im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen (p-Wert = 0,0084).

Bezüglich der Proteinmenge lässt sich durch den Western Blot eine hoch signifikant verringerte Menge an Mmp-9 im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen nachweisen (Abbildung 3.13 B). Dabei beträgt die Mmp-9 Menge in *Fto*^{-/-}-Mäusen nur ca. 60 % der Normalmenge in *Fto*^{+/+}-Mäusen. Bezüglich der Mmp-7 Menge zeigt sich im Western Blot kein signifikanter Unterschied, auch wenn eine tendenziell geringere Menge an Mmp-7 im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäuse festzustellen ist (Abbildung 3.13 A; p-Wert = 0,1692).

Die Western Blot-Analysen bestätigen die Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR für Mmp-9. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl auf Expressionsebene, als auch auf Proteinebene signifikant weniger Mmp-9 im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen vorhanden ist. Somit scheint eine Abhängigkeit zwischen *Fto* und Mmp-9 zu bestehen, welche unter

anderem für die verringerte Prozessierung von proBdnf zu mBdnf in *Fto*^{-/-}-Mäusen verantwortlich ist.

4. Diskussion

4.1. Fto ist ein wichtiger Faktor für die Funktion der neuroendokrinen Stressantwort

Die HHN-Achse stellt den wichtigsten Regelkreis für die hormonelle Reaktion eines Körpers auf physische oder psychische Stressoren dar. Ihre Funktion ist es, neuronale Reize in hormonelle Signale umzuwandeln, welche daraufhin verschiedene Prozesse im Körper der vorliegenden Situation anpassen. Dabei veranlassen neuronale Reize aus dem limbischen System den Hypothalamus das Hormon CRH freizusetzen, welches daraufhin die Hypophyse stimuliert. Diese wiederum gibt das Hormon ACTH in den Blutkreislauf ab. ACTH wirkt auf die Nebennierenrinde und regt die Sekretion von Glukokortikoiden, Mineralokortikoiden und Sexualhormonen an. Vor allem die Glukokortikoide sind für die Stressantwort von entscheidender Bedeutung. Sie vermitteln pleiotrope Effekte in verschiedenen Teilen des Körpers, um auf den Stressor zu reagieren. Dazu zählt vor allem eine erhöhte Energiebereitstellung durch Aktivierung der Glukoneogenese und Lipolyse, sowie die Immunsuppression. Glukokortikoide vermitteln außerdem eine hemmende Wirkung auf die Teile des limbischen Systems, welche die Stressreaktion ausgelöst haben. Dadurch ist gewährleistet, dass sobald auf einen Stressor reagiert wurde, der Organismus in seine ursprüngliche Homöostase zurückkehren kann.

Erste Analysen konnten zeigen, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse signifikant erhöhte Kortikosteron-Werte im Blutplasma aufweisen (Abbildung 9.1). Um zu untersuchen, ob diese erhöhten Werte die Auswirkung einer Hyperaktivierung der HHN-Achse sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Hormon ACTH im Blutplasma von *Fto*^{-/-}- und *Fto*^{+/+}-Mäusen quantifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse signifikant höhere ACTH-Werte im Blutplasma aufweisen als *Fto*^{+/+}-Tiere (siehe Abbildung 3.1). Dieses Ergebnis demonstriert, dass der Verlust von *Fto* zu einer Hyperaktivierung der HHN-Achse führt, was eine vermehrte Sekretion von Kortikosteron bedingt. Einige phänotypische Auffälligkeiten von *Fto*^{-/-}-Mäusen könnten durch diese HHN-Achsen-Hyperaktivierung verursacht werden. So konnte beschrieben werden, dass chronischer Stress bei Nagetieren zu verringertem Wachstum und geringerem Geburtsgewicht führt, sowie zu einem verminderten Explorationsverhalten und gesteigerter Ängstlichkeit (Poltyrev et al., 1996; Cabrera et al., 1999; Weinstock, 2005). Bei *Fto*^{-/-}-Mäusen konnte bereits 2 Tage nach der Geburt ein geringeres Gewicht und eine Wachstumsretardation festgestellt werden

(Fischer et al., 2009). Ebenso konnte in vorangegangenen Studien zu dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse ein verringertes Explorationsverhalten und eine signifikant gesteigerte Ängstlichkeit aufweisen (siehe Abbildung 8.2 und Abbildung 8.3). In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine dauerhafte Exposition von Stress zu einer Schwächung des Immunsystems führt und die Anfälligkeit gegenüber Infektionen und die Ausbreitung von Tumoren begünstigt (Stefanski und Ben-Eliyahu, 1996; Zen et al., 2011). Auch zeigen Studien, dass eine Hyperaktivierung der HHN-Achse negative Auswirkungen auf die Reproduktionsfähigkeit hat (Sapolsky et al., 2000). Sowohl eine erhöhte Sterblichkeit, als auch eine stark eingeschränkte Reproduktion konnte in *Fto*^{-/-}-Mäusen in bisher unveröffentlichten Studien in unserem Institut nachgewiesen werden. Die erhöhte Sterblichkeit in *Fto*^{-/-}-Mäusen könnte also eine Folge der durch Stress ausgelösten Schwächung des Immunsystems sein. Ebenso könnte die Hyperaktivierung der HHN-Achse die Ursache für die eingeschränkte Reproduktion in *Fto*^{-/-}-Mäusen sein. All diese Ergebnisse untermauern den Zusammenhang zwischen *Fto* und der chronischen Hyperaktivierung der HHN-Achse.

Neben diesen physiologischen Auswirkungen führen erhöhte Glukokortikoide und chronischer Stress auch im zentralen Nervensystem zu teils erheblichen Einschränkungen. So kann die Gehirnentwicklung durch erhöhte Glukokortikoide negativ beeinflusst werden und vor allem Teile des limbischen Systems, welche für die negative Rückkopplung der HHN-Achse verantwortlich sind, können geschädigt werden (Diamond et al., 1992; Liston und Gan, 2011). Dabei gilt speziell der Hippocampus als wichtigster Bestandteil des limbischen Systems für die negative Rückkopplung, da er eine besonders hohe Dichte an Mineralokortikoidrezeptoren und Glukokortikoidrezeptoren aufweist, welche bei einer Aktivierung über multisynaptische Signale repressiv auf die Freisetzung von CRH im Hypothalamus wirken (Reul und de Kloet, 1985; Radley und Sawchenko, 2011). Durch chronisch erhöhte Glukokortikoide kommt es im Hippocampus zu einer dauerhaften Aktivierung der Glukokortikoidrezeptoren, was eine verringerte Expression von diesen in den Zellen auslöst. Dies führt zu einer weiteren Beeinträchtigung der negativen Rückkopplung und löst einen selbsterhaltenden negativen Kreislauf aus, welcher in einer Dysregulation der HHN-Achse resultiert (Kitchener et al., 2004). Aus diesem Grund können chronisch erhöhte Glukokortikoide langfristig zu strukturellen und zellulären Schäden in Form von Atrophie der Dendriten oder der neuronalen Plastizität im Hippocampus führen (Sapolsky et al., 1990; Sousa et al., 2000; Liston und Gan, 2011). Auch konnte gezeigt werden, dass chronisch erhöhte

Glukokortikoide die Möglichkeit der Glukoseverwertung im Hippocampus reduzieren und damit die Neuronen anfälliger für metabolische Schäden machen (Virgin et al., 1991; Lawrence und Sapolsky, 1994). Dies führt im schlimmsten Fall zur Excitotoxizität, also dem Zelltod in Folge von Reizüberflutung (Roy und Sapolsky, 2003). All diese Erkenntnisse zeigen den direkten und indirekten Einfluss einer HHN-Achsen-Dysregulation auf den Hippocampus. Aus diesem Grund wurde dieser in *Fto*^{-/-}-Mäusen im Rahmen dieser Arbeit genauer bezüglich seiner Morphologie und Funktion untersucht.

4.2. Fto beeinflusst die Zelldifferenzierung und kognitive Leistungsfähigkeit des Hippocampus

In wie weit sich die HHN-Achsen-Dysregulation mit erhöhten Kortikosteron-Werten in *Fto*^{-/-}-Mäusen auf den Hippocampus auswirkt, wurde in dieser Arbeit anhand von zwei verschiedenen Gedächtnis-Tests und histologischen Analysen evaluiert. In den histologischen Untersuchungen konnte ein geringerer Anteil an Doublecortin-positiven Zellen im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.4 B). Der Anteil an BrdU positiven Zellen scheint im Gegensatz dazu nicht verändert zu sein (siehe Abbildung 3.4 A). Zu Beginn dieser Arbeit waren keine Konsequenzen einer *Fto*^{-/-}-Defizienz für den Hippocampus beschrieben. Vor wenigen Wochen konnten Li und Kollegen erstmals in *Fto*^{-/-}-Mausmutanten beschreiben, dass *Fto* eine wichtige Rolle in der adulten Neurogenese des Hippocampus hat (Li et al., 2017). So konnte die Gruppe ebenfalls eine geringere Anzahl an Doublecortin positiven Zellen im Hippocampus nachweisen, stellte diese Anzahl jedoch nicht ins Verhältnis mit der Gesamtanzahl an Zellen im Hippocampus. Da *Fto*^{-/-}-Mäuse jedoch einen geringeren Körperwuchs aufweisen, ist davon auszugehen, dass sie generell eine geringere Anzahl an Zellen und damit auch eine geringere Anzahl an Doublecortin positiven Zellen im Hippocampus aufweisen. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden die Doublecortin positiven Zellen ins Verhältnis mit der Gesamtzellzahl des Hippocampus gesetzt (siehe Abbildung 3.4 B). Da Doublecortin nur während der Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu adulten Neuronen exprimiert wird, gibt das Ergebnis Grund zu der Annahme, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse eine gestörte Zelldifferenzierung im Hippocampus aufweisen. Dieser Differenzierungsdefekt könnte eine direkte Folge der chronisch erhöhten Kortikosteron-Menge in *Fto*^{-/-}-Mäusen sein. Es konnte bereits gezeigt werden,

dass Kortikosteron direkt die Differenzierung von Vorläuferzellen im Hippocampus beeinflusst. Auch wurde nachgewiesen, dass durch hohe Kortikosteron-Mengen die korrekte Integration der reifenden Neuronen in den Gyrus dentatus eingeschränkt ist (Workman et al., 2015). Diese strukturellen Schäden gehen meist einher mit verringerten kognitiven Funktionen, sowie psychischen Erkrankungen. Für *Fto*^{-/-}-Mäuse konnte bereits evaluiert werden, dass diese eine signifikant erhöhte Ängstlichkeit aufweisen (siehe Abbildung 8.2 und Abbildung 8.3) (Spsychala, 2013). Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass diese psychische Störung oft im Zusammenhang mit einer verringerten Anzahl an Doublecortin-positiven Zellen im Hippocampus und damit einer eingeschränkten Differenzierung der Neuronen steht (Sahay et al., 2011; Lee et al., 2016). Somit könnte die erhöhte Ängstlichkeit in *Fto*^{-/-}-Mäusen eine Kausalität der eingeschränkten neuronalen Differenzierung im Hippocampus sein. In wie weit *Fto* für diese Prozesse direkt oder indirekt verantwortlich ist und ob diese Auffälligkeiten sekundäre Effekte einer *Fto*-Defizienz sind lässt sich anhand der Ergebnisse nicht sagen. Bezüglich der Funktion von *Fto* als RNA-Demethylase gibt es bis zum heutigen Zeitpunkt keine konkreten Daten, welche einen Einfluss von RNA-Methylierung auf die neuronale Differenzierung im Hippocampus, die erhöhte Ängstlichkeit oder die Dysregulation der HHN-Achse zeigen. Es wurden jedoch andere epigenetische Modifikationen beschrieben, welche direkt Einfluss auf die oben beschriebenen Ausprägungen haben. So konnte gezeigt werden, dass Depressions-ähnliche Verhaltensmuster wie Angststörungen epigenetisch reguliert werden können. Eine Studie an Mäusen konnte demonstrieren, dass Inhibitoren von DNA-Methyltransferasen positiv auf diese Verhaltensstörungen wirken (Sales und Joca, 2016). *Fto* könnte folglich ähnlich wie die DNA-Methyltransferase-Inhibitoren positiv auf psychologische Zustände wirken, indem es auf RNA-Ebene involvierte mRNAs demethyliert. Dies wäre eine Erklärung für die erhöhte Ängstlichkeit von *Fto*^{-/-}-Mäusen im EPM und CET (siehe Abbildung 8.2 und Abbildung 8.3). Auch konnte für die HHN-Achse eine epigenetische Regulation nachgewiesen werden. Auf Ebene der DNA-Methylierung wurde demonstriert, dass der Promotor des CRHs in chronisch gestressten Ratten im Nucleus paraventricularis hypermethyliert ist, was den Einfluss von epigenetischen Modifikationen auf die HHN-Achse belegt (Sterrenburg et al., 2011). Da *Fto* eine RNA-Demethylase ist, könnte die HHN-Achse durch *Fto* auch auf RNA-Ebene beeinflusst werden. So könnten in *Fto*^{-/-}-Mäusen hypermethylierte RNAs von HHN-Achsen spezifischen Genen zu einer Dysfunktion dieser führen und den gestressten Phänotyp mit erhöhten ACTH- und Kortikosteron-Werten bedingen (siehe

Abbildung 3.1 und Abbildung 8.1). Vor allem die erhöhten Kortikosteron-Werte könnten darauf hin durch die Bindungen an Glukokortikoidrezeptoren die Differenzierung von Vorläuferzellen im Hippocampus negativ beeinflussen.

Neben diesen morphologischen Auswirkungen führen erhöhte Glukokortikoide langfristig zu einer Einschränkung der kognitiven Fähigkeiten im Hippocampus (de Quervain et al., 1998; Coburn-Litvak et al., 2003). Auch wurde ein gesteigertes Angstverhalten mit verringerten kognitiven Funktionen assoziiert (Papaleo et al., 2011). In dieser Arbeit wurde deshalb sowohl das Langzeitgedächtnis, als auch das Arbeitsgedächtnis von *Fto*^{-/-}-Mäusen in zwei unabhängigen Verhaltenstests analysiert. Die Ergebnisse des Radial Arm Maze konnten demonstrieren, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse sowohl mehr Zeit benötigten, um die gestellte Aufgabe zu bewältigen, als auch mehr Versuche benötigen und mehr Fehler begingen als *Fto*^{+/+}-Mäuse (siehe Abbildung 3.2). Da die benötigte Zeit als Faktor auch von der physischen Verfassung der Mäuse beeinflusst wird, lässt sich durch dieses Ergebnis allein noch keine konkrete Aussage zum Einfluss von *Fto* auf das Arbeitsgedächtnis treffen. Die länger benötigte Zeit der *Fto*^{-/-}-Mäuse könnte auch durch die für *Fto*^{-/-}-Mäuse beschriebene kleinere Körpergröße oder durch motorische Einschränkungen verursacht werden. Die Tatsache, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Mäusen mehr als doppelt so viele Fehler in dem Test machten, demonstriert deutlich, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse ein signifikant eingeschränktes Arbeitsgedächtnis haben. Um zu untersuchen, in wie weit die Funktion des Langzeitgedächtnisses in *Fto*^{-/-}-Mäusen eingeschränkt ist, wurde außerdem ein Morris Water Maze Test durchgeführt. Im Gegensatz zum Radial Arm Maze zeigten *Fto*^{-/-}-Mäuse in diesem Test keine Auffälligkeiten und waren ebenso wie *Fto*^{+/+}-Mäuse in der Lage sich die Position der Plattform über einen Zeitraum von 5 Tagen zu merken (siehe Abbildung 3.3). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass *Fto* zwar für die korrekte Funktion des Arbeitsgedächtnisses nötig ist, jedoch keinen Einfluss auf das Langzeitgedächtnis in Mäusen hat. Dieses Ergebnis könnte damit zusammenhängen, dass für das Arbeitsgedächtnis vor allem der Hippocampus von entscheidender Bedeutung ist, während für das Langzeitgedächtnis verschiedene Hirnareale verantwortlich sind. So konnte gezeigt werden, dass der mediale präfrontale Kortex ebenfalls für das Erinnerungsvermögen wichtig ist, wobei der Hippocampus primär für den Abruf kürzlich generierter Erinnerungen aktiviert ist, während der präfrontale Kortex vor allem für den Abruf weiter entfernter Erinnerungen aktiviert zu sein scheint (Frankland et al., 2004; Takashima et al., 2006). Sowohl die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung des

Hippocampus (siehe Abbildung 3.4), als auch die Analysen der HHN-Achse mit erhöhten Kortikosteron-Werten (siehe Abbildung 8.1), legen nahe, dass der Hippocampus in *Fto*^{-/-}-Mäusen stark belastet und seine Funktion beeinträchtigt ist. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass in *Fto*^{-/-}-Mäusen nur das Arbeitsgedächtnis und nicht das Langzeitgedächtnis eingeschränkt ist. So konnten verschiedene Studien zeigen, dass der Hippocampus zwar für das Arbeitsgedächtnis zwingend benötigt wird, jedoch für das Abrufen länger vergangener Erinnerungen nicht von entscheidender Bedeutung ist (Takehara et al., 2003; Maviel et al., 2004). Neben der Tatsache, dass durch die erhöhten Kortikosteron-Werte und die eingeschränkte Zelldifferenzierung im Hippocampus das Arbeitsgedächtnis in *Fto*^{-/-}-Mäusen auf sekundäre Weise eingeschränkt ist, könnte *Fto* auch direkt eine wichtige Rolle in der kognitiven Leistungsfähigkeit des Hippocampus haben. So konnte zumindest für den präfrontalen Kortex gezeigt werden, dass verschiedene mRNAs, von für die neuronale Plastizität verantwortlichen Genen einen erhöhten Anteil an m⁶A im Bereich des Stopp-Codons besitzen (Widagdo et al., 2016). Weitere Analysen konnten zeigen, dass *Fto* im präfrontalen Kortex im direkten Zusammenhang mit durch Angst induziertem Erinnerungsvermögen steht (Widagdo et al., 2016). Somit könnte *Fto* auch im Hippocampus durch die epigenetische Regulation von mRNAs bestimmter Gene für die neuronale Plastizität auf die kognitive Leistungsfähigkeit wirken.

4.3. Fto beeinflusst die extrazelluläre Prozessierung von proBdnf zu mBdnf im Hippocampus

Neben den hormonellen und morphologischen Einflüssen gibt es weitere wichtige Faktoren, welche für die korrekte Funktion, die Morphologie und die Entwicklung des Hippocampus von entscheidender Bedeutung sind. Der wichtigste ist das Neurotrophin Brain-derived neurotrophic factor (Bdnf). Bdnf gilt als wichtigstes Neurotrophin für den Hippocampus, da es durch die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege dessen Leistungsfähigkeit und Funktionen stark beeinflusst. Dabei ist entscheidend, in welcher Isoform Bdnf im Hippocampus vorliegt. Das synthetisierte Vorläuferprotein proBdnf vermittelt über seinen Rezeptor p75^{NTR} Apoptose und Zellzyklusarrest, während die prozessierte mBdnf Isoform über ihren Rezeptor TrkB eine neuroprotektive Wirkung vermittelt, welche sich positiv auf die neuronale Plastizität und damit die kognitive

Leistungsfähigkeit auswirkt (Neeper et al., 1995; Linnarsson et al., 1997; Bramham und Messaoudi, 2005; Teng et al., 2005; Woo et al., 2005). Aufgrund der gegensätzlichen Wirkung von proBdnf und mBdnf stellt die Regulation der Prozessierung von Bdnf einen möglichen neuen Ansatzpunkt für die Behandlung neurologischer Erkrankungen dar. Zu Beginn dieser Dissertation waren keine Zusammenhänge zwischen Bdnf und Fto beschrieben. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Fto in humanen Neuroblastom-Zellen indirekt die Expression von *Bdnf* beeinflussen kann und dass die *Bdnf*-Expression im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen verringert ist (Lin et al., 2014; Li et al., 2017). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte in den vorangegangenen Analysen eine signifikant geringere Expression von *Bdnf* im Hippocampus der *Fto*^{-/-}-Mäuse nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8.4) (Spsychala, 2013). In den weiterführenden Analysen im Rahmen dieser Dissertation konnte darauf hin mittels Western Blot evaluiert werden, dass ein signifikant geringerer Anteil der mBdnf-Isoform im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen vorliegt, während die Menge der proBdnf-Isoform unverändert ist (siehe Abbildung 3.5). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die posttranslationale proteolytische Prozessierung von Bdnf abhängig von Fto im Hippocampus beeinflusst wird. Analysen verschiedener Proteine, welche für die Prozessierung von Bdnf verantwortlich sind, konnten zeigen, dass im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen die Matrix-Metalloproteinasen 9 sowohl eine verringerte Expressionsrate, als auch eine verringerte Proteinmenge aufweist (siehe Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13) Analysen der weiteren Matrix-Metalloproteinasen Mmp-3 und Mmp-7 zeigten keinen signifikanten Unterschied abhängig vom Genotyp (siehe Abbildung 3.12 und Abbildung 3.13). Auch waren andere, für die Prozessierung von Bdnf verantwortliche Proteine in ihrer Proteinmenge im Hippocampus unverändert. So konnte gezeigt werden, dass die für die intrazelluläre Prozessierung verantwortliche Endoprotease Furin und Proproteinkonvertase 1 und 3, sowie das für die extrazelluläre Prozessierung verantwortliche Plasminogen und der direkte Inhibitor der Mmps TIMP1 (engl.: *tissue inhibitor of metalloproteinases*) im Western Blot keine signifikanten Unterschiede in der Proteinmenge im Hippocampus von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen aufweisen (siehe Abbildung 3.11 und Abbildung 3.10). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die verringerte Menge an mBdnf im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen mit großer Wahrscheinlichkeit ein Resultat der verringerten Menge an Mmp-9 ist. In wie weit Fto direkt oder indirekt für die verringerte Menge an Mmp-9 verantwortlich ist, lässt sich anhand der Analysen nicht eindeutig klären. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnte nur auf DNA-Ebene gezeigt werden,

dass epigenetische Modifikationen die Expression von Mmp-9 beeinflussen. So führte die Behandlung einer Lymphomzelllinie mit einem DNA-Methylierungs-Inhibitor zu einer verringerten Methylierung des Mmp-9 Promotors, was eine erhöhte Expression von Mmp-9 zu Folge hatte (Chicoine et al., 2002). Die Abwesenheit von Fto als Demethylase in *Fto*^{-/-}-Mäusen könnte demnach zu einer vermehrten Methylierung der Mmp-9-mRNA führen, welche sich daraufhin negativ auf die Translation auswirkt. Sowohl für den Menschen, als auch für die Maus konnten bis zum jetzigen Stand verschiedene mögliche m⁶A-Seiten auf der Mmp-9-mRNA vorhergesagt werden. Während bei der Maus auf jedem der 13 Mmp-9-Exons m⁶A-Methylierungen vermutet werden, konnten beim Menschen bis jetzt nur auf Exon 9, 10 und 11 mögliche m⁶A-Seiten prognostiziert werden (Liu et al., 2015). Diese stellen potenzielle Ansatzpunkte für Fto dar, um über die Demethylase-Funktion die Menge an Mmp-9 im Hippocampus zu beeinflussen. Neben dieser direkten Möglichkeit von Fto Mmp-9 zu regulieren und damit die Prozessierung von Bdnf zu beeinflussen, könnte die Menge an Mmp-9 im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen auch indirekt beeinflusst werden. Das *Mmp-9*-Gen weist im Gegensatz zu anderen Matrix-Metalloproteinase-Genen ein NFκB-Cis-Element in seiner Promotor-Region auf (Sato und Seiki, 1993). Studien evaluierten, dass eine *Fto*-Überexpression in Zellen zu einer Aktivierung von NFκB führt, während in *Fto*^{-/-}-Mäusen die Aktivität von NFκB im Hypothalamus verringert ist (Fan et al., 2015; Tung et al., 2015). Die verringerte Menge an Mmp-9 im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen könnte folglich aus einer geringeren Aktivität von NFκB resultieren. Eine weitere Ursache für die gestörte Prozessierung von proBdnf zu mBdnf im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen könnte der chronisch erhöhte Kortikosteronspiegel im Blutplasma sein (siehe Abbildung 8.1). Neben den Auswirkungen von Kortikosteron auf die kognitive Leistungsfähigkeit des Hippocampus, konnten einige Studien demonstrieren, dass Kortikosteron die proteolytische Prozessierung von Bdnf negativ beeinflusst. So zeigten Dong und Kollegen, dass Kortikosteron die Proproteinkonvertase 1 reprimiert, während Gelehrter und Kollegen nachwiesen, dass Glukokortikoide die Funktion von Plasminogen inhibieren (Gelehrter et al., 1987; Dong et al., 1997). Sowohl die erhöhten Kortikosteron-Mengen, als auch die verringerten Mengen an mBdnf sind Indikatoren für ein depressives Verhalten (Halbreich et al., 1985; Cunha et al., 2006). Für Enriched Environment (EE) konnte nachgewiesen werden, dass es sich positiv auf die Bdnf-Menge, sowie auf die Lernfähigkeit und kognitive Fähigkeiten auswirkt (Tang et al., 2001; Lee et al., 2003; Rossi et al., 2006). Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Dissertation *Fto*^{+/+}- und

Fto^{-/-}-Mäuse unter Enriched Environment-Bedingungen gehalten und die Auswirkungen auf die Menge der Bdnf-Isoformen und die Kortikosteron-Menge analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäuse negativ auf das EE reagieren. Sowohl *Fto*^{+/+}- als auch *Fto*^{-/-}-Mäuse zeigen nach 6 Woche EE einen erhöhten Kortikosteron Spiegel im Blutplasma im Vergleich zu Mäusen aus Standard-Haltungsbedingungen (siehe Abbildung 3.8). Auch auf die Prozessierung von Bdnf schien sich das EE in beiden Genotypen negativ auszuwirken. So kam es durch EE sowohl in den *Fto*^{+/+}-, als auch in den *Fto*^{-/-}-Mäusen zu einer Abnahme der Menge an mBdnf im Vergleich zu den Standardbedingungen (siehe Abbildung 3.9). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine reizvolle Umgebung auf *Fto*^{-/-}-Mäuse keinen positiven Einfluss hat, sondern sich gegenteilig negativ auswirkt. Ein möglicher Grund dafür könnte der generell chronisch erhöhte Kortikosteron-Spiegel in *Fto*^{-/-}-Mäusen darstellen, welcher dazu führt, dass vermehrte äußere Reize als Stress interpretiert werden und somit die erhöhten Kortikosteron-Mengen zusätzlich potenzieren. Dies würde sich folglich negativ auf die Bdnf-Prozessierung auswirken, was die geringeren Mengen an mBdnf in *Fto*^{-/-}-Mäusen unter EE erklären könnte. Die Tatsache, dass auch *Fto*^{+/+}-Mäuse negativ durch das EE beeinflusst werden, könnte darin begründet sein, dass die Tiere zusammen mit *Fto*^{-/-}-Mäusen dem EE ausgesetzt waren. Innerhalb der Gruppe könnten die *Fto*^{-/-}-Mäuse als Stressoren auf die *Fto*^{+/+}-Mäuse gewirkt haben. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die reizvolle Umgebung auf die Mäuse als positiver Stressor gewirkt hat. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass EE eine Art positiven Stress in Mäusen auslösen kann, welcher zu erhöhten Kortikosteron-Werten führt, diese jedoch nicht schädlich auf neuronale Strukturen wirken (Haemisch et al., 1994; Marashi et al., 2003; Moncek et al., 2004; Schoenfeld und Gould, 2012).

All diese Möglichkeiten zeigen den komplexen Zusammenhang zwischen der Funktion von *Fto*, den Auswirkungen einer *Fto*-Defizienz in Mäusen und den möglichen molekularen Zusammenhängen, welche zur verringerten Prozessierung von proBdnf zu mBdnf in *Fto*^{-/-}-Mäusen führt. Letztendlich lässt sich festhalten, dass *Fto* direkt oder indirekt über *Mmp-9* die Prozessierung von proBdnf zu mBdnf im Hippocampus reguliert. Unabhängig von der Ursache, wurden auch die Folgen der niedrigeren Menge an mBdnf im Hippocampus untersucht.

4.4. Die gestörte Bdnf-Prozessierung in *Fto*^{-/-}-Mäusen beeinflusst die Aktivität der Bdnf-abhängigen Signalwege im Hippocampus

mBdnf vermittelt seine Wirkung über den membranständigen Rezeptor TrkB, welcher den MAPK/Erk-, PI3K/Akt- und PLC/PKC-Signalweg aktivieren kann (Araki et al., 2000; Groth und Mermelstein, 2003; Ou und Gean, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels Western Blot evaluiert werden, dass weniger der phosphorylierten Form von MEK1/2 im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen vorliegt (siehe Abbildung 3.6). Dies demonstriert, dass die verringerte Menge an mBdnf zu einer Abnahme der Aktivität des MAPK/Erk-Signalwegs im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen führt. Der MAPK/Erk-Signalweg reguliert unter anderem das Wachstum (Sugimoto et al., 2001), die Differenzierung (Yin et al., 2010), die Zellinvasion (Zhang et al., 2010), den Schutz (Szatmari et al., 2007) und die Freisetzung von Neurotransmittern (Jovanovic et al., 2000) in Neuronen. Damit stellt die geringere Aktivität dieses Signalwegs eine weitere Kausalität für die gestörte Differenzierung der neuronalen Vorläufer im Gyrus dentatus und für die eingeschränkte kognitive Leistungsfähigkeit von *Fto*^{-/-}-Mäusen dar. Da bereits gezeigt werden konnte, dass der Transkriptionsfaktor Creb in Neuroblastom-Zellen abhängig von Fto phosphoryliert und damit aktiviert werden kann und dieser Faktor auch ein Ziel des MAPK/Erk-Signalwegs darstellt, wurde im Rahmen dieser Dissertation die Menge an phosphoryliertem Creb im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen ermittelt (Lin et al., 2014). Trotz der Erkenntnis, dass der MAPK/Erk-Signalweg im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen eine verringerte Aktivität hat, zeigte die Western Blot-Analyse einen signifikant erhöhten Anteil an phosphoryliertem Creb im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Mäusen (siehe Abbildung 3.7). Dies erscheint auf den ersten Blick kontrovers. Eine mögliche Erklärung ist die Tatsache, dass Creb über viele unterschiedliche Signalwege aktiviert werden kann, welche im Falle von *Fto*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum MAPK/Erk-Signalweg einen stärkeren Einfluss auf Creb haben könnten. So gilt es als erwiesen, dass die Aktivierung des β 1-Adrenozeptors durch Adrenalin und Noradrenalin eine Signaltransduktionskaskade aktiviert, welche ebenfalls in der Phosphorylierung von Creb resultiert (Stranahan und Mattson, 2012). Für *Fto*^{-/-}-Mäuse wurden bereits erhöhte Adrenalin- und Noradrenalinwerte beschrieben, sodass die erhöhte Menge an phosphoryliertem Creb im Hippocampus von *Fto*^{-/-}-Mäusen ein Resultat dieser Erhöhung darstellen könnte und somit unabhängig vom MAPK/Erk-Signalweg wäre (Fischer et al.,

2009). Auch unter dem Aspekt, dass die Expression von Bdnf selbst über Creb reguliert wird und in *Fto*^{-/-}-Mäusen dennoch eine geringere Expression von Bdnf und eine vermehrte Menge an phosphoryliertem Creb nachgewiesen werden konnte, erscheint diskutabel (siehe Abbildung 3.7 und Abbildung 8.4). Interessanterweise ist die Aktivität von Creb nicht nur von der Phosphorylierung abhängig, sondern wird auch direkt durch Glukokortikoide beeinflusst (Daskalakis et al., 2015). Um die Transkription zu aktivieren, muss Creb mit dem Co-Aktivator-Protein Crtc2 (engl.: *Creb-regulated transcription coactivator 2*) interagieren. Chronisch erhöhte Glukokortikoide wie Kortikosteron führen zur Phosphorylierung von Crtc2, was eine Translokation vom Zellkern ins Zytoplasma zur Folge hat und damit die Creb-abhängige Transkription negativ beeinflusst (Jeanneteau et al., 2012). Dies würde erklären, warum *Fto*^{-/-}-Mäuse zwar eine erhöhte Menge an phosphoryliertem Creb im Hippocampus aufweisen, dies jedoch keinen positiven Einfluss auf die Expression von Bdnf hat, da der erhöhte Kortikosteron-Spiegel die Lokalisation von Crtc2 in den Zellkern negativ beeinflusst und damit die Creb-abhängige Expression hemmt. All diese Ergebnisse und Zusammenhänge zeigen, wie sehr in *Fto*^{-/-}-Mäusen die natürliche Homöostase durch die veränderte spezifische Balance von Glukokortikoiden und Bdnf gestört ist und das *Fto* somit von entscheidender Bedeutung für die korrekte Funktion des Hippocampus ist.

5. Zusammenfassung

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, mögliche Funktionen von Fto im Hippocampus durch Analysen in *Fto*^{-/-}-Mäusen zu evaluieren. Durch vorrangegangene Analysen konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von Fto in Mäusen zu gesteigerten Stressparametern in Form von erhöhten Kortikosteron-Werten im Blutplasma und einer gesteigerten Ängstlichkeit führt. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen konnte im Rahmen dieser Dissertation gezeigt werden, dass Fto eine wichtige Rolle in der Regulation der neuroendokrinen Stressantwort hat. So führt eine Fto-Defizienz zu chronisch erhöhten ACTH-Werten im Blutplasma, was eine Hyperaktivität der HHN-Achse indiziert. Diese Fehlregulation geht einher mit funktionellen und morphologischen Einschränkungen des Hippocampus, welcher das wichtigste Hirnkompartiment für die negative Rückkopplung der HHN-Achse darstellt. Die Analysen an *Fto*^{-/-}-Mäusen in zwei Verhaltenstests ergaben, dass Fto ein entscheidender Faktor für kognitive Leistungen ist. Es wurde demonstriert, dass *Fto*^{-/-}-Mäuse Defizite im Arbeitsgedächtnis aufweisen, welches ebenfalls dem Funktionsumfang des Hippocampus zugeordnet wird. Neben diesen funktionellen Aspekten konnte mittels Immunfluoreszenzanalysen eine eingeschränkte Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen im Gyrus dentatus evaluiert werden. Als Ursache für diese funktionellen und morphologischen Defekte des Hippocampus in *Fto*^{-/-}-Mäusen konnte ein Prozessierungsdefekt des wichtigen Neurotrophins Bdnf ausgemacht werden. So führt eine Fto-Defizienz zu einer verringerten Menge an Matrix-Metalloproteinase-9 im Hippocampus, welche in einem gestörten Verhältnis von proBdnf und mBdnf mit verringerter mBdnf-Mengen resultiert. Dies führt unter anderem zu einer verringerten Aktivierung des MAPK/Erk-Signalwegs, welcher für die Differenzierung, das Wachstum, die Zellinvasion und den Schutz von Neuronen verantwortlich ist. In wie weit Fto durch seine Funktion als Demethylase direkt auf die oben genannten Faktoren wirkt, ist spekulativ. Vielmehr scheint es eine Kombination aus unterschiedlichen Faktoren zu sein, welche durch Fto als Demethylase beeinflusst werden und die oben beschriebenen Zusammenhänge bedingt.

5.1. Abstract

The aim of this study was to investigate possible functions of Fto in the hippocampus by analysing *Fto*^{-/-}-mice. At the beginning of this work, no correlations between Fto and the functionality of the hippocampus were described. Preliminary analyses during the master thesis showed that the loss of Fto leads to increased stress parameters in mice in the form of elevated Corticosterone values in the blood plasma and an increased anxiety. Based on these findings, it has been shown that Fto plays an important role in the regulation of the neuroendocrine stress response. Thus, Fto deficiency leads to chronically elevated ACTH values in the blood plasma, which indicates hyperactivity of the HHN axis. This misregulation is accompanied by functional and morphological limitations of the hippocampus, which is the most important brain compartment for the negative feedback of the HHN axis. Further behavioural tests showed that Fto is a decisive factor for cognitive performance. Investigation of *Fto*^{-/-}-mice in the Radial Arm Maze revealed deficits in working memory, which is also assigned to the functional range of the hippocampus. In addition to these functional aspects, a limited differentiation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus could be evaluated by immunofluorescence analyses. As a cause for these functional and morphological defects of the hippocampus in *Fto*^{-/-}-mice, a processing defect of the neurotrophin Bdnf could be found. Thus, Fto deficiency leads to a reduced amount of matrix metalloproteinase-9 in the hippocampus, resulting in a disturbed ratio of proBdnf and mBdnf with reduced mBdnf level. This leads to a reduced activation of the MAPK/Erk signalling pathway, which is responsible for the differentiation, growth, cell invasion and protection of neurons. The extent to which Fto acts directly on the above-mentioned factors by its function as demethylase is speculative. Rather, it appears to be a combination of different factors influenced by Fto as demethylase, which is responsible for the above-described relationships.

6. Abkürzungen und Einheiten

Abkürzungen:

%	Prozent
&	und
Δ	delta
§	Paragraph
♀	Weibchen
♂	Männchen
A	Absorption
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
Abs.	Absatz
ACTH	Adrenokortikotropin, Adrenokortikotropes Hormon
ad libitum	nach Belieben
Bdnf	Brain-derived neurotrophic factor
BGBI	Bundesgesetzblatt
BMI	Body Mass Index
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CET	Cage Emergence Test
CRH	Corticotropin-releasing hormone
Ct	cycle threshold (Schwellenwert-Zyklus)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
demin.	demineralisiert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphatgemisch
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EIA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
engl.	englisch
EPM	Elevated Plus Maze
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FRET	fluorescence resonance energy transfer
Fto	Fat mass and obesity associated
fwd	forward
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GR	Glukokortikoidrezeptor
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
in vitro	außerhalb eines lebenden Organismus
in vivo	im lebenden Organismus
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW
MR	Mineralokortikoidrezeptor
n()	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
Neo	Neomycin
p()	P-Wert , Angabe für Signifikanzen
p75 ^{NTR}	p75 neurotrophin receptor
PC	Personal Computer
PCR	Polymerase Chain Reaction
POMC	Proopiomelanocortin
ProtK	Proteinase K
PVN	paraventriculärer Nucleus
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
S	Seite

SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
StabW	Standardabweichung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	thermus aquaticus
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
TrkB	neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2
t-Test	Vergleich der Mittelwerte von Stichproben
UV	Ultraviolett
z. B.	zum Beispiel
Σ	Summe

Einheiten:

A	Ampere
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
k	kilo
kDa	kilo-Dalton
l	Liter
m	Meter
m	milli (10^{-3})
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
Mol	$6,023 \times 10^{23}$ Teilchen
mol	Mol/l
n	nano (10^{-9})
p	piko (10^{-12})
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
s	Sekunden

Std.	Stunde
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
w/v	Gewicht auf Volumen
μ	mikro (10^{-6})

7. Literaturverzeichnis

- Agnew-Blais, J. und Danese, A.** (2016). Childhood maltreatment and unfavourable clinical outcomes in bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Psychiatry* 3, 342-349.
- Allen, S.J., Dawbarn, D., Eckford, S.D., Wilcock, G.K., Ashcroft, M., Colebrook, S.M., Feeney, R. und MacGowan, S.H.** (1994). Cloning of a non-catalytic form of human trkB and distribution of messenger RNA for trkB in human brain. *Neuroscience* 60, 825-834.
- Ansoorge, M.S., Hen, R. und Gingrich, J.A.** (2007). Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Curr Opin Pharmacol* 7, 8-17.
- Araki, T., Yamada, M., Ohnishi, H., Sano, S.I. und Hatanaka, H.** (2000). BIT/SHPS-1 enhances brain-derived neurotrophic factor-promoted neuronal survival in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurochem* 75, 1502-1510.
- Arriza, J.L., Simerly, R.B., Swanson, L.W. und Evans, R.M.** (1988). The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron* 1, 887-900.
- Auernhammer, C.J. und Melmed, S.** (1999). Interleukin-11 stimulates proopiomelanocortin gene expression and adrenocorticotropin secretion in corticotroph cells: evidence for a redundant cytokine network in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology* 140, 1559-1566.
- Balkowiec, A. und Katz, D.M.** (2002). Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J Neurosci* 22, 10399-10407.
- Barde, Y.A., Edgar, D. und Thoenen, H.** (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1, 549-553.
- Benedict, C., Jacobsson, J.A., Ronnemaa, E., Sallman-Almen, M., Brooks, S., Schultes, B., Fredriksson, R., Lannfelt, L., Kilander, L. und Schioth, H.B.** (2011). The fat mass and obesity gene is linked to reduced verbal fluency in overweight and obese elderly men. *Neurobiol Aging* 32, 1159 e1151-1155.
- Blum, R. und Konnerth, A.** (2005). Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda)* 20, 70-78.
- Boissel, S., Reish, O., Proulx, K., Kawagoe-Takaki, H., Sedgwick, B., Yeo, G.S., Meyre, D., Golzio, C., Molinari, F., Kadhon, N., et al.** (2009). Loss-of-function mutation in the dioxygenase-encoding FTO gene causes severe growth retardation and multiple malformations. *Am J Hum Genet* 85, 106-111.
- Bosch, M. und Hayashi, Y.** (2012). Structural plasticity of dendritic spines. *Curr Opin Neurobiol* 22, 383-388.
- Bozdagi, O., Nagy, V., Kwei, K.T. und Huntley, G.W.** (2007). In vivo roles for matrix metalloproteinase-9 in mature hippocampal synaptic physiology and plasticity. *J Neurophysiol* 98, 334-344.
- Bramham, C.R. und Messaoudi, E.** (2005). BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 76, 99-125.
- Cabrera, R.J., Rodriguez-Echandia, E.L., Jatuff, A.S. und Foscolo, M.** (1999). Effects of prenatal exposure to a mild chronic variable stress on body weight, preweaning mortality and rat behavior. *Braz J Med Biol Res* 32, 1229-1237.
- Carrasco, G.A. und Van de Kar, L.D.** (2003). Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 463, 235-272.

- Casaccia-Bonofil, P., Carter, B.D., Dobrowsky, R.T. und Chao, M.V.** (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 383, 716-719.
- Cecil, J.E., Tavendale, R., Watt, P., Hetherington, M.M. und Palmer, C.N.** (2008). An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. *N Engl J Med* 359, 2558-2566.
- Chan, J.P., Unger, T.J., Byrnes, J. und Rios, M.** (2006). Examination of behavioral deficits triggered by targeting Bdnf in fetal or postnatal brains of mice. *Neuroscience* 142, 49-58.
- Chao, M.V., Bothwell, M.A., Ross, A.H., Koprowski, H., Lanahan, A.A., Buck, C.R. und Sehgal, A.** (1986). Gene transfer and molecular cloning of the human NGF receptor. *Science* 232, 518-521.
- Cheung, M.K., Gulati, P., O'Rahilly, S. und Yeo, G.S.** (2013). FTO expression is regulated by availability of essential amino acids. *Int J Obes (Lond)* 37, 744-747.
- Chicoine, E., Esteve, P.O., Robledo, O., Van Themsche, C., Potworowski, E.F. und St-Pierre, Y.** (2002). Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 765-772.
- Christie, B.R. und Cameron, H.A.** (2006). Neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus* 16, 199-207.
- Chrobak, J.J., Lorincz, A. und Buzsaki, G.** (2000). Physiological patterns in the hippocampo-entorhinal cortex system. *Hippocampus* 10, 457-465.
- Chrousos, G.P.** (1995). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 332, 1351-1362.
- Church, C., Lee, S., Bagg, E.A., McTaggart, J.S., Deacon, R., Gerken, T., Lee, A., Moir, L., Mecinovic, J., Quwailid, M.M., et al.** (2009). A mouse model for the metabolic effects of the human fat mass and obesity associated FTO gene. *PLoS Genet* 5, e1000599.
- Coburn-Litvak, P.S., Pothakos, K., Tata, D.A., McCloskey, D.P. und Anderson, B.J.** (2003). Chronic administration of corticosterone impairs spatial reference memory before spatial working memory in rats. *Neurobiol Learn Mem* 80, 11-23.
- Cornes, B.K., Lind, P.A., Medland, S.E., Montgomery, G.W., Nyholt, D.R. und Martin, N.G.** (2009). Replication of the association of common rs9939609 variant of FTO with increased BMI in an Australian adult twin population but no evidence for gene by environment (G x E) interaction. *Int J Obes (Lond)* 33, 75-79.
- Cunha, A.B., Frey, B.N., Andreazza, A.C., Goi, J.D., Rosa, A.R., Goncalves, C.A., Santin, A. und Kapczinski, F.** (2006). Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett* 398, 215-219.
- Daskalakis, N.P., De Kloet, E.R., Yehuda, R., Malaspina, D. und Kranz, T.M.** (2015). Early Life Stress Effects on Glucocorticoid-BDNF Interplay in the Hippocampus. *Front Mol Neurosci* 8, 68.
- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S. und Joels, M.** (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 19, 269-301.
- de Quervain, D.J., Roozendaal, B. und McGaugh, J.L.** (1998). Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature* 394, 787-790.
- Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M. und Alessi, D.R.** (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* 17, 4426-4441.
- den Hoed, M., Westerterp-Plantenga, M.S., Bouwman, F.G., Mariman, E.C. und Westerterp, K.R.** (2009). Postprandial responses in hunger and satiety are associated

- with the rs9939609 single nucleotide polymorphism in FTO. *Am J Clin Nutr* 90, 1426-1432.
- Diamond, D.M., Bennett, M.C., Fleshner, M. und Rose, G.M.** (1992). Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus* 2, 421-430.
- Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Korner, A., Jacobson, P., Carlsson, L.M., Kiess, W., Vatin, V., Lecoeur, C., et al.** (2007). Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39, 724-726.
- Distelhorst, C.W.** (2002). Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 9, 6-19.
- Dong, W., Seidel, B., Marcinkiewicz, M., Chretien, M., Seidah, N.G. und Day, R.** (1997). Cellular localization of the prohormone convertases in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei: selective regulation of PC1 in corticotrophin-releasing hormone parvocellular neurons mediated by glucocorticoids. *J Neurosci* 17, 563-575.
- Emack, J. und Matthews, S.G.** (2011). Effects of chronic maternal stress on hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) function and behavior: no reversal by environmental enrichment. *Horm Behav* 60, 589-598.
- Fan, H.Q., He, W., Xu, K.F., Wang, Z.X., Xu, X.Y. und Chen, H.** (2015). FTO Inhibits Insulin Secretion and Promotes NF-kappaB Activation through Positively Regulating ROS Production in Pancreatic beta cells. *PLoS One* 10, e0127705.
- Finkbeiner, S., Tavazoie, S.F., Maloratsky, A., Jacobs, K.M., Harris, K.M. und Greenberg, M.E.** (1997). CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses. *Neuron* 19, 1031-1047.
- Fischer, J., Koch, L., Emmerling, C., Vierkotten, J., Peters, T., Bruning, J.C. und Rütther, U.** (2009). Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* 458, 894-898.
- Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L. und Silva, A.J.** (2004). The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304, 881-883.
- Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., Perry, J.R., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W., et al.** (2007). A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316, 889-894.
- Freathy, R.M., Timpson, N.J., Lawlor, D.A., Pouta, A., Ben-Shlomo, Y., Ruukonen, A., Ebrahim, S., Shields, B., Zeggini, E., Weedon, M.N., et al.** (2008). Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes* 57, 1419-1426.
- Fredriksson, R., Hagglund, M., Olszewski, P.K., Stephansson, O., Jacobsson, J.A., Olszewska, A.M., Levine, A.S., Lindblom, J. und Schioth, H.B.** (2008). The obesity gene, FTO, is of ancient origin, up-regulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology* 149, 2062-2071.
- Gau, D., Lemberger, T., von Gall, C., Kretz, O., Le Minh, N., Gass, P., Schmid, W., Schibler, U., Korf, H.W. und Schutz, G.** (2002). Phosphorylation of CREB Ser142 regulates light-induced phase shifts of the circadian clock. *Neuron* 34, 245-253.
- Gelehrter, T.D., Sznycer-Laszuk, R., Zeheb, R. und Cwikel, B.J.** (1987). Dexamethasone inhibition of tissue-type plasminogen activator (tPA) activity: paradoxical induction of both tPA antigen and plasminogen activator inhibitor. *Mol Endocrinol* 1, 97-101.

- Gerken, T., Girard, C.A., Tung, Y.C., Webby, C.J., Saudek, V., Hewitson, K.S., Yeo, G.S., McDonough, M.A., Cunliffe, S., McNeill, L.A., et al.** (2007). The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318, 1469-1472.
- Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A. und Fuchs, E.** (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17, 2492-2498.
- Groth, R.D. und Mermelstein, P.G.** (2003). Brain-derived neurotrophic factor activation of NFAT (nuclear factor of activated T-cells)-dependent transcription: a role for the transcription factor NFATc4 in neurotrophin-mediated gene expression. *J Neurosci* 23, 8125-8134.
- Grunnet, L.G., Nilsson, E., Ling, C., Hansen, T., Pedersen, O., Groop, L., Vaag, A. und Poulsen, P.** (2009). Regulation and function of FTO mRNA expression in human skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue. *Diabetes* 58, 2402-2408.
- Gulati, P., Cheung, M.K., Antrobus, R., Church, C.D., Harding, H.P., Tung, Y.C., Rimmington, D., Ma, M., Ron, D., Lehner, P.J., et al.** (2013). Role for the obesity-related FTO gene in the cellular sensing of amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 2557-2562.
- Haemisch, A., Voss, T. und Gartner, K.** (1994). Effects of environmental enrichment on aggressive behavior, dominance hierarchies, and endocrine states in male DBA/2J mice. *Physiol Behav* 56, 1041-1048.
- Halbreich, U., Asnis, G.M., Shindlecker, R., Zumoff, B. und Nathan, R.S.** (1985). Cortisol secretion in endogenous depression. I. Basal plasma levels. *Arch Gen Psychiatry* 42, 904-908.
- Hamanoue, M., Middleton, G., Wyatt, S., Jaffray, E., Hay, R.T. und Davies, A.M.** (1999). p75-mediated NF-kappaB activation enhances the survival response of developing sensory neurons to nerve growth factor. *Mol Cell Neurosci* 14, 28-40.
- Han, Z., Niu, T., Chang, J., Lei, X., Zhao, M., Wang, Q., Cheng, W., Wang, J., Feng, Y. und Chai, J.** (2010). Crystal structure of the FTO protein reveals basis for its substrate specificity. *Nature* 464, 1205-1209.
- Haupt, A., Thamer, C., Staiger, H., Tschritter, O., Kirchhoff, K., Machicao, F., Haring, H.U., Stefan, N. und Fritsche, A.** (2009). Variation in the FTO gene influences food intake but not energy expenditure. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117, 194-197.
- Hess, M.E., Hess, S., Meyer, K.D., Verhagen, L.A., Koch, L., Bronneke, H.S., Dietrich, M.O., Jordan, S.D., Saletore, Y., Elemento, O., et al.** (2013). The fat mass and obesity associated gene (Fto) regulates activity of the dopaminergic midbrain circuitry. *Nat Neurosci* 16, 1042-1048.
- Heymach, J.V., Jr., Kruttgen, A., Suter, U. und Shooter, E.M.** (1996). The regulated secretion and vectorial targeting of neurotrophins in neuroendocrine and epithelial cells. *J Biol Chem* 271, 25430-25437.
- Heymer, J., Kuehn, M. und Rüther, U.** (1997). The expression pattern of nodal and lefty in the mouse mutant Ft suggests a function in the establishment of handedness. *Mech Dev* 66, 5-11.
- Hinney, A., Nguyen, T.T., Scherag, A., Friedel, S., Bronner, G., Muller, T.D., Grallert, H., Illig, T., Wichmann, H.E., Rief, W., et al.** (2007). Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS One* 2, e1361.
- Ho, A.J., Stein, J.L., Hua, X., Lee, S., Hibar, D.P., Leow, A.D., Dinov, I.D., Toga, A.W., Saykin, A.J., Shen, L., et al.** (2010). A commonly carried allele of the obesity-

- related FTO gene is associated with reduced brain volume in the healthy elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 8404-8409.
- Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G. und Evans, R.M.** (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318, 635-641.
- Holtzman, C.W., Trotman, H.D., Goulding, S.M., Ryan, A.T., Macdonald, A.N., Shapiro, D.I., Brasfield, J.L. und Walker, E.F.** (2013). Stress and neurodevelopmental processes in the emergence of psychosis. *Neuroscience* 249, 172-191.
- Huntley, G.W.** (2012). Synaptic circuit remodelling by matrix metalloproteinases in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 13, 743-757.
- Hutchinson, K.M., McLaughlin, K.J., Wright, R.L., Bryce Ortiz, J., Anouti, D.P., Mika, A., Diamond, D.M. und Conrad, C.D.** (2012). Environmental enrichment protects against the effects of chronic stress on cognitive and morphological measures of hippocampal integrity. *Neurobiol Learn Mem* 97, 250-260.
- Ickes, B.R., Pham, T.M., Sanders, L.A., Albeck, D.S., Mohammed, A.H. und Granholm, A.C.** (2000). Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp Neurol* 164, 45-52.
- Jacobson, L. und Sapolsky, R.** (1991). The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 12, 118-134.
- Jacobsson, J.A., Danielsson, P., Svensson, V., Klovin, J., Gyllensten, U., Marcus, C., Schioth, H.B. und Fredriksson, R.** (2008). Major gender difference in association of FTO gene variant among severely obese children with obesity and obesity related phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 476-482.
- Jacobsson, J.A., Schioth, H.B. und Fredriksson, R.** (2012). The impact of intronic single nucleotide polymorphisms and ethnic diversity for studies on the obesity gene FTO. *Obes Rev* 13, 1096-1109.
- Jeanneteau, F.D., Lambert, W.M., Ismaili, N., Bath, K.G., Lee, F.S., Garabedian, M.J. und Chao, M.V.** (2012). BDNF and glucocorticoids regulate corticotrophin-releasing hormone (CRH) homeostasis in the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1305-1310.
- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y.G., et al.** (2011). N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nat Chem Biol* 7, 885-887.
- Jia, G., Yang, C.G., Yang, S., Jian, X., Yi, C., Zhou, Z. und He, C.** (2008). Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. *FEBS Lett* 582, 3313-3319.
- Jourdi, H., Hsu, Y.T., Zhou, M., Qin, Q., Bi, X. und Baudry, M.** (2009). Positive AMPA receptor modulation rapidly stimulates BDNF release and increases dendritic mRNA translation. *J Neurosci* 29, 8688-8697.
- Jovanovic, J.N., Czernik, A.J., Fienberg, A.A., Greengard, P. und Sihra, T.S.** (2000). Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci* 3, 323-329.
- Kamura, Y., Iwata, M., Maeda, S., Shinmura, S., Koshimizu, Y., Honoki, H., Fukuda, K., Ishiki, M., Usui, I., Fukushima, Y., et al.** (2016). FTO Gene Polymorphism Is Associated with Type 2 Diabetes through Its Effect on Increasing the Maximum BMI in Japanese Men. *PLoS One* 11, e0165523.
- Kandel, E.R.** (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294, 1030-1038.

- Kaplan, D.R., Martin-Zanca, D. und Parada, L.F.** (1991). Tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase activity of the trk proto-oncogene product induced by NGF. *Nature* 350, 158-160.
- Keller, L., Xu, W., Wang, H.X., Winblad, B., Fratiglioni, L. und Graff, C.** (2011). The obesity related gene, FTO, interacts with APOE, and is associated with Alzheimer's disease risk: a prospective cohort study. *J Alzheimers Dis* 23, 461-469.
- Kempermann, G.** (2002). Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 22, 635-638.
- Kendler, K.S., Karkowski, L.M. und Prescott, C.A.** (1999). Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156, 837-841.
- Kilpelainen, T.O., Qi, L., Brage, S., Sharp, S.J., Sonestedt, E., Demerath, E., Ahmad, T., Mora, S., Kaakinen, M., Sandholt, C.H., et al.** (2011). Physical activity attenuates the influence of FTO variants on obesity risk: a meta-analysis of 218,166 adults and 19,268 children. *PLoS Med* 8, e1001116.
- Kim, J.J. und Diamond, D.M.** (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 3, 453-462.
- Kitchener, P., Di Blasi, F., Borrelli, E. und Piazza, P.V.** (2004). Differences between brain structures in nuclear translocation and DNA binding of the glucocorticoid receptor during stress and the circadian cycle. *Eur J Neurosci* 19, 1837-1846.
- Klein, R., Parada, L.F., Coulier, F. und Barbacid, M.** (1989). trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J* 8, 3701-3709.
- Klinke, R., Pape, H.C. und Silbernagl, S.** (2005). Physiologie. 5. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Kofman, O.** (2002). The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 26, 457-470.
- Korte, M., Carroll, P., Wolf, E., Brem, G., Thoenen, H. und Bonhoeffer, T.** (1995). Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8856-8860.
- Lamballe, F., Klein, R. und Barbacid, M.** (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66, 967-979.
- Lawrence, M.S. und Sapolsky, R.M.** (1994). Glucocorticoids accelerate ATP loss following metabolic insults in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 646, 303-306.
- Lee, E.H., Hsu, W.L., Ma, Y.L., Lee, P.J. und Chao, C.C.** (2003). Enrichment enhances the expression of sgk, a glucocorticoid-induced gene, and facilitates spatial learning through glutamate AMPA receptor mediation. *Eur J Neurosci* 18, 2842-2852.
- Lee, R., Kermani, P., Teng, K.K. und Hempstead, B.L.** (2001). Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945-1948.
- Lee, S.J., Kim, T.W., Park, H.K., Yoon, S., You, A.H., Moon, E.J., Shin, D.H. und Cho, H.** (2016). Postnatal Treadmill Exercise Alleviates Prenatal Stress-Induced Anxiety in Offspring Rats by Enhancing Cell Proliferation Through 5-Hydroxytryptamine 1A Receptor Activation. *Int Neurol J* 20, S57-64.
- Leibrock, J., Lottspeich, F., Hohn, A., Hofer, M., Hengerer, B., Masiakowski, P., Thoenen, H. und Barde, Y.A.** (1989). Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 341, 149-152.
- Lessmann, V. und Brigadski, T.** (2009). Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci Res* 65, 11-22.

- Li, L., Zang, L., Zhang, F., Chen, J., Shen, H., Shu, L., Liang, F., Feng, C., Chen, D., Tao, H., et al.** (2017). Fat mass and obesity-associated (FTO) protein regulates adult neurogenesis. *Hum Mol Genet*.
- Lin, L., Hales, C.M., Garber, K. und Jin, P.** (2014). Fat mass and obesity-associated (FTO) protein interacts with CaMKII and modulates the activity of CREB signaling pathway. *Hum Mol Genet* 23, 3299-3306.
- Linnarsson, S., Bjorklund, A. und Ernfors, P.** (1997). Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci* 9, 2581-2587.
- Liston, C. und Gan, W.B.** (2011). Glucocorticoids are critical regulators of dendritic spine development and plasticity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16074-16079.
- Liu, H., Flores, M.A., Meng, J., Zhang, L., Zhao, X., Rao, M.K., Chen, Y. und Huang, Y.** (2015). MeT-DB: a database of transcriptome methylation in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 43, D197-203.
- Liu, J.S., Park, E.A., Gurney, A.L., Roesler, W.J. und Hanson, R.W.** (1991). Cyclic AMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription is mediated by multiple promoter elements. *J Biol Chem* 266, 19095-19102.
- Lonze, B.E. und Ginty, D.D.** (2002). Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* 35, 605-623.
- Lu, B., Pang, P.T. und Woo, N.H.** (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* 6, 603-614.
- Lucassen, P.J., Meerlo, P., Naylor, A.S., van Dam, A.M., Dayer, A.G., Fuchs, E., Oomen, C.A. und Czeh, B.** (2010). Regulation of adult neurogenesis by stress, sleep disruption, exercise and inflammation: Implications for depression and antidepressant action. *Eur Neuropsychopharmacol* 20, 1-17.
- Lupien, S.J., de Leon, M., de Santi, S., Convit, A., Tarshish, C., Nair, N.P., Thakur, M., McEwen, B.S., Hauger, R.L. und Meaney, M.J.** (1998). Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. *Nat Neurosci* 1, 69-73.
- Malenka, R.C. und Bear, M.F.** (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5-21.
- Manns, J.R. und Eichenbaum, H.** (2006). Evolution of declarative memory. *Hippocampus* 16, 795-808.
- Marashi, V., Barnekow, A., Ossendorf, E. und Sachser, N.** (2003). Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Horm Behav* 43, 281-292.
- Martin-Zanca, D., Hughes, S.H. und Barbacid, M.** (1986). A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* 319, 743-748.
- Matthews, V.B., Astrom, M.B., Chan, M.H., Bruce, C.R., Krabbe, K.S., Prelovsek, O., Akerstrom, T., Yfanti, C., Broholm, C., Mortensen, O.H., et al.** (2009). Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia* 52, 1409-1418.
- Maviel, T., Durkin, T.P., Menzaghi, F. und Bontempi, B.** (2004). Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science* 305, 96-99.
- McEwen, B.S. und Sapolsky, R.M.** (1995). Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 5, 205-216.
- McQuaid, R.J., Audet, M.C., Jacobson-Pick, S. und Anisman, H.** (2013). The differential impact of social defeat on mice living in isolation or groups in an enriched environment: plasma corticosterone and monoamine variations. *Int J Neuropsychopharmacol* 16, 351-363.

- McTaggart, J.S., Lee, S., Iberl, M., Church, C., Cox, R.D. und Ashcroft, F.M.** (2011). FTO is expressed in neurones throughout the brain and its expression is unaltered by fasting. *PLoS One* 6, e27968.
- Meyer, K.D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C.E. und Jaffrey, S.R.** (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell* 149, 1635-1646.
- Middleton, G., Hamanoue, M., Enokido, Y., Wyatt, S., Pennica, D., Jaffray, E., Hay, R.T. und Davies, A.M.** (2000). Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol* 148, 325-332.
- Moncek, F., Duncko, R., Johansson, B.B. und Jezova, D.** (2004). Effect of environmental enrichment on stress related systems in rats. *J Neuroendocrinol* 16, 423-431.
- Moreno-Peral, P., Conejo-Ceron, S., Motrico, E., Rodriguez-Morejon, A., Fernandez, A., Garcia-Campayo, J., Roca, M., Serrano-Blanco, A., Rubio-Valera, M. und Bellon, J.A.** (2014). Risk factors for the onset of panic and generalised anxiety disorders in the general adult population: a systematic review of cohort studies. *J Affect Disord* 168, 337-348.
- Morris, R.** (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11, 47-60.
- Mowla, S.J., Farhadi, H.F., Pareek, S., Atwal, J.K., Morris, S.J., Seidah, N.G. und Murphy, R.A.** (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem* 276, 12660-12666.
- Mowla, S.J., Pareek, S., Farhadi, H.F., Petrecca, K., Fawcett, J.P., Seidah, N.G., Morris, S.J., Sossin, W.S. und Murphy, R.A.** (1999). Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J Neurosci* 19, 2069-2080.
- Munck, A., Guyre, P.M. und Holbrook, N.J.** (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 5, 25-44.
- Nagappan, G., Zaitsev, E., Senatorov, V.V., Jr., Yang, J., Hempstead, B.L. und Lu, B.** (2009). Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1267-1272.
- Nakagawara, A., Liu, X.G., Ikegaki, N., White, P.S., Yamashiro, D.J., Nycum, L.M., Biegel, J.A. und Brodeur, G.M.** (1995). Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics* 25, 538-546.
- Neeper, S.A., Gomez-Pinilla, F., Choi, J. und Cotman, C.** (1995). Exercise and brain neurotrophins. *Nature* 373, 109.
- Olszewski, P.K., Fredriksson, R., Olszewska, A.M., Stephansson, O., Alsio, J., Radomska, K.J., Levine, A.S. und Schioth, H.B.** (2009). Hypothalamic FTO is associated with the regulation of energy intake not feeding reward. *BMC Neurosci* 10, 129.
- Olton, D.S. und Samuelson, R.J.** (1976). Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 2, 97-116.
- OpenStax College** (2016). Anatomy & Physiology. OpenStax CNX. Feb 26, 2016 unter: <http://cnx.org/contents/14fb4ad7-39a1-4eee-ab6e-3ef2482e3e22@8.24>
- Ou, L.C. und Gean, P.W.** (2006). Regulation of amygdala-dependent learning by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol-3-kinase. *Neuropsychopharmacology* 31, 287-296.

- Owen, M.J., O'Donovan, M.C., Thapar, A. und Craddock, N. (2011). Neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Br J Psychiatry* 198, 173-175.
- Pang, P.T., Teng, H.K., Zaitsev, E., Woo, N.T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K.K., Yung, W.H., Hempstead, B.L. und Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 306, 487-491.
- Papaleo, F., Silverman, J.L., Aney, J., Tian, Q., Barkan, C.L., Chadman, K.K. und Crawley, J.N. (2011). Working memory deficits, increased anxiety-like traits, and seizure susceptibility in BDNF overexpressing mice. *Learn Mem* 18, 534-544.
- Peters, T., Ausmeier, K., Dildrop, R. und Rütther, U. (2002). The mouse Fused toes (Ft) mutation is the result of a 1.6-Mb deletion including the entire Iroquois B gene cluster. *Mamm Genome* 13, 186-188.
- Peters, T., Ausmeier, K. und Rütther, U. (1999). Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mamm Genome* 10, 983-986.
- Pham, T.M., Ickes, B., Albeck, D., Soderstrom, S., Granholm, A.C. und Mohammed, A.H. (1999). Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience* 94, 279-286.
- Phillips, C.M., Kesse-Guyot, E., McManus, R., Hercberg, S., Lairon, D., Planells, R. und Roche, H.M. (2012). High dietary saturated fat intake accentuates obesity risk associated with the fat mass and obesity-associated gene in adults. *J Nutr* 142, 824-831.
- Pittenger, C. und Duman, R.S. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 88-109.
- Poltyrev, T., Keshet, G.I., Kay, G. und Weinstock, M. (1996). Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. *Dev Psychobiol* 29, 453-462.
- Radley, J.J. und Sawchenko, P.E. (2011). A common substrate for prefrontal and hippocampal inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci* 31, 9683-9695.
- Rask-Andersen, M., Almen, M.S., Olausen, H.R., Olszewski, P.K., Eriksson, J., Chavan, R.A., Levine, A.S., Fredriksson, R. und Schiöth, H.B. (2011). Functional coupling analysis suggests link between the obesity gene FTO and the BDNF-NTRK2 signaling pathway. *BMC Neurosci* 12, 117.
- Reichardt, L.F. (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1545-1564.
- Reul, J.M. und de Kloet, E.R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117, 2505-2511.
- Reuter, C.P., Rosane De Moura Valim, A., Gaya, A.R., Borges, T.S., Klinger, E.I., Possuelo, L.G., Franke, S.I., Kmetzsch, L., Vainstein, M.H., Pra, D., et al. (2016). FTO polymorphism, cardiorespiratory fitness, and obesity in Brazilian youth. *Am J Hum Biol* 28, 381-386.
- Rossi, C., Angelucci, A., Costantin, L., Braschi, C., Mazzantini, M., Babbini, F., Fabbri, M.E., Tessarollo, L., Maffei, L., Berardi, N., et al. (2006). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 24, 1850-1856.
- Roy, M. und Sapolsky, R.M. (2003). The exacerbation of hippocampal excitotoxicity by glucocorticoids is not mediated by apoptosis. *Neuroendocrinology* 77, 24-31.
- Sahay, A., Scobie, K.N., Hill, A.S., O'Carroll, C.M., Kheirbek, M.A., Burghardt, N.S., Fenton, A.A., Dranovsky, A. und Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472, 466-470.
- Saldana-Alvarez, Y., Salas-Martinez, M.G., Garcia-Ortiz, H., Luckie-Duque, A., Garcia-Cardenas, G., Vicenteno-Ayala, H., Cordova, E.J., Esparza-Aguilar, M.,

- Contreras-Cubas, C., Carnevale, A., et al.** (2016). Gender-Dependent Association of FTO Polymorphisms with Body Mass Index in Mexicans. *PLoS One* 11, e0145984.
- Sales, A.J. und Joca, S.R.** (2016). Effects of DNA methylation inhibitors and conventional antidepressants on mice behaviour and brain DNA methylation levels. *Acta Neuropsychiatr* 28, 11-22.
- Sanchez-Pulido, L. und Andrade-Navarro, M.A.** (2007). The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem* 8, 23.
- Sapolsky, R.M.** (2003). Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem Res* 28, 1735-1742.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M. und Munck, A.U.** (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21, 55-89.
- Sapolsky, R.M., Uno, H., Rebert, C.S. und Finch, C.E.** (1990). Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci* 10, 2897-2902.
- Sato, H. und Seiki, M.** (1993). Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 8, 395-405.
- Schinder, A.F. und Poo, M.** (2000). The neurotrophin hypothesis for synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 23, 639-645.
- Schloesser, R.J., Lehmann, M., Martinowich, K., Manji, H.K. und Herkenham, M.** (2010). Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Mol Psychiatry* 15, 1152-1163.
- Schoenfeld, T.J. und Gould, E.** (2012). Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Exp Neurol* 233, 12-21.
- Scuteri, A., Sanna, S., Chen, W.M., Uda, M., Albai, G., Strait, J., Najjar, S., Nagaraja, R., Orru, M., Usala, G., et al.** (2007). Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 3, e115.
- Segal, R.A. und Greenberg, M.E.** (1996). Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 19, 463-489.
- Seidah, N.G., Benjannet, S., Pareek, S., Chretien, M. und Murphy, R.A.** (1996). Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. *FEBS Lett* 379, 247-250.
- Selye, H.** (1976). Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can Med Assoc J* 115, 53-56.
- Shaywitz, A.J. und Greenberg, M.E.** (1999). CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 68, 821-861.
- Shibata, H.** (1996). Direct projections from the entorhinal area to the anteroventral and laterodorsal thalamic nuclei in the rat. *Neurosci Res* 26, 83-87.
- Shieh, P.B., Hu, S.C., Bobb, K., Timmusk, T. und Ghosh, A.** (1998). Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 20, 727-740.
- Silva, A.J., Kogan, J.H., Frankland, P.W. und Kida, S.** (1998). CREB and memory. *Annu Rev Neurosci* 21, 127-148.
- Simon, M., Czeh, B. und Fuchs, E.** (2005). Age-dependent susceptibility of adult hippocampal cell proliferation to chronic psychosocial stress. *Brain Res* 1049, 244-248.

- Sousa, N., Lukoyanov, N.V., Madeira, M.D., Almeida, O.F. und Paula-Barbosa, M.M.** (2000). Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97, 253-266.
- Speakman, J.R., Rance, K.A. und Johnstone, A.M.** (2008). Polymorphisms of the FTO gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity (Silver Spring)* 16, 1961-1965.
- Spychala, A.** (2013). Analyse von Verhaltensstörungen in Fto-defizienten Mäusen. Düsseldorf: M.-N. Fakultät, Heinrich-Heine-Universität
- Stefanski, V. und Ben-Eliyahu, S.** (1996). Social confrontation and tumor metastasis in rats: defeat and beta-adrenergic mechanisms. *Physiol Behav* 60, 277-282.
- Sterner, E.Y. und Kalynchuk, L.E.** (2010). Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34, 777-790.
- Sterrenburg, L., Gaszner, B., Boerriqter, J., Santbergen, L., Bramini, M., Elliott, E., Chen, A., Peeters, B.W., Roubos, E.W. und Kozicz, T.** (2011). Chronic stress induces sex-specific alterations in methylation and expression of corticotropin-releasing factor gene in the rat. *PLoS One* 6, e28128.
- Stockmeier, C.A., Mahajan, G.J., Konick, L.C., Overholser, J.C., Jurjus, G.J., Meltzer, H.Y., Uylings, H.B., Friedman, L. und Rajkowska, G.** (2004). Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry* 56, 640-650.
- Stranahan, A.M. und Mattson, M.P.** (2012). Recruiting adaptive cellular stress responses for successful brain ageing. *Nat Rev Neurosci* 13, 209-216.
- Stratigopoulos, G., Padilla, S.L., LeDuc, C.A., Watson, E., Hattersley, A.T., McCarthy, M.I., Zeltser, L.M., Chung, W.K. und Leibel, R.L.** (2008). Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294, R1185-1196.
- Sugimoto, T., Kuroda, H., Horii, Y., Moritake, H., Tanaka, T. und Hattori, S.** (2001). Signal transduction pathways through TRK-A and TRK-B receptors in human neuroblastoma cells. *Jpn J Cancer Res* 92, 152-160.
- Swanson, L.W. und Cowan, W.M.** (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* 172, 49-84.
- Szatmari, E., Kalita, K.B., Kharebava, G. und Hetman, M.** (2007). Role of kinase suppressor of Ras-1 in neuronal survival signaling by extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J Neurosci* 27, 11389-11400.
- Szklarczyk, A., Lapinska, J., Rylski, M., McKay, R.D. und Kaczmarek, L.** (2002). Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci* 22, 920-930.
- Takashima, A., Petersson, K.M., Rutters, F., Tendolkar, I., Jensen, O., Zwarts, M.J., McNaughton, B.L. und Fernandez, G.** (2006). Declarative memory consolidation in humans: a prospective functional magnetic resonance imaging study. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 756-761.
- Takehara, K., Kawahara, S. und Kirino, Y.** (2003). Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eyeblink conditioning. *J Neurosci* 23, 9897-9905.
- Takei, N., Inamura, N., Kawamura, M., Namba, H., Hara, K., Yonezawa, K. und Nawa, H.** (2004). Brain-derived neurotrophic factor induces mammalian target of

- rapamycin-dependent local activation of translation machinery and protein synthesis in neuronal dendrites. *J Neurosci* 24, 9760-9769.
- Tang, Y.P., Wang, H., Feng, R., Kyin, M. und Tsien, J.Z.** (2001). Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology* 41, 779-790.
- Tanofsky-Kraff, M., Han, J.C., Anandalingam, K., Shomaker, L.B., Columbo, K.M., Wolkoff, L.E., Kozlosky, M., Elliott, C., Ranzenhofer, L.M., Roza, C.A., et al.** (2009). The FTO gene rs9939609 obesity-risk allele and loss of control over eating. *Am J Clin Nutr* 90, 1483-1488.
- Teng, H.K., Teng, K.K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., Almeida, R.D., Kermani, P., Torkin, R., Chen, Z.Y., Lee, F.S., et al.** (2005). ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 25, 5455-5463.
- Terenghi, G.** (1999). Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat* 194 (Pt 1), 1-14.
- Terra, X., Auguet, T., Porrás, J.A., Quintero, Y., Aguilar, C., Luna, A.M., Hernandez, M., Sabench, F., del Castillo, D. und Richart, C.** (2010). Anti-inflammatory profile of FTO gene expression in adipose tissues from morbidly obese women. *Cell Physiol Biochem* 26, 1041-1050.
- Tonjes, A., Zeggini, E., Kovacs, P., Bottcher, Y., Schleinitz, D., Dietrich, K., Morris, A.P., Enigk, B., Rayner, N.W., Koriath, M., et al.** (2010). Association of FTO variants with BMI and fat mass in the self-contained population of Sorbs in Germany. *Eur J Hum Genet* 18, 104-110.
- Tonra, J.R., Ono, M., Liu, X., Garcia, K., Jackson, C., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J. und Wong, V.** (1999). Brain-derived neurotrophic factor improves blood glucose control and alleviates fasting hyperglycemia in C57BLKS-Lepr(db)/lepr(db) mice. *Diabetes* 48, 588-594.
- Torasdóttir, M., Metsis, M., Henriksson, B.G., Winblad, B. und Mohammed, A.H.** (1998). Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behav Brain Res* 93, 83-90.
- Travnickova-Bendova, Z., Cermakian, N., Reppert, S.M. und Sassone-Corsi, P.** (2002). Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7728-7733.
- Tsigos, C. und Chrousos, G.P.** (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53, 865-871.
- Tung, Y.C., Gulati, P., Liu, C.H., Rimmington, D., Dennis, R., Ma, M., Saudek, V., O'Rahilly, S., Coll, A.P. und Yeo, G.S.** (2015). FTO is necessary for the induction of leptin resistance by high-fat feeding. *Mol Metab* 4, 287-298.
- Van de Kar, L.D. und Blair, M.L.** (1999). Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 20, 1-48.
- van der Hoeven, F., Schimmang, T., Volkmann, A., Mattei, M.G., Kyewski, B. und Rütther, U.** (1994). Programmed cell death is affected in the novel mouse mutant Fused toes (Ft). *Development* 120, 2601-2607.
- Veterinär-Anatomisches Institut Leipzig** (2017). unter: http://anatomie.vetmed.uni-leipzig.de/external/hippocampus/hippocampus_schema_gross.jpg
- Virgin, C.E., Jr., Ha, T.P., Packan, D.R., Tombaugh, G.C., Yang, S.H., Horner, H.C. und Sapolsky, R.M.** (1991). Glucocorticoids inhibit glucose transport and glutamate uptake in hippocampal astrocytes: implications for glucocorticoid neurotoxicity. *J Neurochem* 57, 1422-1428.
- Wang, P., Yang, F.J., Du, H., Guan, Y.F., Xu, T.Y., Xu, X.W., Su, D.F. und Miao, C.Y.** (2011). Involvement of leptin receptor long isoform (LepRb)-STAT3 signaling

- pathway in brain fat mass- and obesity-associated (FTO) downregulation during energy restriction. *Mol Med* 17, 523-532.
- Wardle, J., Llewellyn, C., Sanderson, S. und Plomin, R.** (2009). The FTO gene and measured food intake in children. *Int J Obes (Lond)* 33, 42-45.
- Weinstock, M.** (2005). The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun* 19, 296-308.
- Widagdo, J., Zhao, Q.Y., Kempen, M.J., Tan, M.C., Ratnu, V.S., Wei, W., Leighton, L., Spadaro, P.A., Edson, J., Anggono, V., et al.** (2016). Experience-Dependent Accumulation of N6-Methyladenosine in the Prefrontal Cortex Is Associated with Memory Processes in Mice. *J Neurosci* 36, 6771-6777.
- Woo, N.H., Teng, H.K., Siao, C.J., Chiaruttini, C., Pang, P.T., Milner, T.A., Hempstead, B.L. und Lu, B.** (2005). Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci* 8, 1069-1077.
- Workman, J.L., Chan, M.Y. und Galea, L.A.** (2015). Prior high corticosterone exposure reduces activation of immature neurons in the ventral hippocampus in response to spatial and nonspatial memory. *Hippocampus* 25, 329-344.
- Wu, K., Xu, J.L., Suen, P.C., Levine, E., Huang, Y.Y., Mount, H.T., Lin, S.Y. und Black, I.B.** (1996). Functional trkB neurotrophin receptors are intrinsic components of the adult brain postsynaptic density. *Brain Res Mol Brain Res* 43, 286-290.
- Xing, J., Ginty, D.D. und Greenberg, M.E.** (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273, 959-963.
- Yamada, M., Numakawa, T., Koshimizu, H., Tanabe, K., Wada, K., Koizumi, S. und Hatanaka, H.** (2002). Distinct usages of phospholipase C gamma and Shc in intracellular signaling stimulated by neurotrophins. *Brain Res* 955, 183-190.
- Yamada, M., Tanabe, K., Wada, K., Shimoke, K., Ishikawa, Y., Ikeuchi, T., Koizumi, S. und Hatanaka, H.** (2001). Differences in survival-promoting effects and intracellular signaling properties of BDNF and IGF-1 in cultured cerebral cortical neurons. *J Neurochem* 78, 940-951.
- Yamashita, T., Tucker, K.L. und Barde, Y.A.** (1999). Neurotrophin binding to the p75 receptor modulates Rho activity and axonal outgrowth. *Neuron* 24, 585-593.
- Yin, Y.X., Sun, Z.P., Huang, S.H., Zhao, L., Geng, Z. und Chen, Z.Y.** (2010). RanBPM contributes to TrkB signaling and regulates brain-derived neurotrophic factor-induced neuronal morphogenesis and survival. *J Neurochem* 114, 110-121.
- Yoon, S.O., Casaccia-Bonofil, P., Carter, B. und Chao, M.V.** (1998). Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* 18, 3273-3281.
- Zabena, C., Gonzalez-Sanchez, J.L., Martinez-Larrad, M.T., Torres-Garcia, A., Alvarez-Fernandez-Represa, J., Corbaton-Anchuelo, A., Perez-Barba, M. und Serrano-Rios, M.** (2009). The FTO obesity gene. Genotyping and gene expression analysis in morbidly obese patients. *Obes Surg* 19, 87-95.
- Zen, M., Canova, M., Campana, C., Bettio, S., Nalotto, L., Rampudda, M., Ramonda, R., Iaccarino, L. und Doria, A.** (2011). The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmun Rev* 10, 305-310.
- Zhang, S., Guo, D., Luo, W., Zhang, Q., Zhang, Y., Li, C., Lu, Y., Cui, Z. und Qiu, X.** (2010). TrkB is highly expressed in NSCLC and mediates BDNF-induced the activation of Pyk2 signaling and the invasion of A549 cells. *BMC Cancer* 10, 43.
- Zhao, C.T., Li, K., Li, J.T., Zheng, W., Liang, X.J., Geng, A.Q., Li, N. und Yuan, X.B.** (2009). PKCdelta regulates cortical radial migration by stabilizing the Cdk5 activator p35. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 21353-21358.

Zimmermann, E., Kring, S.I., Berentzen, T.L., Holst, C., Pers, T.H., Hansen, T., Pedersen, O., Sorensen, T.I. und Jess, T. (2009). Fatness-associated FTO gene variant increases mortality independent of fatness--in cohorts of Danish men. *PLoS One* 4, e4428.

8. Anhang

8.1. Initiale Studien

8.1.1. Kortikosteron-Messungen

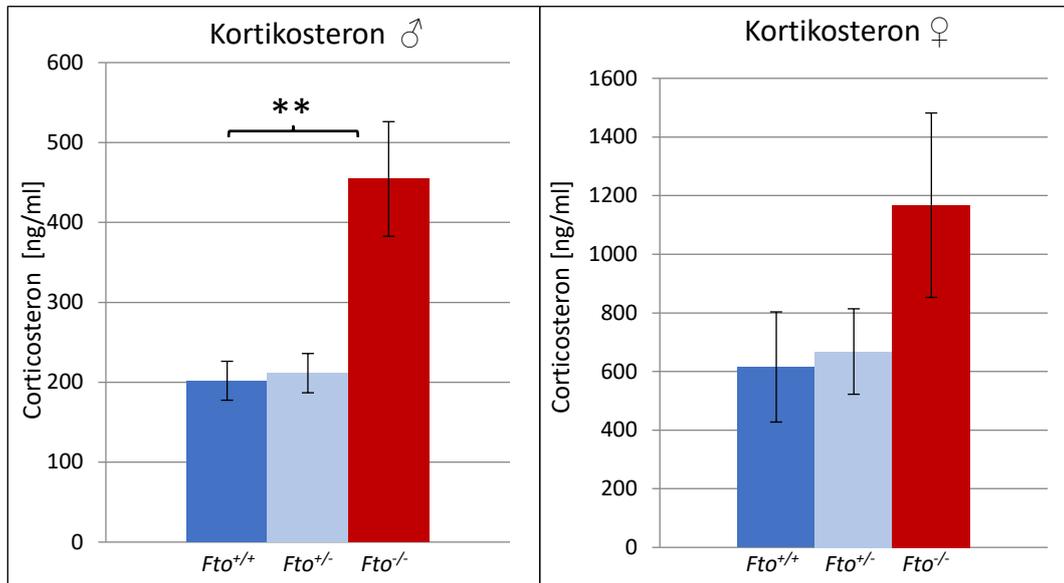


Abbildung 8.1: Kortikosteron-Konzentration im Blutplasma von *Fto*^{+/+}-, *Fto*^{+/-}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen.

Mittels Enzym-gekoppeltem Immunadsorptionstest wurde die Kortikosteron-Konzentration im Blutplasma von *Fto*^{+/+}-, *Fto*^{+/-}- und *Fto*^{-/-}-Mäuse in ng/ml gemessen ($n(\text{♂}) = 16/5/19$; $n(\text{♀}) = 5/9/6$). Männliche *Fto*^{-/-}-Mäuse weisen eine signifikant erhöhte Kortikosteron-Konzentration im Blutplasma auf ($p\text{-Wert} = 0,0039$) (Spychala, 2013).

8.1.2. Elevated Plus Maze-Test

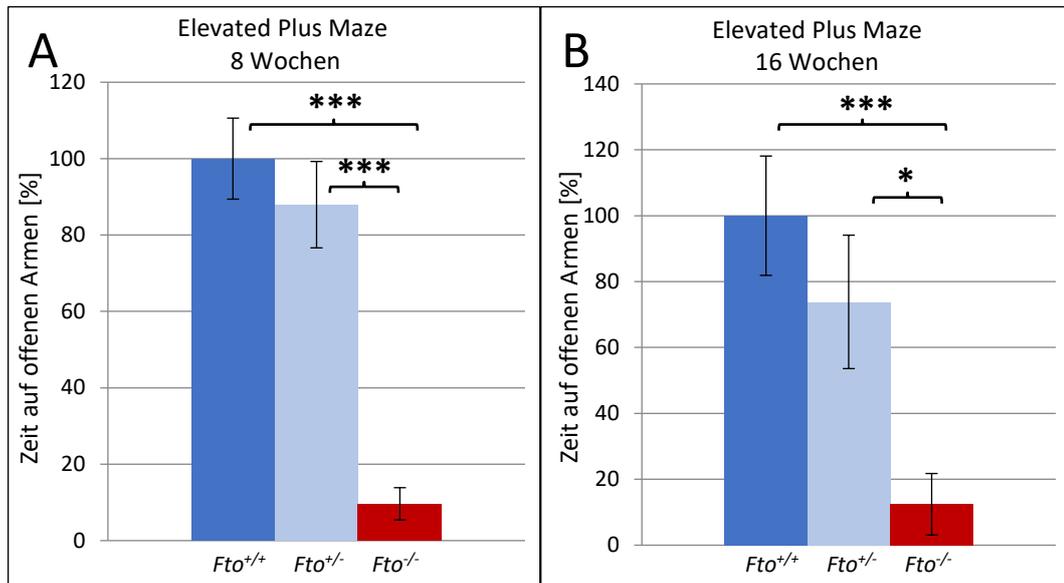


Abbildung 8.2: Ergebnisse des Elevated Plus Maze-Tests zur Quantifizierung des Angstverhaltens in $Fto^{-/-}$ -Mäusen.

Dargestellt sind die Ergebnisse des Elevated Plus Maze-Tests mit Mäusen im Alter von (A) 8 Wochen und (B) 16 Wochen. $Fto^{-/-}$ -Mäuse zeigen ein deutlich gesteigertes Angstverhalten indem sie weniger Zeit auf den offenen Armen des Elevated Plus Maze verbringen. n(A): 6, p-Wert(A): $Fto^{+/+} - Fto^{-/-} = 1,29 \cdot 10^{-5}$, $Fto^{+/-} - Fto^{-/-} = 0,0001$; n(B): 12/9, p-Wert(B): $Fto^{+/+} - Fto^{-/-} = 0,001$, $Fto^{+/-} - Fto^{-/-} = 0,0168$ (Spsychala, 2013).

8.1.3. Cage Emergence-Test

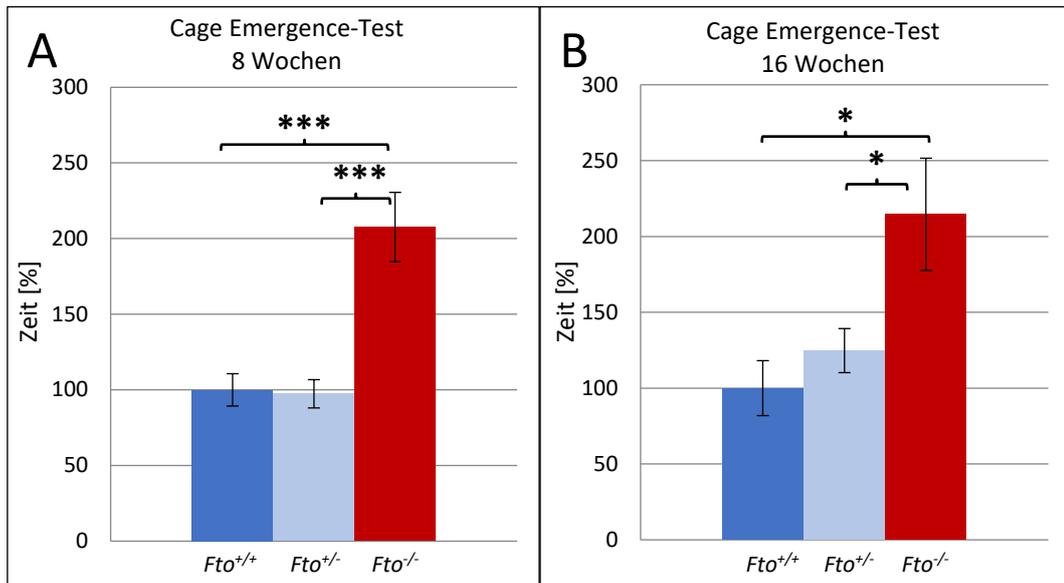


Abbildung 8.3: Ergebnisse des Cage Emergence-Tests zur Quantifizierung des Angstverhaltens in *Fto*^{-/-}-Mäusen.

Dargestellt sind die Ergebnisse des Cage Emergence-Tests mit Mäusen im Alter von (A) 8 Wochen und (B) 16 Wochen. *Fto*^{-/-}-Mäuse zeigen ein deutlich gesteigertes Angstverhalten indem sie eine längere Latenz aufweisen, bis sie den sicheren Hauskäfig verlassen und die freie Fläche explorieren. n(A): 24/21/20, p-Wert(A): *Fto*^{+/+} - *Fto*^{-/-} = 0,002, *Fto*^{+/-} - *Fto*^{-/-} = 0,002; n(B): 11/12/18, p-Wert(B): *Fto*^{+/+} - *Fto*^{-/-} = 0,0104, *Fto*^{+/-} - *Fto*^{-/-} = 0,034 (Spsychala, 2013).

8.1.4. *Bdnf*-Expressionsanalysen im Hippocampus

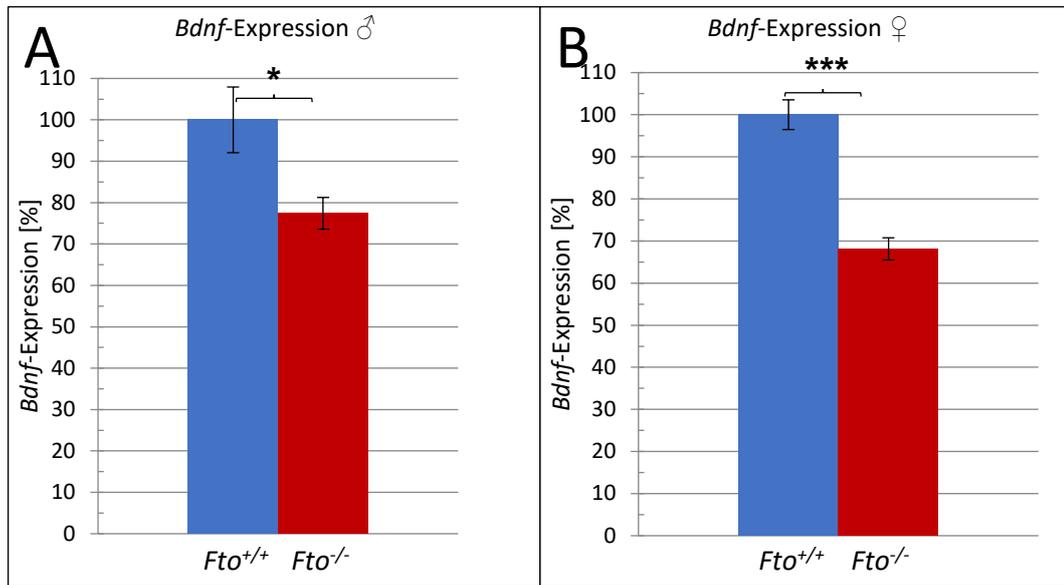


Abbildung 8.4: Expressionsanalysen für *Bdnf* mittels quantitativer Real-Time PCR im Hippocampus von *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen.

Dargestellt sind die Ergebnisse der quantitativen Real-Time PCR zur Bestimmung der Expressionsmengen von *Bdnf* im Hippocampus von (A) männlichen und (B) weiblichen *Fto*^{+/+}- und *Fto*^{-/-}-Mäusen. Die Expression von *Bdnf* im Hippocampus ist sowohl in männlichen, als auch in weiblichen *Fto*^{-/-}-Mäusen signifikant reduziert im Vergleich zu *Fto*^{+/+}-Mäusen. (n(A) = 8/11, p-Wert = 0,0125; n(B) = 3/5, p-Wert = 0,0003) (Spsychala, 2013).

8.2. Ergänzende Analysen

8.2.1. Gewichtsdaten während des Enriched Environment

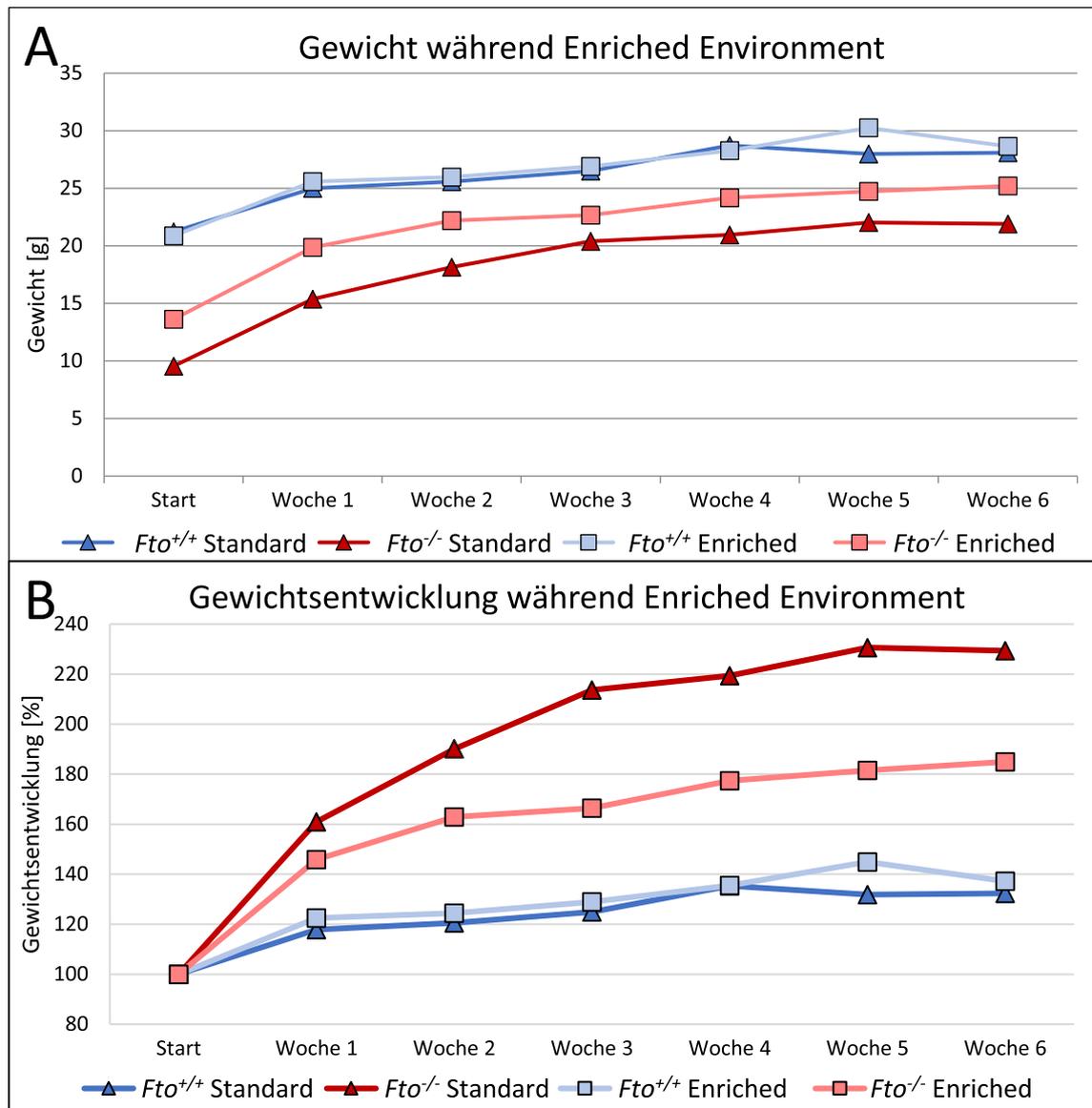


Abbildung 8.5: Gewichtsentwicklung unter Standardbedingungen und Enriched Environment von $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäusen.

(A) Dargestellt ist das absolute Gewicht von $Fto^{+/+}$ - und $Fto^{-/-}$ -Mäusen unter Standardbedingungen und während des Enriched Environment. (B) Dargestellt ist die prozentuale Zunahme an Gewicht im Zeitraum von 6 Wochen unter Standardbedingungen und während des Enriched Environment.

9. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüther für die Überlassung des Themas und der Möglichkeit selbstständig im Labor zu forschen.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Klein bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Ein ganz besonderer Dank gilt Christoph, Antonia und Mel. Danke für eure Freundschaft. Danke für die tolle Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft auch in schwierigen Phasen, sowie für die schönen Momente innerhalb und außerhalb des Instituts ☺.

Ferner möchte ich mich noch bei Steffi K. für die Antworten auf jegliche Fragen des Laboralltags und den netten Umgang miteinander bedanken.

Der größte Dank gilt Valerie und meiner Familie. Danke, dass ihr immer für mich da gewesen seid, für eure Geduld und eure Unterstützung während der gesamten Studien- und Promotionszeit.

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit: „Fto beeinflusst hippocampale Funktionen über die Bdnf-Prozessierung“ selbstständig und ohne Verwendung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Düsseldorf, den 27.06.2017

(André Spychala)