

**Untersuchung des Verhaltens von C57BL/6J-Mäusen in einem passiven
Vermeidetest mit anschließender Analyse der Genexpression
neuraler Zelladhäsionsmoleküle**

Von dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Stefanie Wagner

geboren am 5.9.1969 in Hannover

2003

Referent: Prof. Dr. Hansjoachim Hackbarth
Institut für Tierschutz und Verhalten
Tierärztliche Hochschule Hannover

Koreferentin: Prof. Dr. Melitta Schachner
Institut Biosynthese neuraler Strukturen
Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Hamburg-Eppendorf

Tag der Promotion: 24. Januar 2003

*„Das Gedächtnis bündelt die zahllosen Phänomene
Unserer Existenz zu einem einzigen Ganzen....
Gäbe es nicht die bindende und einigende Kraft des Ge-
dächtnisses, unser Bewußtsein würde in ebensoviele
Einzelteile zerfallen, wie wir Sekunden gelebt haben.“*

Ewald Hering

Für Jörg

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Kombination von verhaltensbiologischen und molekularbiologischen Arbeitstechniken neue Erkenntnisse über zelluläre Grundlagen von Lernen und Gedächtnis zu erlangen.

Es sollte daher der zeitliche Verlauf von lerninduzierten Veränderungen in der Expression ausgewählter Zelladhäsionsmoleküle (CHL1, L1, TN-R, NCAM, NCAM180) an C57BL/6J-Mäusen im Hippocampus untersucht werden.

Obwohl in der Literatur der Light Cycler der Fa. Roche als geeignetes Gerät zur Untersuchung von Genexpressionsunterschieden beschrieben wird, erwies er sich in der vorliegenden Arbeit als ungeeignet.

Für die Durchführung der Lerntests wurde ein passiver Vermeidetest (*Step Down Avoidance Test*) für Mäuse etabliert. Der *Step Down Avoidance Test* wird in zwei Versuchsdurchgängen durchgeführt. Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass die Tiere lernen sollen, eine Plattform, die sich auf einem Metallgitter befindet, nicht zu verlassen, um einen milden Fußschock zu vermeiden. Eine Erhöhung der Latenzzeit im zweiten Durchgang (*Retest*), im Vergleich mit dem ersten Durchgang (*Baseline*), wird in der Literatur als Lernverhalten definiert. In dieser Arbeit konnte jedoch anhand des Verhaltens gezeigt werden, dass allein eine Erhöhung der Latenzzeit nicht aussagt, ob ein Tier den Test gelernt hat.

So wurde herausgefunden, dass der Testzeitpunkt eine entscheidende Rolle spielt.

Einige Kontrolltiere, die keinen Fußschock erhalten hatten, zeigten trotzdem einen Anstieg in der Latenzzeit beim *Retest*. Diese Tiere wurden während ihrer Ruhephase getestet und zeigten während dieser Zeit kaum Explorationsverhalten und verließen daher auch die Plattform nicht. Tiere der eigentlichen Testgruppe hingegen, zeigten nur eine geringe Erhöhung der Latenzzeit. Es gibt Hinweise darauf, dass PSA-NCAM beim Lernen eine Rolle spielt und anscheinend auch einen Einfluss auf die circadiane Rhythmik hat, daher wird ein Zusammenhang zwischen einer tageszeitabhängigen PSA-NCAM-Expression und Lernen diskutiert.

Ein weiteres Phänomen tauchte bei einer weiteren Kontrollgruppe auf. Diese Gruppe erhielt zwar einen Fußschock, jedoch sollte sie nicht lernen, auf der Plattform zu bleiben. Daher wurde der Schock mit einer Verzögerung nach dem Verlassen der Plattform erteilt.

In der Zeit zwischen Verlassen der Plattform und Schockgabe zeigten die Mäuse im Allgemeinen Explorationsverhalten. Haben die Tiere während dieser Zeit auch die Plattform wieder betreten, lernten sie ebenfalls, die Plattform beim *Retest* nicht zu verlassen. Es bleibt zu diesem Zeitpunkt offen, ob dieses Lernverhalten auch hippocampusabhängig ist.

Es stellte sich allerdings heraus, dass hauptsächlich Tiere der eigentlichen Testgruppe mit einer langen Latenzzeit besonders viel die Verhaltensweise „Freezing“ zeigten. *Freezing*-Verhalten wird auch bei anderen Verhaltenstests analysiert, daher könnte dieses Verhalten zusätzlich zur Latenzzeit dazu dienen, Lernverhalten in diesem Test zu beurteilen.

Andere untersuchte Verhaltensweisen, wie z.B. *Risk Assessment*, sind zur Beurteilung des Verhaltens der Tiere in diesem Test nicht geeignet, da die einzelnen Gruppen keine Unterschiede zeigten.

Eine große Problematik ist in den fehlenden Standards für Verhaltenstests zu sehen, weil damit kaum eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in verschiedenen Laboren erreicht werden kann. Außerdem sollten Ursachen für die Variabilität des Verhaltens der Tiere in diesem Test gefunden werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen einen Beitrag leisten, die Reproduzierbarkeit zu erhöhen, die Variabilität zu senken und damit die notwendigen Tierzahlen zu reduzieren.

Summary

The aim of this study, utilizing behavioural biology and molecular biological approaches, was to obtain new information concerning learning and memory on a cellular level.

At various time points learning induced changes in the expression of cell adhesion molecules (CHL1, L1, TN-R, NCAM, NCAM180) in the hippocampus from C57BL/6J-mice was investigated.

Even though the literature describes that the Light Cycler from Roche is a suitable apparatus for the investigation, we found this approach to be unsuitable.

As a learning test a step down avoidance test for mice was established. The Step Down Avoidance Test was performed in two stages. The principle of this test is that the animals have to learn not to leave a safe platform positioned on a metal grid in order to avoid a mild foot shock. An increase of the latency in the second run in comparison to the first run means that according to the literature, learning has taken place.

In this study was shown that an increase of the latency in the retest is not only dependent on learning behaviour. Latency is also dependent on the time of day at which the test was performed.

Some of the control animals which received no foot shock were tested during their resting phase. These animals showed exploration behaviour and so they remained on the platform. Those animals which received a foot shock showed only a low increase of latency.

The literature provides hints that PSA-NCAM plays a role during learning and is also involved in circadian rhythm. The dependency of PSA-NCAM expression during the day and learning is discussed.

Another phenomenon could also be observed in another control group. In such a group where only a delayed foot shock was applied, animals should not learn to stay on the platform. In the time between leaving the platform and receiving a shock the mice, in general, showed exploration behaviour. If the animals re-entered the platform during this time, they are classified as having learnt the task. It is at this stage not possible to determine if this learning is also hippocampus dependent.

Predominantly, animals in the test group showed a significant correlation between a high latency and freezing behaviour. Therefore this behaviour, taken together with the increased latency indicates that this test could be used to judge learning behaviour.

Other behaviours were also investigated, for example risk assessment, which was found here not to be suitable because no differences between the test group and control groups were observed.

A significant problem with behavioural tests, in general, is that no standards exist. The results obtained in different laboratories are therefore not reproducible. Additionally the reasons for the variance in the behaviour were also investigated. The results of this study should provide test parameters and methodology for the establishment of the behavioural test that increase reproducibility, as well as decreasing variability, leading to a reduction in the number of animals required.

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure
AP5	Aminophosphopentansäure; NMDA-Rezeptor-Antagonist
bp	Basenpaare
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca	circa
Ca ²⁺ -Ion	Calcium-Ion
CALL	engl.: cell adhesion L1-Like; Zelladhäsion wie L1
CaMK II	Calmodulin-Kinase II
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAM's	engl.: cell adhesion molecules, Zelladhäsionsmoleküle
cDNA	engl.: complementary DNA; komplementäre DNA
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CNQX	Cianonitroquinoxalindion; AMPA-Rezeptor-Antagonist
CRASH	Corpus callosum Hypoplasie, R etardierung, A phasie, s pastische P araplegie, H ydrocephalus
CRE	cAMP-Reaktionselement
CREB-1	cAMP-Reaktionselement-bindendes Protein 1
CREB-2	cAMP-Reaktionselement-bindendes Protein 2
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosinphosphat
DEPC-Wasser	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosinphosphat
d.h.	das heißt
dTTP	Desoxythymidinphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EGF	engl.: epidermal growth factor; epidermaler Wachstumsfaktor
Endo-N	Endoneuraminidase N
EPSP	erregendes postsynaptisches Potential
Fa	Firma
FN-III	Fibronectin-III
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HRPT	Hypoxantin-Phosphoribosyltransferase
IEG	engl.: immediate early genes; unmittelbar frühe Gene
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilo-Dalton
KN62	spezifischer Inhibitor von Calmodulin-Kinase II
LTP	engl.: long term potentiation; Langzeitpotenzierung
LTD	engl.: long term depression; Langzeitunterdrückung

mA	Milli-Ampere
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
Mg ²⁺ - Ion	Magnesium-Ion
min	Minute(n)
ml	milliliter
mm	millimeter
µl	mikroliter
mRNA	engl.: Messenger -RNA; Boten-RNA
N	Anzahl der Tiere
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NCAM	Neuronales Zelladhäsionsmolekül
N. facialis	Nervus facialis
ng	nanogramm
N. hypoglossus	Nervus hypoglossus
NILE	engl.: nerve growth factor-inducible large external glycoprotein; Nervenwachstumsfaktor induzierendes großes externes Glykoprotein
NMDA	N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor
n.s.	nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	engl.: phosphate buffered saline; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl.: polymerase chain reaction; Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration einer Lösung
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
pMol	pikoMol
PSA	Polysialinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
U	engl.: Units; Einheiten
SDA	engl.: Step Down Avoidance-Test; Vermeiden, Herunterzutreten
sec	Sekunde(n)
TN	Tenascin
V	Volt
VASE	engl.: variable alternatively spliced exon; alternativ spleißendes Exon
z.B	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	1
1.	Die Hippocampusformation.....	2
2.	Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis	4
1.2.1	Langzeitpotenzierung und NMDA-Rezeptor.....	5
1.2.1	Sekundäre Botenstoffe/Proteinkinase A	7
1.2.3	Unmittelbar frühe Gene	8
3.	Zelladhäsionsmoleküle	9
1.3.1	NCAM.....	10
1.3.2	L1	13
1.3.3	Tenascin-R	15
4.	Der Step-Down-Avoidance-Test (SDA) und Lernen und Gedächtnis	18
1.4.1	NMDA-Rezeptoren und SDA	19
1.4.2	Calmodulin-Kinase II und SDA	21
1.4.3	cAMP/PKA/pCREB und SDA.....	21
1.4.4	Zelladhäsionsmoleküle und SDA.....	22
5.	Real-Time-PCR.....	23
1.5.1	TaqMan-Sonden.....	24
1.5.2	GAPDH	25
II.	Zielsetzung der Arbeit.....	27
1.	Verhaltenstest.....	27
2.	Molekularbiologische Tests	28
III.	Tiere, Materialien und Methoden.....	29
1.	Tiere	29
3.1.1	Inzuchtstamm C57BL/6J	29
3.1.2	Haltung.....	29
2.	Verhaltenstest.....	30
3.2.1	Step-Down-Avoidance (SDA)	30
3.2.2	Kontrollgruppen.....	32
3.2.3	Verhaltensanalyse im SDA	32
3.2.4	Statistische Auswertung.....	38
3.	Gehirnpräparation	39
4.	RNA-Extraktion.....	39
3.4.1	Aufreinigung der RNA	40
3.4.2	Extraktion von RNA aus Gesamthirn	40
5.	Reverse Transkription.....	41
3.5.1	cDNA von naiven Tieren und Gesamthirn-cDNA.....	41
6.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	42
3.6.1	Echt-Zeit-PCR (Real-Time PCR)	42
7.	Der Light Cycler	43
3.7.1	Sonden.....	44
3.7.2	Überprüfen des relativen DNA-Gehaltes in den Proben.....	44
3.7.3	Vorversuche und Auswahl der Proben	44
3.7.4	Auswertung der Light Cycler Daten	45

IV.	Ergebnisse.....	47
1.	Latenzzeiten der Gruppen im Retest nach allen getesteten Zeitpunkten.....	47
	4.1.1 Überblick über alle Latenzzeiten im Retest	47
	4.1.2 Vergleich der Latenzzeit von Baseline und Retest.....	48
	bei allen Gruppen	
	4.1.3 Vergleich der Latenzzeiten von Gruppe 1 und Gruppe 2.....	56
	4.1.4 Vergleich der Latenzzeiten von Gruppe 12h a und 12h b.....	60
2.	Korrelationsanalysen nach Pearson.....	61
	4.2.1 Korrelationen ohne Differenzierung der Zeitpunkte	61
	4.2.2 Korrelationen nach Pearson mit Einzelbetrachtung der Zeitpunkte.....	63
3.	Light Cycler	66
V.	Diskussion.....	69
1.	Step Down Avoidance Test.....	68
	1.5.1 Fußschock	69
	1.5.2 Habituation.....	70
	5.1.3 Plattform.....	70
	5.1.4 C57BL/6J-Mäuse	71
	5.1.5 Erhöhung der Latenzzeiten bei den Kontrollgruppen.....	72
	5.1.6 Einfluss der circadianen Rhythmik auf die Latenzzeiten.....	73
	5.1.7 Verhaltensweisen der Tiere im Step Down Avoidance	76
2.	Light Cycler Ergebnisse.....	78
VI.	Ausblick.....	81
VII.	Literaturverzeichnis.....	82
VIII.	Anhang	98
1.	Futterzusammensetzung	98
2.	Schadstoffanalyse der Einstreu.....	99
3.	RNA-Aufreinigung und RNA-Gel.....	102
4.	PCR-Programm	103
5.	PCR-Programm Light Cycler; PCR-Mix	103
6.	Sequenzen und Primer	104
7.	Protokoll für die Reverse Transkription	106
8.	DEPC-Wasser; DNase-Inkubationspuffer	106
9.	Varianzanalyse (ANOVA)	107
10.	Publikation Tang et al., 2001	113

I. Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Genexpression von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen nach erfolgtem Lernen. Lernen führt zu Veränderungen lokaler neuronaler Verschaltungen im Gehirn. Gedächtnis ist das Bewahren dieser Veränderungen über die Zeit sowie ihr Wirksamwerden zu einem späteren Zeitpunkt. Da Lernen das Verhalten ein Leben lang verändern kann, muss das Gedächtnis auf stabilen und lang andauernden Änderungen im Nervensystem beruhen. Die Bildung des Gedächtnisses ist ein dynamischer Prozess der Selbstorganisation, in dessen Verlauf die Information in unterschiedlicher Weise und unter Beteiligung verschiedener neuronaler Strukturen gespeichert wird und sich auch verändert. Das Gedächtnis durchläuft dabei zeitliche Phasen, und diese können im Nervensystem an unterschiedlichen Orten lokalisiert sein.

Wir können neue Erkenntnisse über die Welt erwerben, weil die Erfahrungen, die wir gemacht haben, unser Gehirn verändern. Später können wir aufgrund dieses gespeicherten Wissens handeln, uns anders als bisher verhalten und in neuen Bahnen denken. Sich-Erinnern ist Ausdruck dessen, dass, was wir gelernt haben, die Zeit überdauert. In diesem Sinne sind Lernen und Gedächtnis unlösbar miteinander verbunden. Ein Verlust des Gedächtnisses führt zum Verlust des Selbst, zum Verlust der eigenen Lebensgeschichte und zum Verlust dauerhafter Beziehungen zu den Mitmenschen. Lern- und Gedächtnisstörungen treten bei Kindern wie bei Erwachsenen auf. Geistige Behinderung, Trisomie 21, Dyslexie, das normale altersbedingte Nachlassen des Gedächtnisses und die Zerstörungen der Gehirnstruktur durch die Alzheimer- und die Huntington-Krankheit sind nur die bekannteren Beispiele aus einer Vielzahl von (krankhaften) Veränderungen des Gehirns.

Eine grundsätzliche Unterscheidung, die in zahlreichen Studien zum Thema „Lernen“ getroffen wird, ist die zwischen „deklarativem“ (explizitem) Gedächtnis und „nichtdeklarativem“ (implizitem) Formen des Gedächtnisses. Während man unter deklarativem Gedächtnis die Fähigkeit zur bewussten Erinnerung von Tatsachen und Ereignissen versteht, kommt nichtdeklaratives Gedächtnis in erlernten manuellen Fähigkeiten, Gewohnheiten und einfachen Formen der Konditionierung zum Ausdruck (Abbildung 1). Es ist allgemein anerkannt, dass für das deklarative Lernen die Hippocampusformation eine wesentliche Rolle spielt.

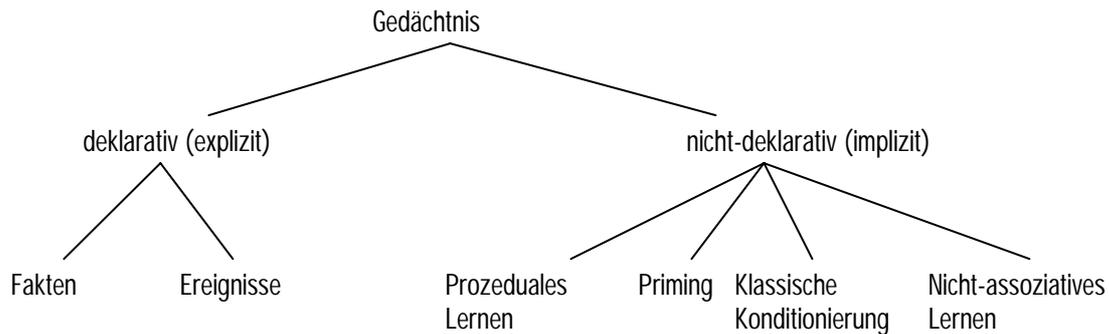


Abbildung 1 Unterteilung implizites und explizites Gedächtnis

Verändert nach : Milner et al., 1998

1.1 Die Hippocampusformation

Die beidseitige operative Entfernung des Hippocampus als letztes Mittel gegen schwerste epileptische Anfälle führt zur irreversiblen und vollkommenen anterograden Amnesie, d.h. zur Unfähigkeit, neue Informationen dauerhaft zugriffsbereit zu speichern. Dermaßen behandelte Patienten können zwar durch ständiges Wiederholen bestimmte Informationen im Kurzzeitgedächtnis bewahren, vergessen sie aber augenblicklich, wenn sie abgelenkt werden (Scoville und Milner, 1957 (zitiert in Scoville, 2000); Zola-Morgan et al., 1986). Diese Läsionen haben aber keine Auswirkungen auf Wahrnehmungen und intellektuelle Fähigkeiten (Milner et al., 1968; Milner et al., 1970; Rempel-Clower et al., 1996).

Bei Affen und Ratten führte die bilaterale Entfernung des Hippocampus allerdings nicht zu einem derart schwerwiegenden Verlust der Gedächtnisfähigkeit, sondern lediglich zu selektiven Ausfällen (Bunsey und Eichenbaum, 1996; Wood et al., 1999).

Die Hippocampusformation ist aber offenbar nur für einen begrenzten Zeitraum essentiell. In der Zeit nach dem Lernen wird das Gedächtnis reorganisiert und stabilisiert. Während dieser Periode der Reorganisation nimmt die Bedeutung der Hippocampi allmählich ab, und ein permanenteres Gedächtnis wird - vermutlich in anderen umliegenden corticalen Bereichen - installiert, das von der Hippocampusformation unabhängig ist.

Der umliegende Cortex besteht aus drei abgrenzbaren Arealen: dem entorhinalen, dem perirhinalen und dem parahippocampalen Cortex. Die wichtigsten Projektionen in den Hippocampus entspringen im entorhinalen Cortex. Alle drei corticalen Bereiche bilden mit der Hippocampusformation den medialen Temporallappen. Sie erhalten Informationen aus ausgedehnten Cortexbereichen und senden umgekehrt auch Informationen dorthin zurück. Der mediale Temporallappen ist also für die Langzeitspeicherung des deklarativen Gedächtnisses von essentieller Bedeutung. Er wird beim Lernen der Information benötigt und

bleibt über eine längere Phase der Reorganisation und Stabilisierung hinweg, in der die Langzeitrepräsentationen im Cortex etabliert werden, entscheidend wichtig. Daher haben diese Areale Zugang zu einem Großteil der Informationsverarbeitung, die in anderen Bereichen des Cortex stattfindet (Abbildung 2).

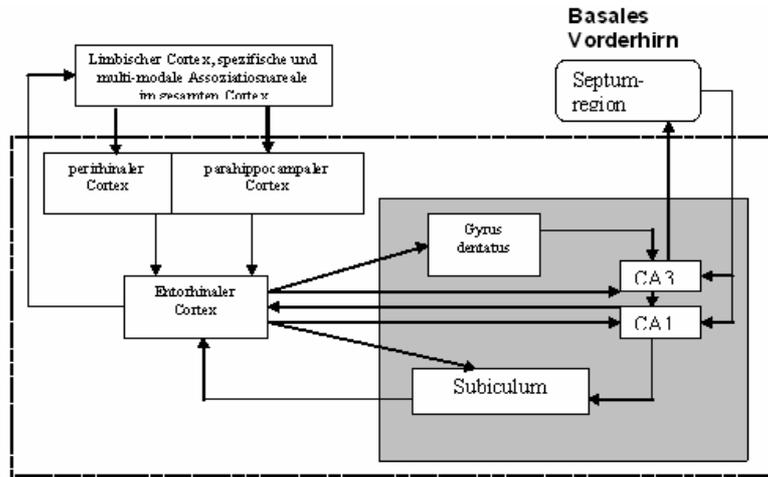
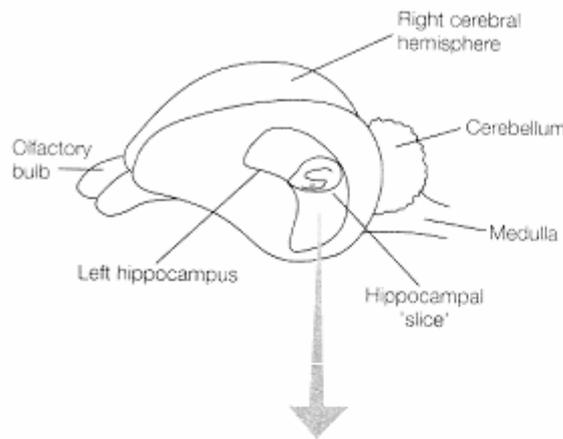
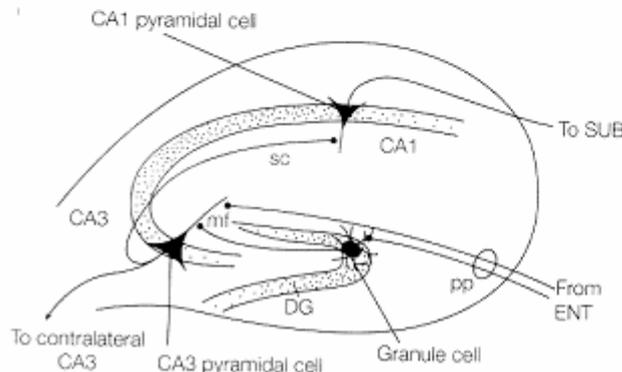


Abbildung 2 Hippocampusformation (grau) und medialer Temporallappen (gestrichelter Kasten)
Verändert nach: Milner et al., 1998



a) Lage des linken Hippocampus im Rattegehirn



b) Struktur eines Hippocampuschnittes auf Sagittalebene

Abkürzungen:
 DG, Gyrus Dentatus
 ENT, entorhinaler Cortex
 mf, Moosfaser
 pp, perforant pathway
 sc, Schaffer Kollaterale
 SUB subiculum

Abbildung 3 Anatomische Lage und Unterteilung des Hippocampus
 Aus: „Molecular Neuroscience“ BIOS Scientific Publishers Ltd.,1998

1.2 Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis

Bis heute sind die umfassendsten Gedächtnisstudien an Tieren mit relativ einfachen Nervensystemen durchgeführt worden. Diesen Tieren fehlt die Fähigkeit zur deklarativen Erinnerung. Daher ist sehr viel weniger über das deklarative Gedächtnis bekannt als über das nichtdeklarative.

Die molekulare Erforschung der Mechanismen der Gedächtnisspeicherung hat jedoch unerwartete Ähnlichkeiten zwischen diesen beiden Formen des Gedächtnisses aufgedeckt. Sowohl das deklarative als auch das nichtdeklarative Gedächtnis können entweder einige Minuten lang anhalten (Kurzzeitgedächtnis) oder tagelang oder länger andauern (Langzeitgedächtnis). Kurzzeit- und Langzeitgedächtnis hängen von einer Veränderung der synaptischen Stärke ab. Die deklarative Variante erfordert ebenso wie die nichtdeklarative Variante nur eine vorübergehende Veränderung der synaptischen Stärke bei der Kurzzeitspeicherung (Übersicht: Polster, 1993).

Auch hinsichtlich der molekularen Mechanismen gibt es Ähnlichkeiten zwischen deklarativem und nichtdeklarativem Gedächtnis. Bei beiden Gedächtnisformen wird die Kurzzeitspeicherung durch die Modifikation bereits existierender Proteine und die Verstärkung bereits existierender neuronaler Verbindungen erreicht. Hierfür ist die Aktivität von Proteinkinasen erforderlich. Während das Kurzzeitgedächtnis keine Neusynthese von Proteinen erfordert, verlangt das Langzeitgedächtnis die Aktivierung von Genen, eine Proteinbiosynthese und das Wachstum synaptischer Verbindungen (Davis und Squire, 1984; Castellucci et al., 1989; Tully et al., 1994).

Die Bedeutung der Synthese von Proteinen für die Änderung der synaptischen Erregungsübertragung wird dadurch unterstrichen, dass die Injektion von Transkriptionshemmern (Actinomycin) (Uphouse et al., 1974) oder Translationsinhibitoren, wie z.B. Puromycin (Church et al., 1995), Cycloheximid (Quinton und Kramarcy, 1977) und Anisomycin (Scharf et al., 2002), die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten im Langzeitspeicher stark beeinträchtigen oder ganz unterdrücken. Das Kurzzeitgedächtnis ist durch die Verabreichung dieser Stoffe nicht gestört. Bei all diesen Substanzen zeigte sich nur dann eine Wirkung, wenn die Injektion vor, während oder 30 bis 60min nach dem Lernvorgang erfolgte. Daraus schlossen die Autoren, dass die Konsolidierungsphase, d.h. der Übergang von der Kurz- zur Langzeitspeicherung, nach dieser Zeit abgeschlossen ist.

1.2.1 *Long-Term-Potentialiation* (Langzeitpotenzierung, LTP) und N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor, NMDAR)

Die Theorie, dass durch aktivitätsabhängige Veränderungen in den synaptischen Verbindungen das Speichern von Gelerntem möglich ist, wurde 1949 von Hebb entwickelt. Hebb postulierte, dass die Übertragungseffizienz von Synapsen, die zwei Zellen miteinander verbinden, zunimmt, wenn beide Zellen gleichzeitig aktiviert werden (zitiert in Morris, 1999). Varianten dieses Hebb'schen Mechanismus, der zuerst im Säugerhirn entdeckt wurde, spielen auch bei der Speicherung deklarativer Gedächtnisinhalte eine wichtige Rolle.

Ramón y Cajal formulierte die Hypothese von der synaptischen Plastizität (1894; zitiert in Segal, 2002). Sie besagt, dass die Stärke synaptischer Verbindungen plastisch und modifizierbar ist. Das bedeutet, dass z.B. durch neuronale Aktivität die synaptische Stärke modifiziert werden kann. Er postulierte auch, dass Lernvorgänge zu länger andauernden Veränderungen in der Stärke der synaptischen Verbindungen führen, weil sie z.B. das Wachstum neuer synaptischer Verbindungen fördern. Das Fortbestehen dieser synaptischen Plastizität könnte der Mechanismus zum Speichern von Erinnerungen sein.

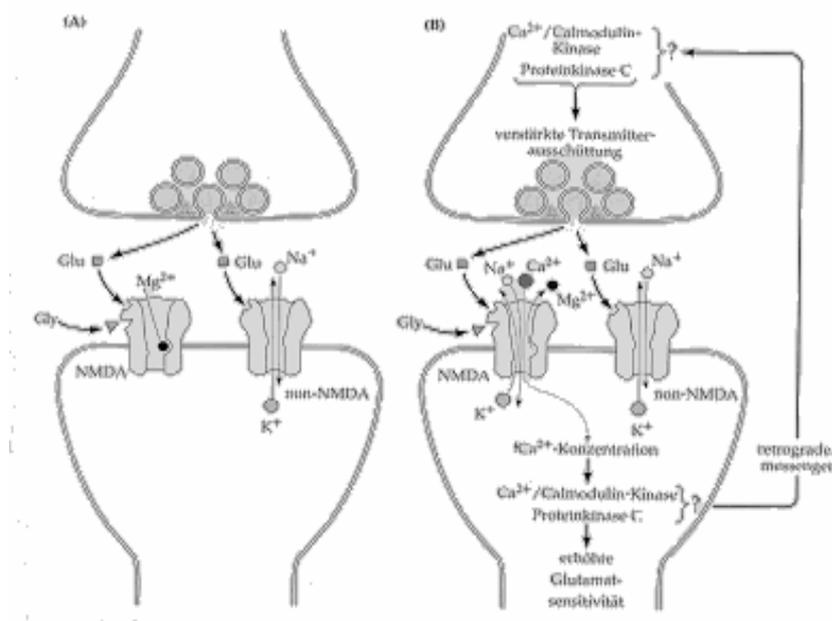
Ein bei Wirbeltieren, insbesondere im Hippocampus und im Cortex von Säugern intensiv studiertes Modell für zelluläre und molekulare Veränderungen, die Lernen und Gedächtnis zugrunde liegen, ist die Langzeitpotenzierung (*Long-term potentiation*, LTP). Orte der LTP sind im Wesentlichen die Dorn-Synapsen der Hippocampus-Pyramidenzellen (Toni et al., 1999). Es handelt sich hierbei um dendritische Synapsen. Sie haben die Aufgabe, die Informationen, die von der Präsynapse eintreffen, in den Dendriten und dann in den Zellkörper des Neurons weiterzuleiten (Jessell und Kandel, 1993). Auf dieser postsynaptischen Membran sind mindestens zwei Typen von ionotropen Rezeptoren lokalisiert, der NMDA-Rezeptor, der zusätzlich vom Transmitter Glutamat gesteuert wird und ein Nicht-NMDA-Rezeptor. Der NMDA-Rezeptor ist durch ein Mg^{2+} -Ion blockiert, und diese Blockade wird auch durch normale Erregungszustände nicht aufgehoben. Der Nicht-NMDA-Rezeptor kann hingegen vom Transmitter geöffnet werden, was zu den normalen postsynaptischen Erregungen führt. Eine spezifische hochfrequente (tetanische) Reizung führt zu einem zeitlichen Zusammentreffen von (normaler) Transmitterwirkung und starker postsynaptischer Depolarisierung innerhalb der Dornsynapsen. Die Koinzidenz dieser prä- und postsynaptischen Aktivität führt zur Beseitigung der NMDA-Rezeptor-Blockade durch das Mg^{2+} -Ion: der Kanal öffnet sich und Ca^{2+} -Ionen strömen in das postsynaptische Neuron ein (Abbildung 4). Dies wiederum zieht eine Steigerung (Potenzierung) des monosynaptischen erregenden postsynaptischen Potentials (EPSP) nach sich, das von den Nicht-NMDA-Rezeptoren produziert wurde. Der NMDA-Rezeptor fungiert also als

„Koinzidenz-Detektor“ prä- und postsynaptischer Aktivität und als Verstärker über die Regulation des Ca^{2+} -Ionen-Einstroms (Tang et al., 1999).

Die langanhaltende Erhöhung der synaptischen Effizienz bei der NMDAR-abhängigen LTP ist darauf zurückzuführen, dass einströmende Ca^{2+} -Ionen eine intrazelluläre Reaktionskaskade auslösen. Diese führt dann zu Veränderungen sowohl auf post- als auch auf präsynaptischer Seite der Synapse. Hierbei scheinen retrograde Botenstoffe, die ein Signal von der postsynaptischen zur präsynaptischen Zelle übermitteln, eine Rolle zu spielen (Jessell und Kandel, 1993).

Die Tetanus-induzierte LTP lässt sich in mehrere Phasen unterteilen. Eine Frühphase setzt direkt nach der tetanischen Stimulation ein und hält 1-3 Stunden an. Diese Phase wird von einer einzigen hochfrequenten (tetanischen) Reizsalve induziert und erfordert keine Proteinsynthese. Im Gegensatz dazu induzieren drei oder mehr hochfrequente Salven eine späte Phase, die mindestens acht Stunden anhält. Diese späte Phase erfordert anscheinend eine Genaktivierung: sie wird von Proteinsyntheseinhibitoren, von Inhibitoren der RNA-Synthese und von Inhibitoren der Proteinkinase A (PKA) blockiert. Umgekehrt kann diese Phase von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) aktiviert werden (Nayak et al., 1998).

Zurzeit ist noch nicht klar, ob LTP tatsächlich unbedingt notwendig ist, um zu lernen. Einerseits zeigen viele Arbeiten die Einbeziehung von LTP in Lernen und Gedächtnis (Izquierdo et al., 1993), aber andererseits wird auch in vielen Arbeiten gezeigt, dass Lernen und Gedächtnis durchaus ohne NMDAR-abhängiges LTP möglich ist (Hoh et al., 1999; Cain, 1997).



A) Wenn sich die Neuronen an ihrem Ruhepotential oder nahe daran befinden, fließt Strom durch die glutamataktivierten nonNMDA-Rezeptoren. Die glutamataktivierten NMDA-Rezeptoren führen jedoch nur wenig Strom, da die Kanäle durch Mg^{2+} blockiert sind.

B) Wenn die Zelle genügend stark depolarisiert wird - z.B. durch intensive Aktivierung von nonNMDA-Rezeptoren - treibt die Änderung des Membranpotentials das Mg^{2+} aus dem Kanal des NMDA-Rezeptors, sodass Strom hindurchfließen kann, wenn der Rezeptor von Glutamat aktiviert wird.

Abbildung 4 NMDA- und Nicht-NMDA-Rezeptor
 Aus : „Vom Neuron zum Gehirn“, Spektrum Akademischer Verlag, 2002

1.2.2 Sekundäre Botenstoffe (*second messenger*) /Proteinkinase A (PKA)

Im Jahre 1959 entdeckten Sutherland und Rall, dass synaptische Transmitter auf eine Klasse von Rezeptoren wirken können, die keine Ionenkanäle enthalten (metabotrope Rezeptoren). Wenn ein Transmitter an einen metabotropen Rezeptor bindet, aktiviert dieser ein Enzym in der Zelle, das die Konzentration eines so genannten *second messengers* verändert. Die Funktion des *second messengers* besteht darin, die Information, dass der Transmitter vom Rezeptor auf der Oberfläche gebunden wurde, ins Zellinnere weiterzuleiten.

Sutherland und Rall entdeckten 1957 den ersten *second messenger*: das zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP). cAMP wird mit Hilfe der Adenylatcyclase aus ATP synthetisiert. cAMP kann eine Vielzahl biochemischer Prozesse in einer Zelle beeinflussen, meist dadurch, dass die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird.

Die PKA ist aus vier Untereinheiten aufgebaut. Zwei dieser Untereinheiten, die den katalytischen Teil ausmachen, bilden die potentiell aktive Komponente des Enzyms. Die beiden anderen Untereinheiten sind regulatorische Untereinheiten, die sich an die katalytischen Untereinheiten anlagern und sie hemmen. Nur die regulatorischen Untereinheiten haben potentielle Bindungsstellen für cAMP.

Steigt die cAMP-Konzentration, bindet cAMP an die regulatorischen Untereinheiten, was bei diesen zu einer Konformationsänderung führt und die katalytischen Untereinheiten freisetzt. Die katalytischen Untereinheiten können dann als aktive Kinase wirken und ihre Zielproteine phosphorylieren. Die Entdeckung, dass die PKA in den Kern diffundiert, stellte einen neuen Aspekt der synaptischen Übertragung dar. Die PKA setzt im Kern eine genetische Kaskade in Gang, die dann einen stabilen, sich selbst erhaltenden Wachstumsprozess im Neuron auslöst (Cammarota et al., 2000) (Abbildung 5).

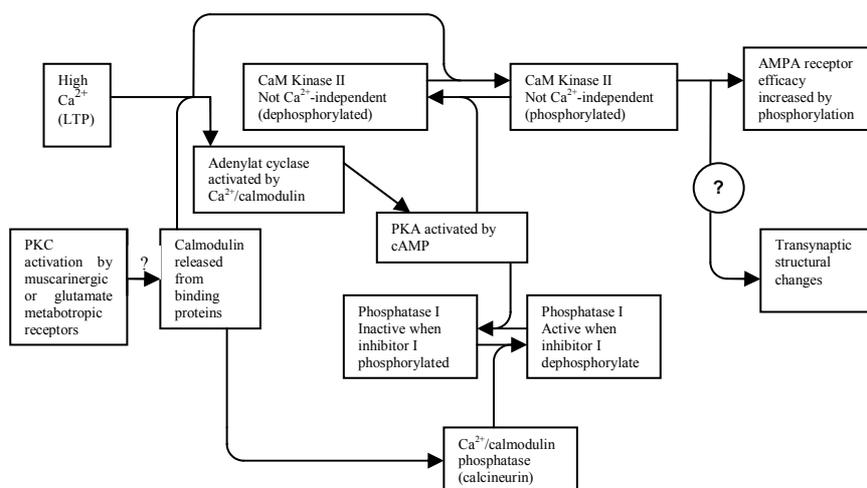


Abbildung 5 cAMP/PKA-Kaskade induziert nach LTP
verändert nach: Lisman, 1994

Während der Induktion von LTP wird die Konzentration von Ca²⁺ Ionen erhöht. Dadurch wird zum einen die Calmodulin-Kinase II (CaMKII) direkt aktiviert, zum andern findet aber auch eine Aktivierung der Adenylatcyclase statt, wenn gleichzeitig aktives Calcineurin vorliegt. Der daraus resultierende Anstieg von cAMP aktiviert ebenfalls die CaMKII. Sowohl die direkte Aktivierung als auch der „Umweg“ über die Phosphatase führen zu einer Erhöhung der synaptischen Stärke.

cAMP-Reaktionselement-bindendes-Protein (CREB)

Nachdem die PKA zum Kern gelangt ist, phosphoryliert sie eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, von denen vielleicht das wichtigste das Protein CREB-1 (cAMP-Reaktionselement-bindendes-Protein-1) ist. Die phosphorylierte Form dieses 43kDa großen Moleküls bindet an sein cAMP-Reaktionselement (CRE) auf der chromosomalen DNA und aktiviert die Gene, die für die Langzeiterinnerung notwendig sind.

Bisher lässt sich der molekulare Prozess der Langzeitspeicherung also wie folgt charakterisieren: die aktivierten Untereinheiten der PKA diffundieren zum Kern und phosphorylieren CREB-1-Proteine. Diese Proteine binden dann an die DNA und aktivieren die für die Langzeiterinnerung notwendigen Gene. Gewöhnlich wird aber die Fähigkeit, Langzeiterinnerungen auszubilden, von inhibitorischen Prozessen eingeschränkt. Diese Prozesse entscheiden darüber, wie schwer oder leicht Kurzzeitinhalte in Langzeitinhalte konvertiert werden.

Ein inhibierender Transkriptionsregulator (Repressor) wurde von Bartsch et al. (1995) entdeckt und als CREB-2 bezeichnet. CREB-2 hemmt vermutlich CREB-1 und blockiert die Langzeitverstärkung, indem er sowohl an die CRE-Sequenz auf der DNA als auch an das CREB-1 bindet. Es muss daher nicht nur CREB-1 aktiviert werden, sondern auch CREB-2 ausgeschaltet werden.

CREB-2 wird anders als CREB-1 reguliert. Im Gegensatz zu CREB-1 wird CREB-2 nicht direkt von der PKA angeschaltet, sondern offenbar von einer anderen Proteinkinase kontrolliert, die als mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) bezeichnet wird.

Der Schalter zum Langzeitgedächtnis wird durch das Beseitigen des Repressors (CREB-2) und Aktivierung des Aktivators CREB-1 nur teilweise umgelegt. Um ihn vollständig zu betätigen, müssen die Gene, die von CREB-1 aktiviert werden, ihre Proteinprodukte liefern. Dieser Schritt, die Synthese der Proteine, die von den CREB-1-aktivierten Genen codiert werden, ist es vermutlich, der die sensible Phase bei der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses darstellt. Bevor dieser Schritt abgeschlossen ist, lässt sich das Gedächtnis durch Proteinsynthesehemmer blockieren (Church et al., 1995).

1.2.3 Unmittelbar frühe Gene (*immediate early genes*, IEG)

Die hohe Geschwindigkeit der Proteinneusynthese bei Lernvorgängen sprach nach Goelets et al. (1986) Meinung dafür, dass die Proteine innerhalb kurzer Zeit gebraucht werden. Deshalb stellten sie die These auf, die Konsolidierungsphase des Gedächtnisses sei eine Periode, in der CREB-1 eine spezielle Klasse von Genen, die *immediate early genes*, aktiviert. Diese Gene werden schnell, aber nur vorübergehend aktiviert. Die von IEG's codierten Proteine können in

zwei unterschiedliche Klassen eingeteilt werden: erstens in regulatorische Transkriptionsfaktoren, und zweitens in Effektorproteine, die direkt spezifische Funktionen der Zelle modifizieren (Guzowski et al., 2001).

Die nach CREB-Aktivierung synthetisierten Transkriptionsfaktoren initiieren die Transkription und/oder Repression anderer Gene. Die Gene, die durch die Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, codieren neue (oder zusätzliche) Proteine wie Transmitterrezeptoren, Ionenkanäle, Cytoskelett-Bestandteile und Komponenten der Neurotransmitter-Synthese und Regeneration. Transkriptionsfaktoren spielen auch eine wichtige Rolle bei der normalen Entwicklung und Funktion des Nervensystems. Krox-20 ist beispielsweise an der Myelinisierung der peripheren Nervenfasern beteiligt (Topilko et al., 1994).

Verschiedene Studien (Dragunow et al., 1989; Richardson et al., 1992; Schreiber et al., 1991) zeigen, dass die IEG's nicht bei der Induktion von LTP mitwirken. Es wird jedoch vermutet, dass die Dauer und Stabilität der LTP durch IEG's beeinflusst wird (Abraham et al., 1993).

1.3 Zelladhäsionsmoleküle

Zellmigration, Wachstum von Neuriten, und Adhäsion sind Basisereignisse in der Neurogenese und Ontogenese des Nervensystems (Goodman und Shatz, 1993; Reichert und Boyan, 1997; Schachner, 1997). Zellen und Wachstumskegel von Axonen migrieren zu genauen Zielen, geführt durch spezifische Hinweise von umgebender Struktur, um das Gehirn zu bilden, basierend auf Zell-Zell-Kontakten und Zell-Matrix-Verbindungen. Diese Kontakte sind wichtig sowohl für die Entwicklung als auch später für die Funktion des Gehirns. Die Ausbildung dieser Kontakte erfordert einen Dialog einerseits zwischen den Zellen, aber auch mit ihrer unmittelbaren Umgebung. Allerdings können auch nachdem diese Verknüpfungen vollzogen wurden, Veränderungen an diesem Netzwerk stattfinden, z.B. durch Deletion oder Addition von Synapsen oder die Änderung von bereits existierenden Synapsen. Diese Kapazität für Veränderungen - synaptische Plastizität- ist die Möglichkeit zum Lernen und Erinnern. Es gibt beträchtliche Hinweise darauf, dass Lernen eine neuroplastische Veränderung bei zellerkennenden Funktionen unter Einbeziehung von Zelladhäsionsmolekülen (*cell adhesion molecules*; CAM's) hervorruft. Die Hauptfamilie, die in Gehirnbildung und Funktion involviert ist, ist die Immunglobulin-Superfamilie (Brummendorf und Rathjen, 1995). Diese CAM's können aufgrund der Anordnung ihrer Domänen, Membran-Topologie und Sequenzübereinstimmung in verschiedene Unterfamilien eingeteilt werden.

1.3.1 NCAM (neurales Zelladhäsionsmolekül; *neural cell adhesion molecule*)

Das neurale Zelladhäsionsmolekül war das erste identifizierte neurale Erkennungsmolekül (Jorgensen und Bock, 1974; Rutishauser et al., 1976). NCAM ist ein Mitglied der Immunglobulin (Ig)- Superfamilie, die durch ca. 100 Aminosäuren große Ig-homologe Domänen charakterisiert ist. Der extrazelluläre Teil von NCAM besteht aus fünf-Ig-Domänen (Ig1-5) und zwei Fibronectin Typ III (FN -III)-homologen Modulen. Jeder der fünf Ig-Domänen kann eine bestimmte Funktion zugeordnet werden: Die erste N-terminale Ig-1-Domäne ist in Zelladhäsion und Neuritenwachstum involviert (Frei et al., 1992), die folgende Ig-2-Domäne ist an der Heparin-Bindung beteiligt (Cole und Akeson, 1989), die Ig-3-Domäne bindet homophil an NCAM auf den Oberflächen anderer Zellen (trans-Mechanismus) (Rao et al., 1992), Ig-4 enthält das VASE (*variable alternatively spliced exon*) (Doherty und Walsh, 1992; Safell et al., 1994) und Ig-5 kann polysialyliert werden (Nelson et al., 1995) (Abbildung 6). Durch alternatives Spleißen werden drei Hauptformen des NCAMs synthetisiert, die entsprechend ihrem ungefähren Molekulargewicht NCAM180, NCAM140 und NCAM120 genannt werden. NCAM180 und NCAM140 sind Transmembran-Moleküle, die sich in der Länge ihrer cytoplasmatischen Domäne unterscheiden, während NCAM120 über einen Glycophosphatidylinositol-Rest in der Membran verankert ist (Abbildung 6).

NCAM vermittelt eine Calcium-unabhängige homophile (NCAM-NCAM) Zelladhäsion (Rao et al., 1992; Rao et al., 1994), sowie heterophile Wechselwirkungen mit anderen Zelladhäsionsmolekülen, wie z.B. L1 (Kadmon et al., 1990) und extrazellulären Matrixkomponenten (Reyes et al., 1990; Kiselyov et al., 1997; Storms et al., 1996). Durch homophile NCAM-Bindungen können intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktiviert werden, die das Neuritenwachstum primärer Neurone fördern.

Eine wichtige Modifikation von NCAM ist die Glycosylierung durch Polysialinsäure. Dadurch werden Zelladhäsion und Neuritenwachstum beeinflusst.

(Für Übersichtsartikel siehe Rutishauser et al., 1988; Jorgensen., 1995; Fields und Itoh, 1996).

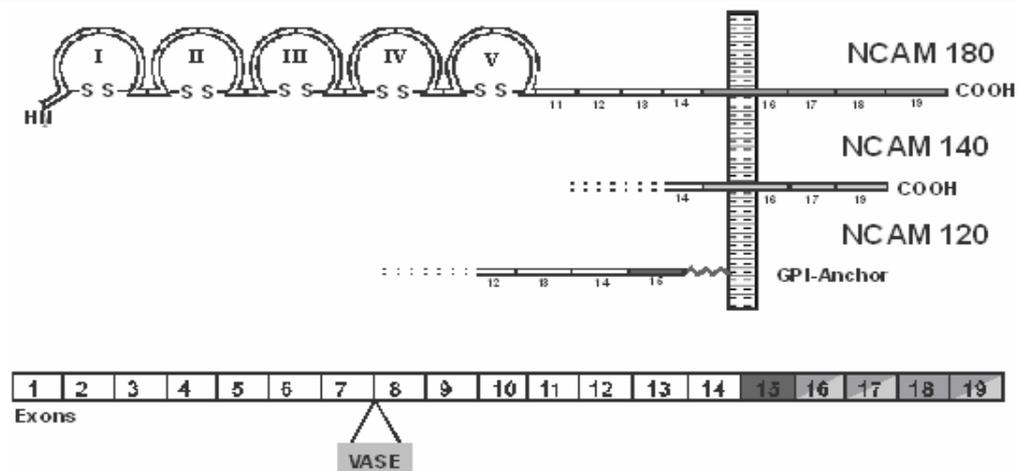


Abbildung 6 Spleißingvarianten des NCAM

Die Polysialinsäure (PSA)- Struktur

Die Polysialinsäure wurde 1982 von Finne im Säugerhirn entdeckt. Sie ist ein lineares, helikales Homopolymer (8 bis über 100 Sialinsäure-Monomere) von α -2,8-verknüpfter Sialinsäure.

Bei Säugetieren kommt PSA hauptsächlich am neuronalen Zelladhäsionsmolekül (NCAM) vor, besonders im Gehirn (Finne, 1982), der Muskulatur (Rieger et al., 1985; Lackie et al., 1990) und der Niere (Roth et al., 1987; Lackie et al., 1990).

Die fast vollständige Abwesenheit der Polysialinsäure in NCAM-defizienten Mäusen zeigt, dass NCAM der Hauptträger von PSA ist (Cremer et al., 1994). Allerdings konnten Zuber et al. (1992) zeigen, dass die Polysialinsäure auch auf der α -Untereinheit des spannungsabhängigen Natrium-Kanals der Ratte vorkommen kann.

Die erste beobachtete Funktion der Polysialinsäure ist die Verringerung der NCAM-vermittelten Membran-Membran-Adhäsion in vitro (Sadoul et al., 1983; Cunningham et al., 1983). Später wurde festgestellt, dass die Polysialinsäure auch andere Zellinteraktionen beeinflussen kann, die nicht auf der homophilen NCAM-NCAM-Wechselwirkung beruhen. Acheson et al. (1991) und Rutishauser et al. (1988) stellten die Hypothese auf, dass die PSA-vermittelte Regulation der Zell-Zell-Interaktionen auf sterischen Behinderungen und den negativen Ladungen der Polysialinsäure beruht. Die Polysialinsäure hat einen Einfluss auf die Interaktionen zwischen Zelladhäsionsmolekülen auf gegenüberliegenden Zellen (trans-Interaktionen) und auf Interaktionen zwischen Zelladhäsionsmolekülen auf der gleichen Zelle (cis-Interaktionen).

Bei der trans-Wechselwirkung würde ein größerer Abstand zwischen den Zellen auch andere Molekülwechselwirkungen als die zwischen NCAM-Glycoproteinen, wie z.B. L1-Interaktionen beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass der Abstand zwischen

gegenüberliegenden Zellmembranen um 10-15 nm abnimmt, wenn die PSA von NCAM entfernt wird (Yang et al., 1992). Die Effekte auf die cis-Wechselwirkungen sind komplexer, da die PSA einen Einfluss auf Interaktionen verschiedener Zelladhäsionsrezeptoren in der Plasmamembran der gleichen Zelle aufweist, wie beispielsweise zwischen NCAM und L1 (Kadmon et al., 1990; Horstkorte et al., 1993) und / oder die Zusammenlagerung von NCAM in der Membran und somit die Signaltransduktion beeinflusst (Doherty und Walsh, 1992).

Die aktivitätsabhängige Expression der Polysialinsäure an der Synapse deutet auf eine Rolle des Glycans bei der aktivitäts-induzierten synaptischen Plastizität hin. Zwei Studien konnten zeigen, dass eine Endoneuraminidase-N (Endo-N)-Behandlung zur Abspaltung der Polysialinsäure die Induktion von Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) in der CA1-Region von akuten Hippocampuschnitten verhindern kann (Müller et al., 1996; Becker et al. 1996). Dieser Effekt ist vollständig reversibel: nach Entfernen des Enzyms aus der Gewebekultur lassen sich LTP und LTD wieder induzieren. Auch in Hippocampus-Gewebe von NCAM-defizienten Mäusen ist die Induktion von LTP an den Schafferschen Kollateralen-CA1- und der Moosfaser-CA3-Synapsen deutlich beeinträchtigt (Müller et al., 1996; Cremer et al., 1998). Diese Beeinträchtigung der Langzeitpotenzierung ist wahrscheinlich Ursache dafür, dass die NCAM-defizienten Tiere Defizite beim Hippocampus-abhängigen räumlichen Lernen aufweisen (Cremer et al., 1994). Auch bei Endo-N-injizierten Ratten kann dieses Phänomen beobachtet werden, was die Autoren ebenfalls auf eine Rolle der PSA bei der synaptischen Plastizität schließen lässt (Becker et al., 1996).

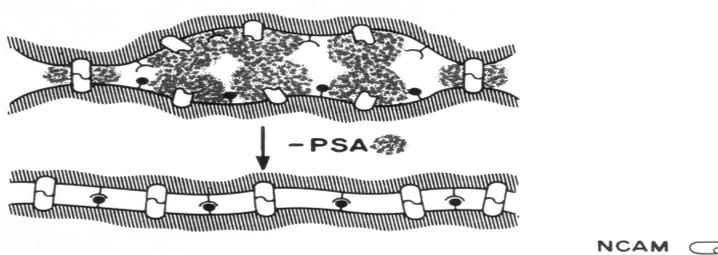


Abbildung 7 PSA-vermittelte Regulation von Zell-Zell-Interaktionen
Rutishauser et al., 1988

NCAM180

Als Persohn et al., (1989) die Lokalisation der 180kD-Isoform des NCAM in postsynaptischen Membranen mittels Immunoelektronenmikroskopie untersuchten, fanden sie heraus, dass NCAM180 nur in einigen Synapsen des Hippocampus exprimiert ist. NCAM180 ist über Spektrin mit dem Cytoskelett verbunden (Pollerberg et al., 1987). Spektrin findet man in hoher Konzentration in der postsynaptischen Dichte. NCAM180 zeigt eine stärker reduzierte laterale Beweglichkeit innerhalb der Plasmamembran, verglichen mit NCAM140 (Pollerberg et al., 1986). Aufgrund dieser Beobachtungen vermuten die Autoren, dass NCAM180 eine entscheidende Rolle für die Stabilisierung von Zellkontakten an den Synapsen spielt. Diese Vermutungen wurden durch die Ergebnisse von Schuster et al. (1998) untermauert. Sie fanden heraus, dass 24 Stunden nach LTP des Tractus perforans der Prozentsatz von Synapsen, die detektierbare Mengen von NCAM180 auf der Post-Synapse exprimieren, mindestens um den Faktor zwei ansteigt. Interessanterweise ruft auch ein aktiver Vermeidungstest bei Hühnern, fünf bis sechs Stunden nach dem Test, subtile Änderungen im Verteilungsmuster, aber nicht in der Dichte von NCAM180 im Vorderhirn hervor (Rusakov et al., 1994). Doyle et al. (1992) konnten zeigen, dass die Menge der polysialylierten Form von NCAM180 bei Ratten nach einem passiven Vermeidungstest erhöht ist. Wellen erhöhter und erniedrigter Polysialinsäure-Expression können auch unter Lernbedingungen, die mehr als einen Trainingsdurchgang erfordern, beobachtet werden (Murphy et al., 1996).

1.3.2 L1 (CD171, N-CAM L1 oder L1Cam) und CHL1

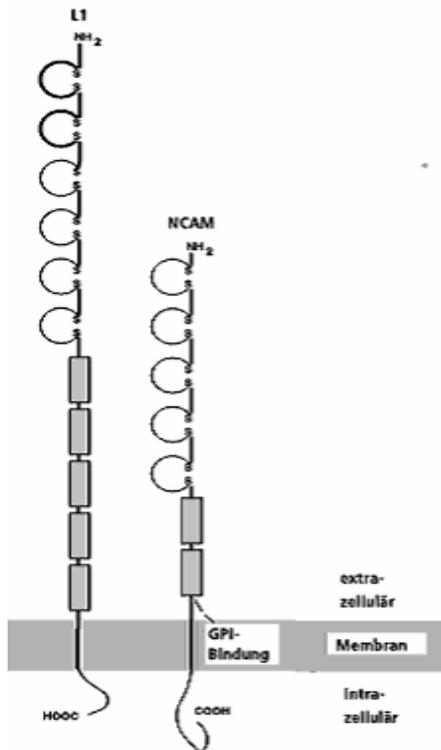
L1, als erstes entdeckt von Rathjen und Schachner (1984) ist ein integrales Membranglykoprotein, nahe verwandt mit NCAM. Schachner und Mitarbeiter charakterisierten L1 schon in einigen Veröffentlichungen seit 1984. NILE (in Ratten) (Salton et al., 1983) und NgCAM (Hühner) (Grumet et al., 1984) sind vermutlich die homologen Proteine. L1 ist auch außerhalb des Nervensystems z.B. auf Leukocyten und Epithelzellen lokalisiert (Übersicht: Hortsch, 2000).

Die L-Cam-Gen-Familie, definiert durch das L1-Gen (Brummendorf und Rathjen, 1995; Hortsch, 1996), hat großes Interesse auf sich gezogen, seit eine Reihe neurologischer Störungen, vererbt oder erworben, in Mutationen des L1-Gens gefunden wurden (Bateman et al., 1996; Fransen et al., 1998). Mitglieder dieser Familie, die aus L1 und einer Reihe sehr ähnlicher Moleküle bestehen, (NgCAM, NrCAM, CHL1, E587, Neurofascin) haben den gleichen Basisbauplan (Abbildung 8). Er besteht aus sechs extrazellulären Immunglobulin (Ig)-Domänen, gefolgt von fünf Fibronectin-Typ III-(FN III)-Domänen, verbunden mit einer membrandurchziehenden Region, die eine kurze (85-147 Aminosäuren) cytoplasmatische

Domäne besitzt. Der extrazelluläre Teil dieser Proteine ist hochgradig glycosyliert. Dadurch sind sie zu homophilen oder heterophilen Interaktionen fähig, wie Zellmigration, Axonenwachstum, Fasciculation, Synaptogenese und synaptische Plastizität, die den Lern- und Gedächtnisprozessen unterliegen.

Verschiedene Autoren haben L1 mit einer verbesserten Nervenzellregeneration und einer gesteigerten synaptischen Effizienz in Verbindung gebracht (Martini und Schachner, 1988; Ide, 1996, Nolte et al., 1989; Brook et al., 2000). Außerdem wurde ein verbessertes räumliches Lernvermögen mit der Rolle von L1 impliziert. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass nach einer Läsion die Überexpression und Hochregulation des neuritenwachstum-promovierenden Zellerkennungsmoleküls L1 in den Schwann'schen Zellen ein wichtiges Ereignis zur Förderung des Axonwachstums im peripheren Nervensystem ist (Nieke und Schachner, 1985; Seilheimer et al., 1989). Wenn L1 im zentralen Nervensystem transgen in sonst L1 negativen Astrocyten überexprimiert wird (Mohajeri et al., 1996) fördert es ebenfalls das Neuritenwachstum in einem sonst inhibitorischen Milieu in vitro und vivo (Bartsch und Schachner, unveröffentlichte Resultate). Außerdem fördert L1 das Überleben von Nervenzellen in Kultur (Hulley et al., 1998) und erhöht die synaptische Effizienz in vitro (Lüthi et al., 1994) und in vivo (Arami et al., 1996).

Mutationen im L1-Gen verursachen eine X-gebundene neurologische Störung beim Menschen, die als CRASH (Corpus callosum Hypoplasie, Retardierung, Aphasie, Spastische Paraplegie und Hydrocephalus) bezeichnet wird (Brummendorf et al., 1998). Neuropathologien, die in L1-ko-Mäusen beschrieben worden sind, ähneln dem CRASH-Phänotyp und schließen erweiterte Ventrikel, abnorme dendritische Architektur und Entwicklungsdefizite im Hippocampus und Corpus callosum ein (Cohen et al., 1998; Dahme et al., 1997; Haney et al., 1999). Mäuse, bei denen das CHL1-Gen ausgeknockt wurde, haben einen ähnlichen Phänotyp wie die L1-ko-Mutanten. Menschen mit einer Mutation im CALL (cell adhesion L1-like)-Gen leiden ebenso wie CRASH-Syndrom-Patienten unter mentaler Retardierung. Das CALL-Gen des Menschen ist zu 84% mit dem murinen CHL1 auf dem Proteinlevel identisch. Beide Gene haben die gleiche Domänenstruktur und ein ähnliches Expressionsmuster (Wei et al., 1998).



Neurale Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie, L1 und NCAM. Die Moleküle verfügen in typischer Weise über eine Transmembrandomäne, die das Molekül in einen kleineren intrazellulären und größeren extrazellulären Bereich festlegt, durch die Loop-Struktur und S-S im Schema angedeutet. Dies sind die Abschnitte von 40-70 Aminosäuren (As), die durch Disulfidbrücken in einer β -Faltblattstruktur zusammengehalten werden. Die rechteckigen Boxen stehen für eine zweite Art von wiederholten Domänen. Diese Sequenzelemente von ca. 100 As Länge zeigen Homologie zu Fibronectin.

Abbildung 8 L1 und NCAM

1.3.3 Tenascin-R (Restrictin; J1-160/180; TN-R)

Tenascine sind wichtige extrazelluläre Matrixproteine, die eine große Anzahl von Glycosylierungen bei Entwicklungsprozessen regulieren, z.B. bei der Organogenese und Zellmigration.

TN-R kommt ausschließlich im zentralen Nervensystem von Vertebraten während der späteren Phasen der Ontogenese und im adulten Organismus vor (Pesheva und Probstmeier, 2000). Die Expression von TN-R wird im adulten Tier nicht herunterreguliert (Fuss et al., 1993). Soweit zur Zeit untersucht, wird TN-R nur im sich entwickelnden und adulten ZNS von Oligodendrocyten und hauptsächlich Inter- und Motoneuronen exprimiert. Man findet TN-R aber auch in den horizontalen Zellen der Retina (Wintergerst et al., 1993; Derr et al., 1998).

TN-R wurde zuerst im ZNS von Hühnern entdeckt (Rathjen, 1991; Nörenberg et al., 1992). Das gleiche Protein wurde dann auch in der Ratte gefunden und geklont (Pesheva et al., 1989; Fuss et al., 1993).

TN-R Glycoproteine werden im ZNS mit zwei Haupt-Isoformen exprimiert: mit 160 kD (TN-R160) und mit 180 kD (TN-R180) (Pesheva et al. 1989; Angelov et al. 1998; Becker et al., 1999). TN-R160 bildet Dimere, TN-R180 bildet Trimere (Pesheva et al., 1989; Nörenberg et al., 1992).

Zurzeit umfasst die Tenascin-Familie sechs verschiedene Gene, die die folgenden Proteine codieren: TN-C, TN-R, TN-X, TN-Y, TN-W. Tenascin-Glycoproteine sind durch eine typische Struktur charakterisiert: sie besitzen eine cysteinreiche N-Terminale Region hydrophober Aminosäuren, gefolgt von einer unterschiedlichen Anzahl EGF-ähnlichen Domänen und Fibronectin III-ähnlichen Wiederholungen. Die C-Terminale Region ist homolog zu Fibrinogen. Die einfachen Polypeptid-Ketten sind normalerweise über Disulfid-Brücken miteinander verbunden und formen Di- oder Trimere (TN-R, TN-X) oder auch Hexamere (TN-C) (Chiquet-Ehrismann et al., 1994).

Obwohl TN-R als ein HNK1-Kohlenhydrat tragendes Glykoprotein beschrieben wird, hat es auch viele Möglichkeiten zur N- und O-Glycosylierung (Pesheva et al., 1989; Fuss et al., 1993). Die Untersuchung der TN-R-Glycosylierung im Gehirn von Nagetieren hat eine relativ hohe Menge von O-verbundenen sialylierten Glykanen gezeigt (Zamze et al., 1999).

Sequenzanalysen von TN-R in Hühnern (Nörenberg et al., 1992), in der Ratte (Fuss et al., 1993) und auch beim Menschen (Carnemolla et al., 1996) haben die strukturelle Verwandtschaft der TN-R zueinander und auch zu TN-C aufgedeckt. Die Strukturhomologien von TN-R und TN-C lassen auch auf ähnliche Funktionen im Organismus schließen.

TN-R akkumuliert in perineuralen Netzen von Inter- und Motoneuronen, oft colokalisiert mit TN-C. Dies ist in verschiedenen Hirnregionen der Säugetiere zu beobachten: Im Cortex, Hippocampus, Cerebellum, Retina, Hirnstamm und Rückenmark (Bartsch et al., 1993; Celio, 1993; Wintergerst et al., 1993, 1996; Angelov et al., 1998; Hagihara et al., 1999).

Folgendes Experiment ist von Angelov et al. (1998) durchgeführt worden: im Hirnstamm von adulten Ratten wurde eine periphere Nervenverletzung des N. facialis oder des N. hypoglossus herbeigeführt. Nach dieser Nervenverletzung wurde TN-R im korrespondierenden Motoneuron im Hirnstamm runterreguliert. Diese Regulation ist reversibel unter regenerativen (wieder zusammengenähten Nervenenden) und irreversibel unter degenerativen Bedingungen (Nervenresektion). Die Herunterregulation des Proteins im Neuropil und dem perineuralen Netz von Motoneuronen ist coinduziert mit der Erscheinung und neuronopetalen Migration aktiver Mikroglia in den läsierten Nucleus. Dies geschieht allerdings nur, wenn Mikroglia-Zellen in direktem Kontakt zu Motoneuronen gefunden wurden, die frei von TN-R waren (Angelov et al., 1998).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass TN-R eher anti-adhäsive Funktionen auf Neuronen besitzt (Probstmeier et al., 2000). Im Gegensatz zu seinen anti-adhäsiven Möglichkeiten bei Mikroglia-Zellen und in Verbindung mit Integrin-Extracellulär-Matrix-Interaktionen, weist TN-R auch adhäsive Funktionen auf. TN-R ist adhäsives Substrat für Gliazellen im ZNS,

Astrocyten und Oligodendrocyten. TN-R160 und TN-R180 werden von Oligodendrocyten während der aktiven Myelinisierung im Säugetiergehirn exprimiert (Pesheva et al., 1997).

TN-R kann aufgrund seiner Eigenschaften also als multifunktionales extrazelluläres Matrix-Glycoprotein betrachtet werden, das viele Interaktionen mit unterschiedlichen Zellen und Matrixkomponenten beeinflussen kann. Diese Interaktionen werden durch eine konstante Adhäsion und Differenzierung oder durch Repulsion oder Inhibition oder auch Förderung von Neuritenwachstum hervorgerufen.

Da sich die meisten Arbeiten mit der TN-R-Expression im sich entwickelnden ZNS beschäftigen, ist über die Funktion im adulten Säugetiergehirn oder sogar über die Einbeziehung in Lernen und Gedächtnis wenig bzw. gar nichts bekannt. TN-R-ko-Mäuse, ähnlich wie die TN-C-ko-Mäuse, verhalten und entwickeln sich normal (Saga et al., 1992; Forsberg et al., 1996). TN-C und TN-R-Doppel-ko-Mutanten zeigen ebenfalls kein auffälliges Verhalten (Pesheva und Probstmeier, 2000). Auch Weber et al. (1999) beschreiben, dass bei den TN-R ko-Mäusen die einzelnen Hirnregionen und die Myelinstruktur normal aussehen. Allerdings sieht das Immunostaining von Chondroitinsulfat-Proteoglycan-Phosphacan, einem hochaffinen Liganden von TN-R, eher schwach und diffus aus, wenn es mit Wildtyp-Tieren verglichen wird. Weitere Ergebnisse dieser Veröffentlichung deuten daraufhin, dass TN-R eine essentielle Rolle bei der Formation perineuronaler Netze und in der normalen Konduktionsgeschwindigkeit der optischen Nerven spielt (Weber et al., 1999).

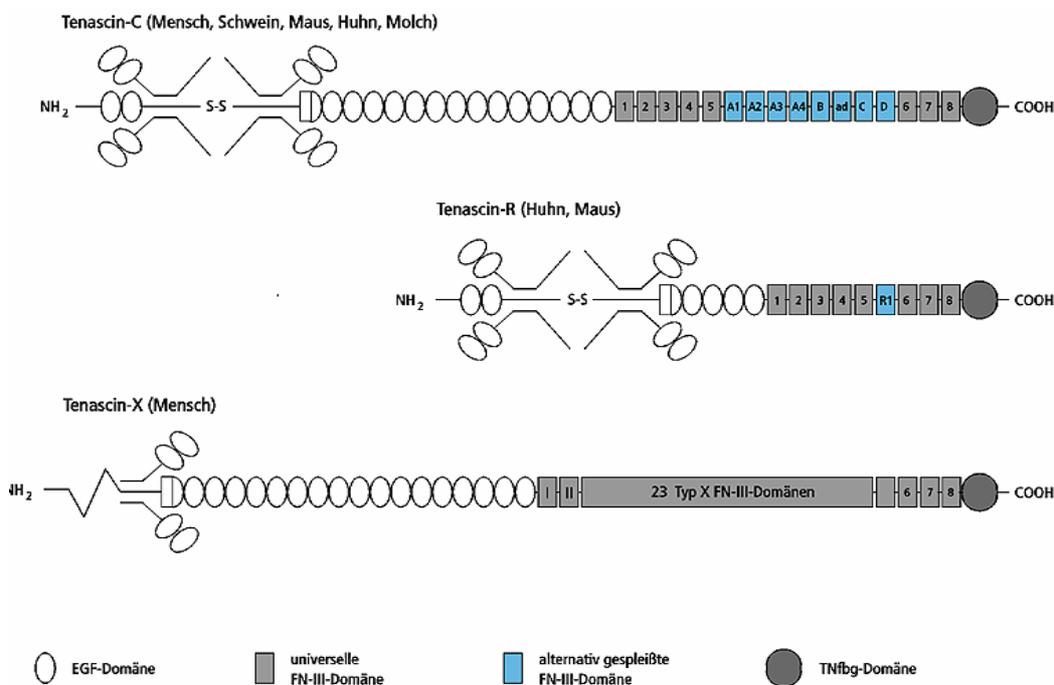


Abbildung 9 Die Domänenstruktur der Tenascin-Familie
Verändert nach: Chiquet-Ehrismann et al., 1994

Die Fibronectin-III-Domänen, die bei allen Tenascinen vorhanden sind, sind von 1-5, bzw. 1-8 nummeriert. Alternativ gespleißte Domänen sind durch Buchstaben gekennzeichnet. Die R1-Domäne von TN-R ist vermutlich nicht verwandt mit anderen Domänen des TN-C. Die 23-X-Typ Fibronectin-III-Domänen von TN-X sind vermutlich alternativ gespleißt (Erickson, 1993).

1.4 Der Step-Down-Avoidance-Test (SDA) und Lernen und Gedächtnis

Um die Mechanismen des Lernens untersuchen zu können, müssen Lernversuche mit Tieren durchgeführt werden. Diese Lerntests lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen. Eine Kategorie bilden die passiven Vermeidungstests (*Inhibitory-Avoidance-Tests*), zu denen auch der SDA gehört. Der SDA erfordert das Lernen, nicht von einer Plattform herunter zu treten, um einen milden Fußschock zu vermeiden. Das natürliche Explorationsverhalten der Tiere wird dabei unterdrückt. Normalerweise ist nur ein Lerndurchgang notwendig, um den Tieren beizubringen, die Plattform nicht zu verlassen. Der Zeitraum des Lernens ist daher eng begrenzt. Darum ist dieser Test ideal, um Prozesse, die durch das Lernen im SDA initiiert werden, zu untersuchen (Gold, 1986; Izquierdo und Medina, 1997). Er wurde deshalb auch bei den vorliegenden Untersuchungen angewendet.

Der Test beinhaltet nicht nur eine hippocampusabhängige deklarative Komponente (Izquierdo et al., 1992; Izquierdo und Medina, 1991; Izquierdo et al., 1997; Lorenzini et al., 1999; O'Connell et al., 1997), sondern auch eine selten untersuchte Komponente des impliziten Gedächtnisses, die Bradykardie (Hine und Paolino, 1970). Die Tiere zeigen also eine verlangsamte Herztätigkeit, wenn sie erneut mit dem Test konfrontiert werden und sie sich erinnern.

Der Hippocampus, die Amygdala, der entorhinale Cortex und der parietale Cortex sind in den ersten Tagen nach dem Lernen des Tests involviert. Nach 30 Tagen sind nur noch der entorhinale und parietale Cortex involviert und nach 60 Tagen ist nur noch der parietale Cortex nötig, um die gespeicherte Information abzufragen (Izquierdo und Medina, 1997).

Der Hippocampus formt drei verschiedene, aber miteinander in Bezug stehende Schaltsysteme: Eins zur Zeit der Akquisition der Information, ein anderes System zur Zeit der Gedächtnisbildung (*Encoding*) und zu der Zeit, wenn der Gedächtnisinhalt abgerufen wird (*Retrieval*). Während der Akquisitionsphase muss die Information vom Arbeitsgedächtnis im präfrontalen Cortex (Fuster, 1995) zum Hippocampus gelangen (Hyman et al., 1990; Witter et al., 1989).

In der Periode unmittelbar nach dem SDA-Training arbeitet der Hippocampus mit der Amygdala und dem medialen Septum zusammen (Izquierdo et al., 1992) und 30 bis 60min später mit dem entorhinalen parietalen Cortex (Izquierdo et al., 1997; Zanatta et al., 1996). Bei Menschen sind vermutlich unterschiedliche hippocampale Unterregionen ins *Encoding* und *Retrieval* unterschiedlicher Aufgaben involviert (Gabrielli et al., 1997).

In den ersten Tagen nach dem Lernen integrieren der Hippocampus und die Amygdala ein Netzwerk mit dem entorhinalen und parietalen Cortex, welches für das *Retrieval* notwendig ist (Izquierdo et al., 1997; Quillfeldt et al., 1996). Ihr Zusammenwirken erfordert den AMPA

(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionic acid)-Rezeptor, einen ionotropen Glutamaterezeptor: Cyanonitroquinoxalin-dion (CNQX), ein AMPA-Rezeptor-Antagonist, vor dem Test in diese Strukturen injiziert, verursacht eine Gedächtnisblockade, die 30 Tage nach dem Lernereignis nicht länger effektiv ist (Bechara et al., 1995). Diese Strukturen sind also nach diesem Zeitraum nicht mehr notwendig, um Gedächtnisinhalte abzurufen. Vermutlich übernimmt dann der corticomediale präfrontale Cortex diese Funktionen (Damasio, 1995). Die Kontrolle der Gedächtnisausbildung wird auf den entorhinalen und den posterior parietalen Cortex ab dem 30. Tag nach dem Lernereignis übertragen (Izquierdo et al., 1997). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Milner et al. (1970) und Corkin et al. (1985) überein, die klinische Daten über die begrenzte Dauer der retrograden Amnesie bei Patienten nach medialen bilateralen Läsionen des Temporallappens erhoben haben.

Ab dem 60. Tag nach dem Lernereignis hatte eine CNQX-Injektion in den entorhinalen Cortex keinen Effekt mehr. Eine Injektion in die parietalen Gebiete verursachte hingegen eine Amnesie. Der posterior parietale Cortex behält also auch nach dieser Zeit die Kontrolle über die Gedächtnisausbildung (Izquierdo et al., 1997).

Interessanterweise ist die Reihenfolge der einzelnen Hirnstrukturen, die eine Rolle bei der Gedächtnisbildung spielen, die gleiche, wenn sie auf der Stufe des *Retrievals* ihre Funktion wieder aufgeben: zuerst der Hippocampus und Amygdala, dann der entorhinale Cortex und zum Schluss der parietale Cortex (Izquierdo et al., 1997; Quillfeldt et al., 1996; Zanatta et al., 1996).

Möglicherweise spielen auch andere corticale Bereiche (frontal, cingula, occipital) bei der Langzeitgedächtnisbildung eine Rolle (Bontempi et al., 1996; Valenstein et al., 1987). Bei einigen Aspekten des räumlichen Lernens sind NMDA-Rezeptor-unabhängige Mechanismen, möglicherweise im Hippocampus, involviert (Bannerman et al., 1995). Bei anderen Aspekten des räumlichen und nicht-räumlichen deklarativen Lernens wird das Striatum involviert (Packard und Mc Gaugh, 1992).

Für die Speicherung emotionaler Informationen des SDA-Tests sind zur Zeit des Trainings und für eine kurze Periode danach die Amygdala und vielleicht das mediale Septum eingebunden. Später spielt der entorhinale Cortex und der posterior parietale Cortex für diese Form der Informationsspeicherung eine Rolle (Izquierdo et al., 1997).

1.4.1 NMDA-Rezeptoren und SDA

Das SDA-Lernen löst im Hippocampus von Ratten biochemische Vorgänge aus, die nötig sind, damit sich die Tiere an den Test erinnern. Sie werden durch Aktivierung des Glutamaterezeptors ausgelöst und involvieren mindestens 5 verschiedene Signalkaskaden, in

denen folgende Proteinkinasen eine Schlüsselrolle spielen: PKG (Bernabeu et al., 1997), PKC (Bernabeu et al., 1995; Cammarota, 1997), CamKII (Bernabeu et al. 1997; Wolfman et al., 1994) und PKA (Bernabeu et al., 1997; Bevilaqua et al., 1997). Einige Stufen dieser Kaskaden sind auch bei anderen Formen des Lernens involviert, die ebenfalls hippocampusabhängig sind (Abel et al., 1997, 1998; Wilson und Tonegawa, 1997, Anokhin, et al., 1991).

Dieselben Signalwege spielen auch während LTP und anderen Formen synaptischer Plastizität eine wichtige Rolle (Bliss und Collingridge, 1993; Maren und Baudry, 1995; Martin und Kandel, 1996).

Die Aussage, dass die Einbeziehung der genannten Vorgänge für das Erlernen des passiven Vermeideverhaltens erforderlich sind, beruhen im Wesentlichen auf Studien, bei denen Infusionen spezifischer Rezeptoragonisten bzw.- antagonisten oder Enzyminhibitoren nach verschiedenen Zeitpunkten vor oder nach dem Lernereignis in den Hippocampus und anderen Hirnregionen gegeben wurden. Außerdem liegen detaillierte biochemische oder histologische Analysen von Rezeptoren und Enzymen in denselben Strukturen, zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Training vor (Izquierdo und Medina, 1997).

Zuerst werden beim SDA der NMDA-Rezeptor, der AMPA-Rezeptor und metabotrope Glutamatrezeptoren aktiviert. Eine intrahippocampale Infusion 30-180min nach dem Training eines NMDA-Antagonisten, Aminophosphopentansäure (AP5) (Izquierdo et al., 1992) oder die Infusion eines Antagonisten des metabotropen Glutamatrezeptors, Methyl-Carboxyphenyl-Glycin (Bianchin et al., 1994) verursachen Amnesie. Werden allerdings in dem gleichen Zeitraum Glutamat oder ein Agonist (z.B. Aminocyclopentan-Dicarboxylat) für den metabotropen Rezeptor intrahippocampal verabreicht, fördert dies das retrograde Gedächtnis (Bianchin et al., 1994; Izquierdo et al., 1992). Die Injektion von CNQX in den Hippocampus führt ebenfalls zu Amnesie, wenn er 3h nach dem Training verabreicht wird (Jerusalinsky et al., 1992). Die Rolle von hippocampalen NMDA-Rezeptoren bei der Gedächtnisbildung wurde von verschiedenen Autoren diskutiert (siehe bei Izquierdo und Medina, 1997). Die Rolle der hippocampalen AMPA-Rezeptoren bei der Gedächtnisbildung wird bei Jerusalinsky et al. (1992) und bei Cammarota et al. (1996) diskutiert. Die Rolle der metabotropen Rezeptoren bei der Gedächtnisbildung beim SDA oder anderen Tests wird ausführlich von Reymann und Matthies(1989) und Riedel et al. (1996) diskutiert.

1.4.2 Calmodulin-KinaseII (CaMKII)-Aktivität und SDA

Die multifunktionelle, calmodulinabhängige Protein-Kinase II (CaMKII) phosphoryliert viele verschiedene Proteine und reguliert so den Energiestoffwechsel, die Ionenpermeabilität sowie die Synthese und Freisetzung von Neurotransmittern. CaMKII-Aktivität wird durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen reguliert, das entweder aufgrund der NMDA-Rezeptoraktivierung oder durch spannungsabhängige Kanäle in die Zelle gelangt (Abbildung 3). Reymann (1988) erkannte, dass CaMKII eine Schlüsselrolle bei der LTP in der CA1- und CA3-Region spielt (Abbildung 4 und 5). Später wurden seine Ergebnisse durch spezifische Inhibitoren, die Ito et al. (1991) verwendeten, bestätigt. Der Zeitpunkt für das Eintreten der CaMKII in die hippocampale CA1- und CA3- LTP überschneidet sich mit dem von PKC (Reymann, 1988).

CaMKII moduliert die Phosphorylierung von verschiedenen Proteinen, die für die synaptische Plastizität wichtig sind, z.B. ionotrophe Glutamatrezeptoren (Reymann, 1989), CREB (Ferrer et al., 1996) oder andere Strukturproteine.

Der erste Anhaltspunkt dafür, dass CaMKII an der Gedächtnisbildung des SDA-Lernens im Hippocampus und der Amygdala beteiligt ist, lieferten die Ergebnisse von Wolfman et al. (1994). Er injizierte zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem SDA-Training in die CA1-Region oder in die Amygdala einen spezifischen Inhibitor der CaMKII, das KN62. Einen starken amnesischen Effekt konnte er beobachten, wenn der Inhibitor sofort nach dem Training in die Amygdala oder den Hippocampus injiziert wurde. Eine intrahippocampale Injektion 30min nach dem Lernereignis hatte nur noch einen partiellen amnesischen Effekt. Infusionen 2-4 Stunden nach dem Training zeigten keine Wirkung mehr. Daraus schlossen die Autoren, dass die CaMKII eine wichtige Rolle in Hippocampus und Amygdala in den ersten Minuten nach dem Training spielen, genau wie in den ersten Minuten nach der Induktion von LTP (Ito et al., 1991). Zhao et al. berichteten (1996) über ähnliche amnesische Effekte von CaMKII-Inhibitoren in räumlichen Lerntests und zeigten einen Anstieg von CaMKII-Aktivität nach dem Training dieses Tests. Bei Bernabeu et al. (1997) stieg die Ca^{2+} -Ionen abhängige CaMKII-Aktivität direkt nach dem Training an, fiel dann leicht ab, blieb aber für etwa 30min auf diesem immer noch leicht erhöhten Niveau, um nach etwa 120min wieder auf den Normalwert abzufallen. Die gleichen Resultate beschrieben Wolfman et al. (1994) mit KN62.

1.4.3 cAMP/PKA/pCREB (phosphoryliertes CREB)-Kaskade und SDA

Die Gedächtnisleistungen von Tieren im SDA-Test lassen sich durch intrahippocampale Administration des cAMP-analogs 8-Br oder der Stimulatoren der Adenylyl-Cyclase 3-6h

nach dem Training verbessern. Die gleichen Effektormoleküle bewirken auch eine Verstärkung der LTP (Bernabeu et al., 1997; Bevilacqua et al., 1999).

Die hippocampale cAMP-Konzentration beginnt 60min nach dem SDA-Training anzusteigen und erreicht einen Peak 180-360min nach dem Training. Es ist auszuschließen, dass die gesteigerte Menge von cAMP auf eine gesteigerte Aktivität von Adenylyl-Cyclase zurückzuführen ist (Bernabeu et al., 1997) (Abbildung 5).

Nach dem SDA-Training steigt die PKA-Aktivität. Es treten dabei zwei Maxima auf. Das erste wird sofort nach dem Training erreicht und das zweite, ein höherer Peak, 3-6h nach dem Training. Das zweite Aktivitätsmaximum korreliert also mit dem Maximum der cAMP-Konzentration. cAMP stimuliert vermutlich die PKA (Bernabeu et al., 1997). Es ist nicht bekannt, wie das erste Aktivitätsmaximum der PKA ausgelöst wird (Bernabeu et al., 1997).

Die CREBs bilden eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die die Expression einer großen Anzahl von Genen regulieren (Davis et al., 1996; Ferrer et al. 1996). Die PKA-abhängige pCREB-Aktivierung verändert die Genaktivierung und Proteinsynthese innerhalb von 3-4h nach dem Lernereignis (Bourtchouladze et al. 1998; Martin und Kandel, 1996).

Beim SDA steigen die pCREB-Level in der CA1-Region ebenfalls zu zwei Maxima an: das erste ist direkt nach dem Training zu finden, das zweite größere auch nach 3-6h (Bernabeu et al., 1997). Beide pCREB-Peaks korrelieren mit den PKA-Peaks.

pCREB induziert die Synthese des Transkriptionsfaktors c-Fos, aber auch die anderer Proteine (Ferrer et al., 1996). Man kann auch bei c-Fos einen Anstieg 3-6h nach dem SDA-Training in der CA1-Region beobachten, gleichzeitig mit dem Peak von pCREB. cFos-Anstiege nach dem Training wurden in der CA2- und CA3-Region, im entorhinalen Cortex und im posterior parietalen Cortex beobachtet. Keine cFos-Veränderungen wurden im Striatum und dem Thalamus entdeckt (Bernabeu et al., 1997b).

1.4.4 Zelladhäsionsmoleküle und SDA

Die biochemischen Veränderungen nach dem SDA im Hippocampus nach dem Lernen sind, wie oben beschrieben, sehr groß: z.B. 20-120% Steigerung der Enzymaktivität der PKG, PKA, PKC oder CaMKII, außerdem steigt cAMP und cGMP, 40-80% Anstieg bei pCREB, 20-80% Anstieg bei der AMPA-Bindung (Bernabeu et al., 1997; Cammarota et al., 1996, 1997). Diese Ereignisse sind nicht synapsenspezifisch. Es sind zelluläre Vorgänge, die im gesamten Hippocampus oder in einzelnen Teilregionen sichtbar sind. Einige biochemische Veränderungen sind auf jeden Fall strukturspezifisch und alle scheinen lernspezifisch zu sein. Sie sind z.B. nicht bei Tieren beobachtet worden, die zwar in den SDA-Test gekommen sind,

jedoch keinen Fußschock erhalten haben oder bei Tieren, die einen Fußschock unabhängig vom SDA bekommen haben. Einige Folgen der biochemischen Veränderungen werden aber vermutlich synapsenspezifisch sein, hauptsächlich der Synapsen, die zur Zeit des Lernens aktiviert waren (Izquierdo und Medina 1997; Rose, 1995).

Die Langzeitspeicherung wird vermutlich durch die Synthese neuer Proteine oder anderer Moleküle garantiert, die durch synaptische Veränderungen initiiert wurde (Dunn, 1980).

Wachstum (Greenough et al., 1985), Verkürzungen (Brandon und Coss, 1982) und eine Erhöhung der Anzahl (Patel und Stewart, 1998) und/oder Verlust, Verringerung (Wallhauser und Scheich, 1987) der dendritischen *Spines* oder anderen Synapsenkomponenten wurden im Hippocampus wenige Stunden nach dem SDA-Training beobachtet.

Auch aktivitätsabhängige Veränderungen in der Zelladhäsion können zu Veränderungen in der synaptischen Funktion beitragen (Field und Itoh, 1996; Rose, 1995; Schachner, 1997). Glycoproteine auf der externen Seite der Zellmembranen spielen hierbei eine große Rolle (Rose, 1995). Die gesteigerte *Clusterbildung* von hyperchromen granulären Zellen im Gyrus Dentatus 5-7h nach dem Vermeidungslernen, wird Veränderungen der Zelladhäsionsmoleküle L1 und NCAM zugeschrieben (O'Connell et al., 1997). L1 und NCAM scheinen auch eine regulatorische Rolle bei der LTP in der hippocampalen CA1-Region zu spielen (Fields und Itoh, 1996; Lüthi et al., 1994). Antikörper gegen diese Moleküle, die kurz vor oder 5,5-8h nach dem SDA-Training in die cerebralen Ventrikel des Rattenhirns (Doyle et al., 1992) oder des Hühnerhirns (Scholey et al., 1995) verabreicht wurden, verhinderten Langzeitgedächtnisbildung. Die gleichen Resultate erzielten Arami et al., 1996 bei Ratten, die im Morris-Water-Maze-Labyrinth trainiert wurden.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass in den ersten 6h nach dem Training eine Kette von biochemischen Ereignissen im Hippocampus stattfindet, die für die Gedächtnisbildung notwendig ist. Es gibt zwei Phasen in dieser Kette. Eine direkt nach dem Training, eine andere 3-6h später. Beide stehen in Zusammenhang mit cAMP-sensitiver Gen-Transkription. Auf jede dieser Phasen folgen Veränderungen in der Glycoprotein-Synthese und Veränderungen in der Zelladhäsion, besonders in der zweiten Phase. Der Zeitverlauf der NCAM-Beteiligung findet während einer 6-8-stündigen post-Trainingsperiode statt, die auf eine Welle der Protein-Synthese in den vorangehenden 3-6 Stunden folgt (Matthies, 1982, 1989; Field und Itoh, 1996; Rose, 1995).

1.5 *Real-Time PCR* (Echt-Zeit-Polymerase-Ketten-Reaktion)

Es sollte nach Durchführung des Verhaltenstests eine *Real-Time-PCR* durchgeführt werden, um zu sehen, ob es zeitlich bedingte Unterschiede oder Unterschiede zwischen den einzelnen Testgruppen (Abbildung 22) in der Expression von Zelladhäsionsmolekülen im Hippocampus gibt. Das Prinzip dieser PCR wird hier beschrieben.

Mit dieser Methode ist es möglich, Proben aufgrund von fluoreszenz-markierten DNA-Hybridisierungssonden quantitativ zu vergleichen. Die Hybridisierungssonden binden an die komplementären Regionen der Zielstrang-DNA und zeigen dadurch eine messbare Fluoreszenzzunahme während der Reaktion. Ein quantitativer Vergleich von Proben ist möglich, da zu einem Zeitpunkt gemessen werden kann, an dem die Proben der gleichen exponentiellen Kinetik folgen.

Die Fluoreszenzsonden funktionieren nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz Energie-Transfers (FRET). Als FRET bezeichnet man einen Vorgang, bei dem ein nach Anregung durch kurzwelliges Licht fluoreszierendes Donatormolekül seine Emissionsenergie auf ein zweites Akzeptormolekül überträgt, das daraufhin mit der Emission längerwelliges Lichts reagiert. Der Energietransfer von einem auf das andere Molekül erfolgt über einen Elektronenfluss. Das FRET-Prinzip wird bei der Synthese hochspezifischer Hybridisierungssonden, die mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, angewendet.

Das so genannte *Reporter*-Molekül gibt dabei Auskunft über die Produktzunahme während der PCR. Das so genannte *Quencher*-Molekül absorbiert die Fluoreszenzsignale des Reportermoleküls, solange beide Moleküle in der Hybridisierungssonde direkt benachbart zueinander liegen. In diesem Grundzustand ist die Reporteremissionsstrahlung für den Fluoreszenzdetektor, mit dem die Produktzunahme in der PCR gemessen wird, unsichtbar. Erst mit der PCR-Produktzunahme erfolgt eine räumliche Trennung von *Reporter* und *Quencher*; die Reporterfluoreszenz wird detektierbar und korreliert direkt mit der in der Reaktion gebildeten PCR-Produktmenge (Holland et al., 1991).

1.5.1 TaqMan-Sonden

Beim TaqMan-Prinzip, auch 5'-Nuklease-Assay, binden die Fluoreszenz-markierten Hybridisierungssonden am komplementären Zielstrang zwischen den *Primer*-Bindungsstellen. Bei der Neustrangsynthese wird die Hybridisierungssonde durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase in kleine Fragmente geschnitten und aus dem Zielstrang freigesetzt. *Reporter*- und *Quencher*-Moleküle liegen jetzt getrennt im

Reaktionsmix vor, und die gemessene Zunahme der Reporterfluoreszenz in jedem PCR-Zyklus korreliert direkt mit der PCR-Produktzunahme.

Die Taq Polymerase entfaltet ihre 5'→3'-Exonukleaseaktivität nur am DNA-Doppelstrang. Daher bleiben nicht hybridisierte Sondenmoleküle (DNA-Einzelstränge) unbeschadet und zeigen demzufolge auch keine messbare Fluoreszenz (Holland et al., 1991; Latif et al., 2001).

1.5.2 GAPDH (Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase)

Mit vielen verschiedenen Techniken kann eine RNA-Menge quantifiziert werden, alle diese Techniken erfordern einen internen Standard, meistens so genannte *housekeeping genes*. Sie haben diesen Namen aufgrund der Tatsache, dass ihre Synthese in allen Zelltypen, die einen Zellkern besitzen, beobachtet werden kann. Sie sichern das Überleben der Zelle. Es wird allgemein angenommen, dass die Synthese der *housekeeping genes* innerhalb der Zelle nicht variiert und sie damit als sicherer und konstanter Standard gelten. Allerdings zeigen auch viele Studien, dass ihre Expression unter bestimmten Konditionen durchaus stark schwanken kann (Huitorel und Pataloni, 1985; Zhang und Snyder, 1992; Tilbury et al., 1993; Hobbs et al., 1993; Aguilera et al., 1994; Bereta und Bereta, 1995; Lemay et al., 1996; Chang et al., 1998). Dies ist mit der Tatsache zu erklären, dass *housekeeping* Proteine nicht nur in den basalen Zellmetabolismus involviert sind, sondern auch an anderen Zellfunktionen teilnehmen (Petersen et al., 1990; Ishitani et al., 1996).

Die am häufigsten berücksichtigten und genutzten *housekeeping genes* sind Albumin (Tilbury et al., 1993), β - und γ -Actine (Choi et al., 1991), Cyclophilin (Jaschke et al., 1998), α - und β -Tubuline (Choi et al. 1991, Serels et al., 1998), Hypoxantin-Phosphoribosyltransferase (HRPT) (Marten et al., 1994; Foss et al. 1998), L32 (Lemay et al., 1996; Wu et al., 1999), 18S oder 28S rRNA (Finnegan et al., 1993; Aguilera et al., 1994) oder GAPDH (Petersen et al., 1990; Tang et al., 1996). Es gibt nur wenige Studien, die mehr als ein Gen als inneren Standard eingesetzt haben (Dent et al., 1997).

GAPDH ist ein gut untersuchtes glycolytisches Enzym, das eine Schlüsselrolle im Energie-Metabolismus spielt. Es katalysiert bei der Glykolyse unter NAD^+ Verbrauch und in Gegenwart von Phosphat die Dehydrierung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Diphosphoglycerat und NADH bzw. bei der Gluconeogenese und im Calvin-Zyklus die Umkehrreaktion. Allerdings haben Glare (2002) und Brune (2001) herausgefunden, dass GAPDH durchaus auch Funktionen wahrnimmt, die nichts mit der Glykolyse zu tun haben. Normative Funktionen von GAPDH sind u. a. nuklearer RNA-Export, DNA-Replikation, DNA-Reparatur, exocytotische Membranfusionen, cytoskeletale Organisation und Phosphotransferase-Aktivität. Aus pathologischer Sicht ist GAPDH an Apoptose,

neurodegenerativen Prozessen, Prostata-Krebs und viraler Pathogenese beteiligt (Sirover, 1999).

Es gibt mehrere Publikationen, die GAPDH als unpassenden internen Standard ansehen (Zhong und Simons, 1999; Thellin et al., 1999). GAPDH-Konzentrationen variieren signifikant zwischen unterschiedlichen Individuen (Bustin, 2000), während der Schwangerschaft (Cale et al., 1997) und während der Ontogenese (Puissant et al., 1994; Calvo et al., 1997). Insulin stimuliert ebenfalls die GAPDH-Transkription durch multiple *Insulin-responsive-elements* und ihren Promotoren (Alexander et al., 1988; Nasrin et al., 1990). Wachstumshormone (Freyschuss et al., 1994), Vitamin D (Desprez et al., 1992), oxidativer Stress (Suematsu et al., 1996), Hypoxie (Graven et al., 1994; Zhong und Simons 1999), Mangan (Hazell et al., 1999) und der Tumorsuppressor TP53 (Chen et al., 1999) aktivieren alle die Transkription von GAPDH, die auch in Endothelzellen (Rimarachin et al., 1992) und während Apoptose (Ishitani et al., 1997) induziert werden kann. Weiterhin konnte eine Hochregulation von GAPDH auch während Tumorstadium beobachtet werden: zum Beispiel in Hepatomen bei Ratten (Chang et al., 1998), malignen Mäuse-Zelllinien (Aguilera et al., 1994) und humanen Prostata-Krebs (Ripple und Wilding, 1995). Durch Nahrungsentzug findet allerdings eine Herunterregulierung der GAPDH Transkription in den Adipocytten und im Darm statt (Barroso et al., 1999).

Thellin et al. (1999) untersuchten Gesamt-RNA-Extraktionen vom Cerebellum, Cortex, Hirnstamm und subcorticalen Strukturen von Wistar-Ratten. Aufgrund ihrer Resultate sehen sie den Einsatz von GAPDH als *housekeeping gene* für die Untersuchung von Nervenzellen als geeignet an.

II. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, durch die Kombination von verhaltensbiologischen und molekularbiologischen Arbeitstechniken neue Erkenntnisse über zelluläre Grundlagen von Lernen und Gedächtnis zu erlangen.

Es sollte daher der zeitliche Verlauf von lerninduzierten Veränderungen in der Expression ausgewählter Zelladhäsionsmoleküle (CHL1, L1, TN-R, NCAM, NCAM180) an C57BL/6J-Mäusen untersucht werden. Die bisherigen Veröffentlichungen zu diesem Thema beschreiben größtenteils den Einfluss von Zelladhäsionsmolekülen auf Proteinebene. Dafür wurden den Tieren meist Antikörper, die an die Zelladhäsionsmoleküle binden, injiziert. Es handelt sich hierbei um eine sehr invasive Methode, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch die Applikation und das *Handling* der Tiere eine Beeinflussung des Verhaltens hervorgerufen wird. In dieser Arbeit sollten die Veränderungen in der Expression der entsprechenden Moleküle mittels Real-Time-PCR zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Lernereignis auf RNA-Ebene untersucht werden. Dazu sollte die Expressionsstärke der entsprechenden Moleküle durch Quantifizierung der jeweiligen RNA ermittelt werden. Die RNA wurde vom Hippocampus isoliert, einer Hirnregion, die als Modellregion für die Untersuchung zellulärer Grundlagen von Lern- und Gedächtnisleistungen bei Säugetieren einschließlich des Menschen gilt. Der Versuchsansatz erforderte es, dass ein Verhaltenstest etabliert wurde, bei dem der Zeitraum des Lernereignisses eng begrenzt ist und der die Hippocampusformation mit einbezieht. Außerdem sollte das Verhalten gentechnisch veränderter Mäuse untersucht werden, die in der AG Schachner vorhanden sind. Diese Tiere synthetisieren bestimmte Zelladhäsionsmoleküle entweder überhaupt nicht oder aber in verstärktem Maße.

2.1 Verhaltenstest

Als Lerntest wurde der *Step-Down-Avoidance-Test* (SDA) verwendet. Eine Standardisierung des *Step-Down-Avoidance-Tests* liegt nicht vor. Daher mussten sowohl die Größe der Plattform, als auch die Stromstärke und Dauer des verabreichten Schocks durch Vorversuche etabliert werden. Auch die Versuchsdurchführung musste an die Spezies Maus angepasst werden, da dieser Test im Allgemeinen mit Ratten durchgeführt wird. Um herauszufinden, ob es zeitliche Unterschiede in der Expression auf RNA-Ebene gibt, mussten zum einen Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiedergetestet werden, zum anderen mussten auch entsprechende Kontrollgruppen gefunden werden, damit die eventuell veränderte Expression explizit auf das Lernereignis des Tests zurückzuführen war.

Diese Arbeit sollte daher auch einen Beitrag leisten, mehr über Faktoren, die das Verhalten der Mäuse in diesem Test beeinflussen können, zu erfahren, um eine bessere

Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen. Daher wurde auch das Verhalten der Mäuse auf Video aufgenommen und ausgewertet. Es liegen über das Verhalten von Mäusen in diesem Test bisher keine Veröffentlichungen vor.

2.2 Molekularbiologische Tests

Für die RNA-Extraktion wurde ein Hippocampus eines jeden Tieres verwendet, das vorher den SDA-Test durchlaufen hatte.

Die RNA-Extraktion fand mit Hilfe eines RNA-Extraktions-Kits der Firma Qiagen statt, der eigens für die Gewinnung von RNA aus tierischem Gewebe entwickelt wurde. Nach der Extraktion wurde die RNA revers transkribiert. Die in der Reversen Transkription gewonnene cDNA wurde dann mittels Real-Time-PCR (Light Cycler, Roche) für alle zu untersuchenden Gene quantifiziert.

Die Etablierung und Kalibrierung der PCR wurde von Herrn Dr. Thomas Laue, Fa. Artus GmbH, Hamburg im Auftrag der AG Schachner, Zentrum für molekulare Neurobiologie in Hamburg, durchgeführt.

III. Tiere, Materialien und Methoden

Im Folgenden werden allgemeine Angaben zu den eingesetzten Tieren, Materialien und den angewandten Methoden gemacht. Die Tierversuche wurden von der Freien und Hansestadt Hamburg, Behörde für Umwelt und Gesundheit, genehmigt (Antragsnummer: 33/98).

3.1 Tiere

3.1.1 Inzuchtstamm C57BL/6J

Als Versuchstiere dienten experimentell naive männliche Mäuse (*Mus musculus*, L.) des Stammes C57BL/6J, der seit ca. 20 Jahren in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet wurde. Eine Sublinienbezeichnung wurde von dem zuständigen Institut nicht eingeführt. In den Räumen der Tierhaltung wurden die Tiere unter SPF (spezifiziert-pathogen-frei)-Bedingungen hinter einer Trockenbarriere gehalten. Der Hygienestatus der Tiere wird in einem dreimonatigen Abstand überwacht.

Nach Anlieferung hatten die Tiere mindestens zwei Wochen Zeit, sich zu adaptieren, bevor sie in den Versuch genommen wurden (Koop et al., 2000). Sie waren zum Testzeitpunkt jeweils 3-5 Monate alt und wogen 30-40g. Die Mäuse wurden nach der Ankunft vereinzelt und in Standardkäfigen des Typs II (267mm Länge, 207mm Breite und 140mm Höhe) untergebracht.

3.1.2 Haltung

Die Haltung erfolgte in einem dem Verhaltenslabor angegliederten Tierraum unter Standardbedingungen (Temperatur $22 \pm 2^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $60 \pm 3\%$, freier Zugang zu Futter und Wasser, inverser Hell-Dunkel-Zyklus (12:12), wobei das Licht um 7:00 Uhr ausgeschaltet wurde) unter konventionellen Bedingungen, ebenfalls mit einer Überwachung des Hygienestatus' in einem dreimonatigen Abstand. Während der Hellphase hat die Beleuchtung eine Intensität von 40-100Lux, gemessen in unmittelbarer Nähe der Käfige. Das Futter wurde ad libitum verabreicht und bestand aus einer pelletierten Standarddiät für Ratten und Mäuse der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH in Soest (siehe Anhang).

Getränkt wurden die Tiere mit unbehandeltem Leitungswasser, das ihnen aus Kunststoffflaschen mit Nippelkappen zur freien Verfügung gestellt wurde.

Das Wechseln der Käfigestreue erfolgte einmal wöchentlich, ebenso die Erneuerung der Wasserflaschen und des Futters, jedoch nie während der Tests oder im Zeitraum $\pm 24\text{h}$.

Die Einstreu wurde von der Fa. Tapvei (siehe Anhang) bezogen. Zusätzlich bekamen die Tiere Nistmaterial in Form von Zellstoff.

3.2. Verhaltenstest

Da der zeitliche Verlauf von lerninduzierten Veränderungen in der Expression von Zelladhäsionsmolekülen untersucht werden sollte, musste ein Verhaltenstest etabliert werden, bei dem der Zeitraum des Lernereignisses eng begrenzt ist und der die Hippocampusformation mit einbezieht.

3.2.1 *Step-Down-Avoidance Test (SDA)*

Da der SDA ursprünglich für Ratten etabliert wurde, mussten sowohl die Größe der Plattform, als auch die Stromstärke und Dauer des verabreichten Schocks durch Vorversuche ermittelt werden. Auch die Versuchsdurchführung musste an die Spezies Maus angepasst werden.

Um herauszufinden, ob es zeitliche Unterschiede in der Expression auf RNA-Ebene gab, wurden zum einen Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten wieder getestet, zum anderen mussten auch entsprechende Kontrollgruppen gefunden werden, damit die eventuell veränderte Expression explizit auf das Lernereignis des Tests zurückzuführen war. Es wurde daher jeweils eine Gruppe von Tieren nach 1h, 3h, 4½h, 6h, 9h, 12h, 24h und 72h nach Erhalten des Schocks wieder getestet.

Bei dem Zeitabstand 12h konnte ein Überschneiden der Hell- und Dunkelphasen während des Testens nicht vermieden werden.

Um einen Einfluss der Lichtphasen auf das Verhalten zu messen, wurde eine Gruppe (12h b) von Tieren während der Hellphase geschockt und während der Dunkelphase wieder getestet. Eine andere Gruppe (12h a) von Tieren wurde während der Dunkelphase geschockt und während der Hellphase wieder getestet.

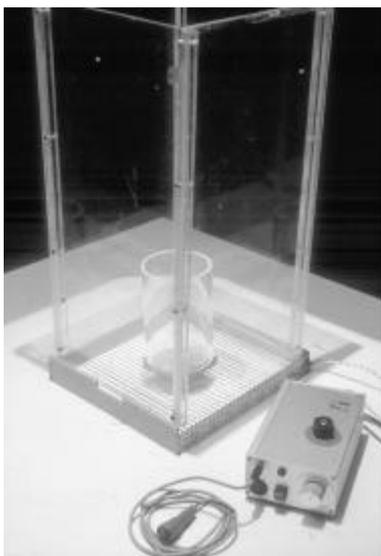


Foto 1 SDA-Apparatur

Der SDA wurde bei einer Lichtintensität von 25Lux durchgeführt. Die Versuchsapparatur ist wie folgt aufgebaut: Sie besteht aus einem Gitter, das kontrolliert unter Strom gesetzt werden kann. Die Abstände zwischen den Edelmetallstangen des Gitters betragen 6,3mm. Die Gitterstäbe haben einen Durchmesser von 2mm und können von den Mäusepfoten gut umklammert werden. Das Gitter ist von einer ca. 80cm hohen Plexiglaswand umgeben, um ein Entweichen der Tiere zu verhindern (Foto 1). Das Gerät zum unter Strom setzen des Gitters wurde in der Technikwerkstatt des Zentrums für molekulare Neurobiologie in Hamburg (ZMNH) von Herrn Fritz Kutschera gebaut. Es handelt sich hierbei um ein

Mikroprozessor-gesteuertes Gerät, das einen zeitgesteuerten Strompuls aus einer Wechselspannungsquelle, begrenzt durch einen Vorwiderstand, erzeugt. Die Kontrolle des resultierenden Stroms erfolgt mit Hilfe eines analogen Messwandlers. Der tatsächlich geflossene Strom wird im Gerät auf einem LC- Display dargestellt.

Auf dem oben beschriebenen Gitter befand sich eine quadratische Plattform (1,3cm hoch, 11cm Kantenlänge). Sie ist mit einer rauhen rutschsicheren und leicht zu reinigenden Kunststoffoberfläche beschichtet. Die Maße und Eigenschaften basieren auf Erfahrungswerten, die in Vorversuchen ermittelt wurden.

Der SDA wurde in zwei Versuchsdurchgängen durchgeführt (Abbildung 10). Beim ersten Durchgang wurde die Maus auf die Plattform gesetzt. Um ein vorzeitiges Betreten der Plattform zu verhindern, wurde die Maus in einen Zylinder gesetzt, der sich auf der Plattform befand. Nach einer Habituationszeit von 60s wurde der Zylinder entfernt und die Zeit gemessen, bis das Tier mit allen vier Pfoten das Gitter betrat.

Sofort danach erhielt die Maus einen leichten Stromstoß von 0.5mA bei 220V. Im zweiten Durchgang wurde die Maus wieder in den Zylinder gesetzt. Nach der gleichen Habituationszeit wurde jetzt die Zeit gemessen, bis das Tier das Gitter wieder betrat. Eine Latenzzeit von länger als 50sec wurde als Lernverhalten gewertet. Falls die Maus nach einem Zeitraum von 5min nicht herunter trat, wurde der Test abgebrochen. Sofort nach dem Wiedertesten wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und die Hippocampi präpariert (siehe 3.3). Die Proben wurden bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung tiefgefroren, wobei jeder Hippocampus einzeln aufbewahrt wurde.

Vorversuche zeigten, dass die Mäuse ein besseres Lernverhalten zeigen, wenn der Zylinder, der aus klarem Plexiglas besteht, im ersten Testdurchgang umwickelt war. Die Umgebung außerhalb des Zylinders konnte so von den Tieren nicht beobachtet werden.

Im zweiten Testdurchgang wurde die Umwicklung, die aus einer abwaschbaren dünnen Plastikfolie besteht, entfernt, so dass die Tiere während der Habituation ihre Umgebung sehen konnten.

Nach jedem Tier, das getestet wurde, wurde das Gitter, die Plattform und der Zylinder zuerst mit einer Seifenlösung (Schmierseife), dann mit Wasser und anschließend mit 90%igem Ethanol gereinigt. Nach einem Zeitraum von 10min wurde das nächste Tier getestet. So konnte davon ausgegangen werden, dass das Ethanol vollständig verdunstet war und wahrscheinlich keine Geruchsbeeinträchtigung mehr für die Mäuse bestand.

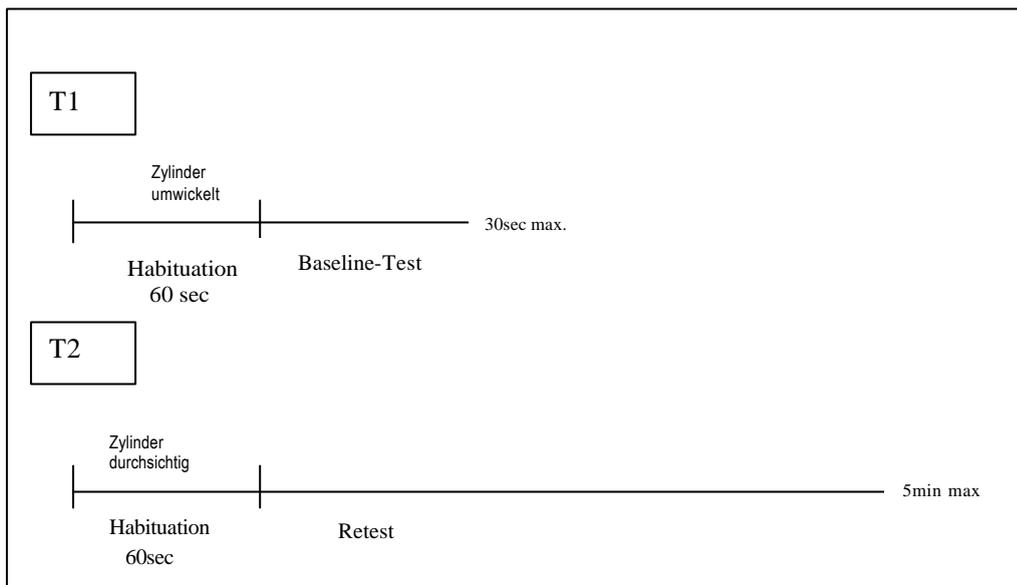


Abbildung 10 Protokoll des Step-Down-Avoidance-Tests

3.2.2 Kontrollgruppen

Es wurden zusätzlich zwei weitere Gruppen von Mäusen getestet, die als Kontrollen dienen. Eine Gruppe von Mäusen wurde nicht geschockt, das Versuchsprotokoll ansonsten aber genauso angewendet. Die andere Gruppe wurde erst eine Minute nach Verlassen der Plattform geschockt. Damit wurden die Tiere ebenfalls der Stress-Situation, die ein Fußschock verursacht, ausgesetzt, aber die Tiere sollten den Schock nicht mit dem Heruntertreten von der Plattform assoziieren. Durch diese Kontrollgruppen sollte eine eventuell veränderte Expression der Zelladhäsionsmoleküle explizit auf das Lernereignis des Tests zurückgeführt werden (Abbildung 11).

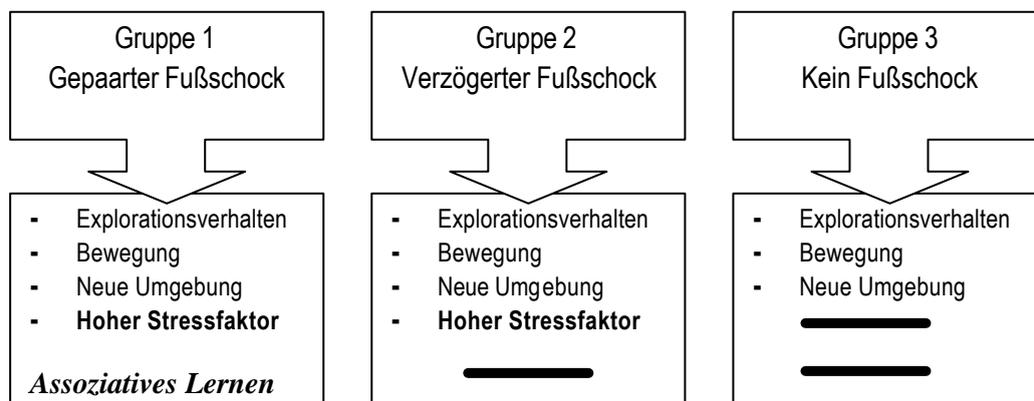


Abbildung 11 Auswahl der Kontrollgruppen

Tabelle 1 Versuchsplan, Anzahl der Tiere

Gruppe	Zeitpunkt <i>Retest</i>								
	1h	3h	4,5h	6h	9h	12h a	12h b	24h	72h
1 ; gepaarter Fußschock	22	12	13	12	14	12	13	13	12
2 ; verzögerter Fußschock	17	17	14	11	11	12	11	12	10
3 ; kein Fußschock	14	15	12	9	11	12	10	13	10

3.2.3 Verhaltensanalyse im *Step-Down-Avoidance*

Mit Hilfe einer Videokamera (Fa. Panasonic, S-VHS-C) wurden alle Versuche auf Video (Fa. Panasonic, S-VHS) aufgezeichnet. Nach Beendigung aller Verhaltensversuche wurden diese angesehen und protokolliert. Dabei wurden der erste Testdurchlauf (*Baseline*), das wiederholte Testen der Tiere (*Retest*) und die Habituationszeit beim Wiedertesten, analysiert. Die Habituationszeit des ersten Testdurchlaufs konnte nicht ausgewertet werden, weil zu diesem Testzeitpunkt das Tier wegen des umwickelten Zylinders nicht sichtbar war. Da keine Literaturangaben zur Verhaltensauswertung in diesem Test vorliegen, wurde eine eigenständige Beurteilung vorgenommen.

Es wurden verschiedene Verhaltensweisen, unterteilt in neutrales Verhalten, Explorationsverhalten und Angst- bzw. Konfliktverhalten, ausgewertet:

a) Neutrales Verhalten, Explorationsverhalten

- Sich - Selbst - Putzen (*Self-Grooming*)

Das Tier stellt sich auf die Hinterbeine, putzt mit den Vorderpfoten und dem Maul den Körper.

Dieses Verhalten wird in diesem Test als neutral bewertet, da es sowohl in der Kontrollgruppe ohne Schock als auch bei Tieren der Lerngruppe mit langer Latenzzeit im *Retest* auftrat.

- Aufrichten (*Rearing*)

Die Maus setzt sich auf die Hinterbeine. Das Verhalten wird im Allgemeinen zum Explorationsverhalten gezählt. Es wurde bei dem hier durchgeführten Test zusätzlich die Unterscheidung getroffen, ob sich das Tier während der Habituationsphase am Zylinder oder frei aufrichtet (Foto 2).

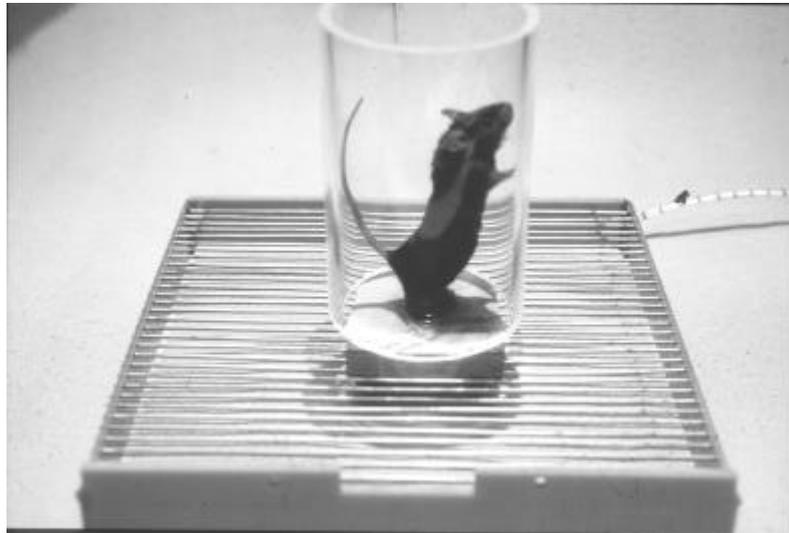


Foto 2 Aufrichten am Zylinder

- Vorwärts / Rückwärts von der Plattform heruntertreten (*Go down forward /backward*)

Es wurde sowohl bei der *Baseline* als auch während des *Retests* das Heruntertreten der Maus von der Plattform protokolliert. Dabei wurde unterschieden, ob die Maus die Plattform rückwärts oder vorwärts verlassen hat (Foto 3).

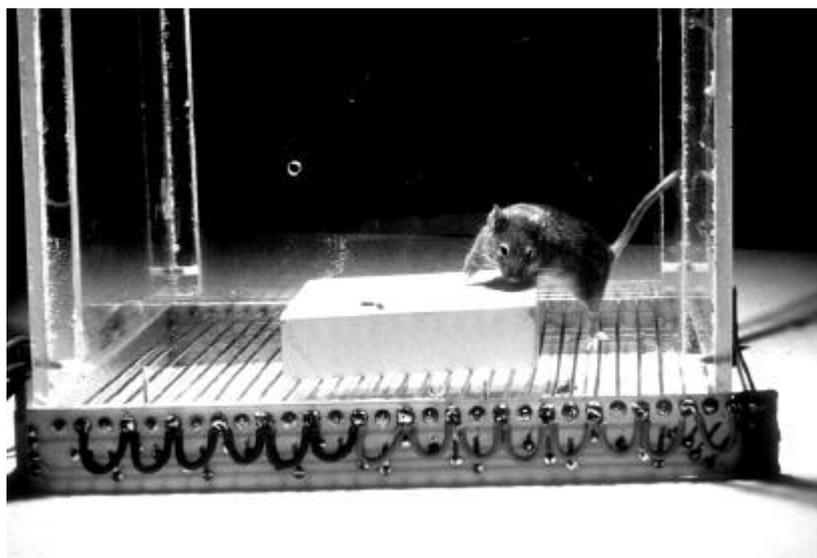


Foto 3 Rückwärts heruntertreten

- Ruhen (*Resting*)

Die Maus ist bewegungslos, zeigt allerdings nicht die Anspannung, die beim *Freezing* zu beobachten ist. Dies ist besonders an der Schwanzhaltung zu sehen (für nähere Beschreibung siehe Anhang, Tang et al. 2001).

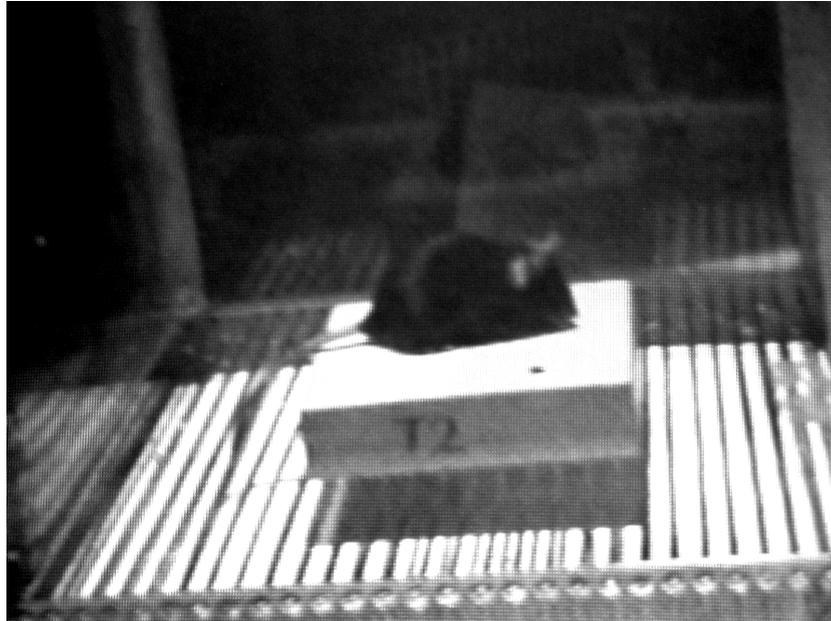


Foto 4 Ruhen (*Resting*)

- Plattform wieder betreten / nicht wieder betreten (*Re-enter platform or not*)

Dieser Parameter wurde nur in der Gruppe mit dem verzögerten Schock untersucht, da das betreffende Verhalten aufgrund des Versuchsprotokolls nur in dieser Gruppe auftreten konnte (siehe 3.2.2). In dieser Gruppe haben die Tiere erst 60sec nach Heruntertreten von der Plattform einen Fußschock erhalten. Während dieser 60sec, zwischen Heruntertreten und Schockgabe, zeigten die Tiere im Allgemeinen Explorationsverhalten. Dabei kam es bei einigen Tieren vor, dass sie die Plattform erneut betraten. Die Zeit bis zur Schockgabe wurde dann erneut gestoppt. Hat ein Tier mehr als zweimal die Plattform wieder betreten, wurde es ausgeschlossen.

b) Angst- bzw. Konfliktverhalten

- Schwanzschütteln (*Tail Rattling*)

Darunter versteht man ein schnelles Hin- und Herbewegen des Schwanzes. Dieses Verhalten zeigen die Mäuse in Konfliktsituationen. Es kann sowohl bei sozialen Interaktionen, besonders zwischen männlichen Tieren, als auch in verschiedenen Verhaltenstests beobachtet werden (z.B. Angst-Konditionierung; *Fear Conditioning*). C57BL/6 Mäuse zeigen dieses Verhalten besonders häufig (Festing, 1969).

- Risiko-Verhalten (*Risk Assessment*)

Die Maus deutet an, sich in eine bestimmte Richtung zu bewegen, führt diese Bewegung aber nicht bis zu Ende durch. In diesem Fall ist damit die vermeintliche Absicht gemeint, von der Plattform herunterzutreten, sie aber höchstens mit den Vibrissen zu berühren und den Kopf dann wieder zurückzuziehen (Foto 5). Dieses Verhalten kann auch oft im Erhöhten-Plus-Labyrinth-Test (*Elevated-Plus-Maze*) beobachtet werden, bei dem das Tier von einer mit Wänden umgebenen erhöhten Fläche, auf eine freie, etwa einen Meter über dem Boden liegende Fläche gehen kann.

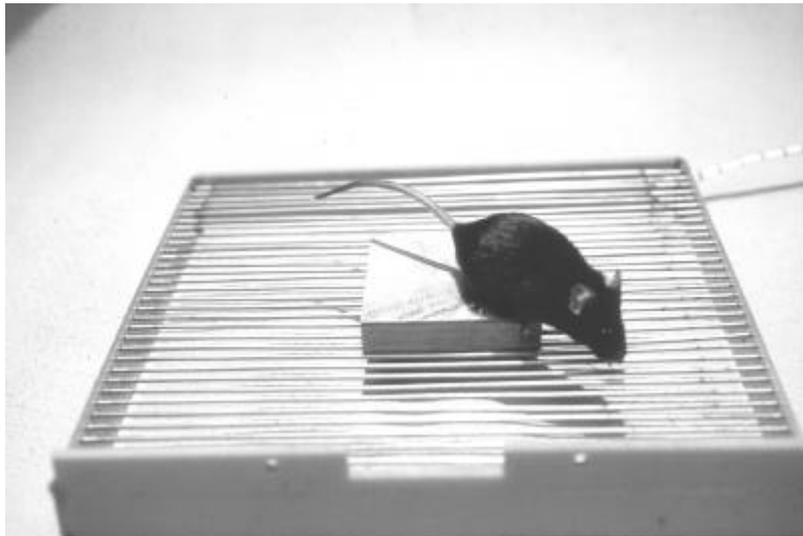


Foto 5 Risiko-Verhalten

- Vorder- bzw. Hinterpfoten auf dem Gitter (*Front paws / back paws on the grid*)

Dieses Verhalten stellt im Prinzip eine Steigerung des *risk assessments* dar. Das Tier berührt nicht nur mit den Vibrissen das Gitter, sondern auch mit den Vorder- bzw. Hinterpfoten, ohne jedoch die Plattform ganz zu verlassen (Foto 6).

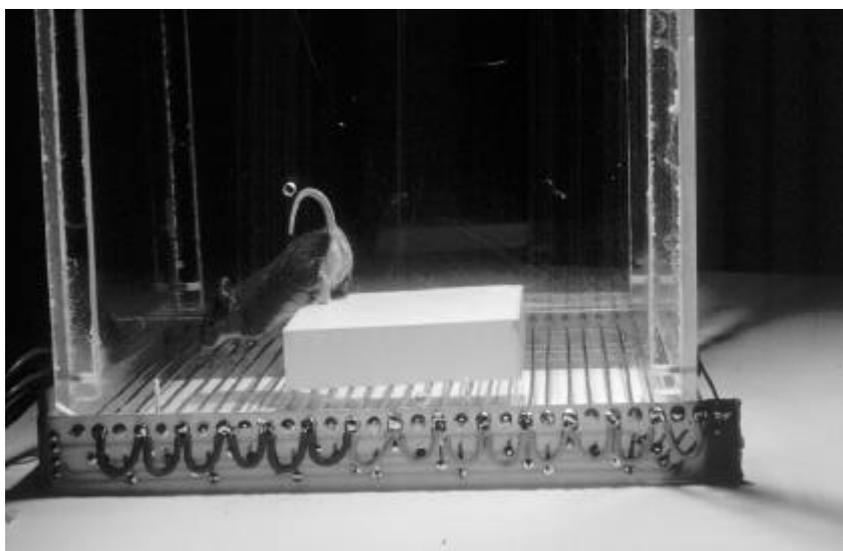


Foto 6 Vorderpfoten auf dem Gitter

- Erstarren (*freezing*)

Das Tier nimmt eine starre Körperhaltung ein und ist völlig bewegungslos und angespannt (für nähere Beschreibung siehe Anhang, Tang et al., 2001)(Foto 7).

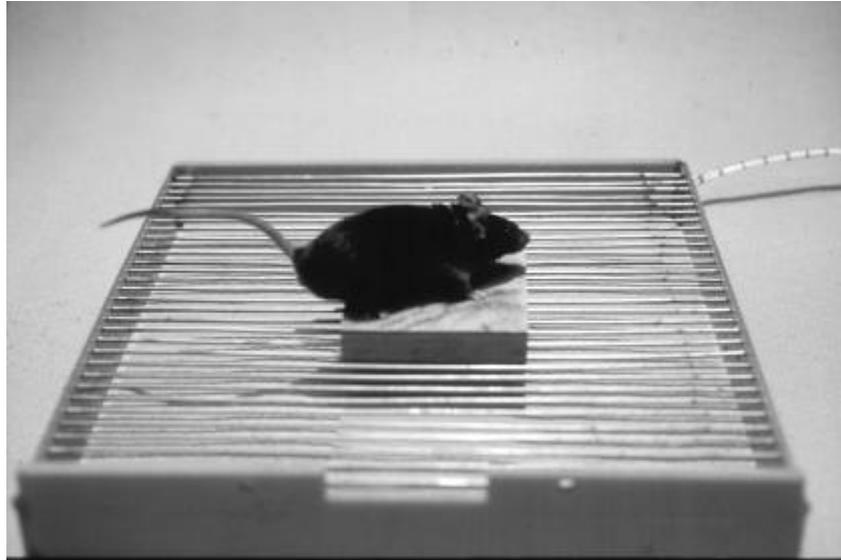


Foto 7 Freezing

- Vermeiden, die Plattform zu berühren (*Avoid to contact the platform*)

Einige Tiere stellten sich während der Habituationsphase auf die Vorderpfoten. Mit dem gesamten Körper lehnten sie gegen die Zylinderwand. Sie erweckten so den Eindruck, dass sie die Plattform nicht berühren wollten (Foto 8).

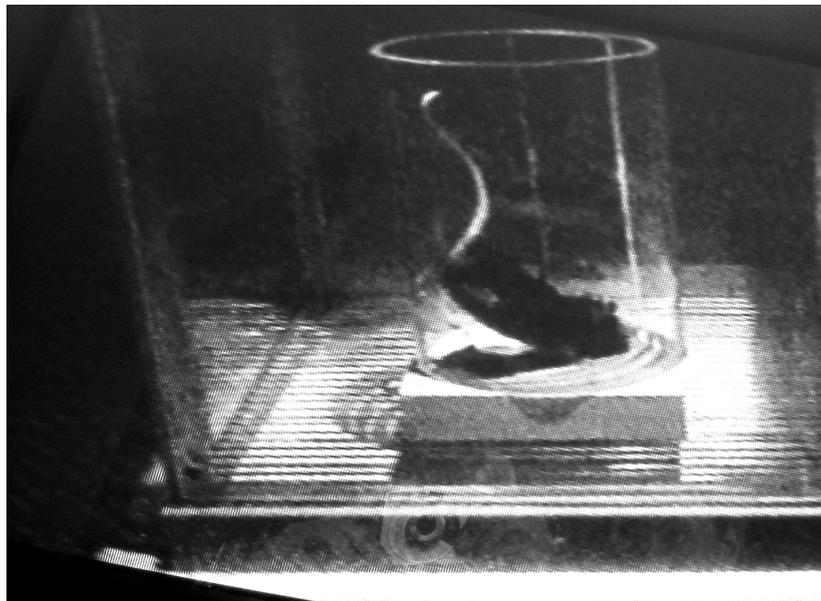


Foto 8 Vermeiden, die Plattform zu berühren

3.2.4 Statistische Auswertung des *Step-Down-Avoidance-Tests*

Die erstellten Rohdaten der beobachteten Verhaltensparameter wurden mit dem SPSS-Programm für Windows, Version 11, ausgewertet. Folgende statistische Verfahren wurden angewendet, bei denen jeweils folgende Signifikanzniveaus unterschieden wurden: $p < 0,001$, hoch signifikant, ***; $p < 0,01$ signifikant, **; $p < 0,05$ schwach signifikant, *; $p < 0,05$ nicht signifikant, ns;

- Korrelationsanalyse nach Pearson

Es handelt sich hierbei um einen Test zur Analyse von bivarianten Verteilungen.

Hier wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen langer bzw. kurzer Latenzzeit und den beobachteten Verhaltensweisen besteht.

- Einfaktorielle Varianzanalyse (*One-Way ANOVA*)

Die Varianzanalyse (ANOVA) beruht auf der Zerlegung der Gesamtvariabilität von Messdaten in einzelne Komponenten. Es wird untersucht, ob eine unabhängige Variable einen statistisch gesicherten Einfluss auf ein Merkmal besitzt. Dabei wird festgestellt, welcher Anteil der Gesamtvarianz in den Stichproben auf den Einfluss der unabhängigen Variablen zurückgeführt werden kann und welcher Anteil zufällige Variation darstellt. Mit dieser Varianzanalyse wurde untersucht, ob die unterschiedliche Behandlung der Tiere (direkter Schock, verzögerter Schock, kein Schock) einen Einfluss auf die Latenzzeit bei den einzelnen Zeitpunkten des *Retest* hat.

- Kaplan-Meier-Methode und Logranktest

Mit der Kaplan-Meier Methode wurde die Zeit analysiert, bis die Tiere die Plattform verlassen haben.

Die Zeit bis zum Verlassen der Plattform ist die Realisation einer ‚gestutzten‘ (censored) Zufallsvariablen. Die Beobachtung wird nach einer bestimmten Zeit (5 Minuten) abgebrochen, und es kann bei einem Teil der Tiere eventuell nur festgestellt werden, dass sie die Plattform noch nicht verlassen haben. Die Verteilung der Zeiten bis zum Verlassen der Plattform wird für jede Zeit (t) durch den Anteil $S(t)$ der Tiere charakterisiert, die bis zur Zeit (t) noch nicht die Plattform verlassen haben. Zum Test der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde der Logranktest benutzt, der auf einem Vergleich der Tiere, die zu den jeweiligen Zeitpunkten t in den jeweiligen Gruppen die Plattform verlassen hatten, zur Zahl der Tiere, die ohne Berücksichtigung der Gruppe zu dieser Zeit zu erwarten waren, beruht.

- Mann-Whitney-U-Test

Der Mann-Whitney-U-Test ist ein nicht parametrisches Verfahren, das untersucht, ob sich die Mediane von zwei unabhängigen Stichproben signifikant unterscheiden. Die Daten müssen ordinalskaliert sein. Bei den vorliegenden Ergebnissen wurden mit Hilfe dieses Tests die Gruppen 1 und 2 für alle Zeitpunkte untersucht. Die Gruppe 2 wurde bei diesem Test unterteilt in ‚Plattform vor Schockgabe betreten‘ und ‚Plattform vor Schockgabe nicht betreten‘.

3.3. Gehirnpräparation

Die Tiere wurden sofort nach dem *Retest* im SDA durch zervikale Dislokation getötet. Danach wurde das Gehirn frei präpariert und auf eine mit sterilem Filterpapier bedeckte Petrischale, die auf Eis stand, gelegt. Das Filterpapier wurde mit sterilem PBS, pH 7,4 angefeuchtet. Es wurden nun die Hippocampi herauspräpariert und getrennt in sterilen und RNase-freien Eppendorf-Gefäßen mit einem Volumen von 1,5ml zuerst in flüssigem Stickstoff und nach Ende des Versuchs bei -80°C tiefgefroren.

3.4. RNA- Extraktion

Die RNA wurde mit einem Kit der Fa. Qiagen (RNeasy Mini) extrahiert, deren Versuchsvorschrift auf Vorschlag von Dr. Thomas Laue, Fa. Artus GmbH, Hamburg, abgewandelt wurde.

Es wurden zusätzlich ein DNA-abbauender Schritt, um eine Verunreinigung durch genomische DNA zu vermeiden, und eine weitere Zentrifugation vor der Elution der RNA, um Ethanol vollständig zu entfernen, durchgeführt. Ansonsten wurde das vorgegebene Protokoll eingehalten.

In einem ersten Schritt wurde das Gewebe homogenisiert. Hierzu wurde ein Polytron-Homogenisator der Fa. Kinematica, Littau, Schweiz, mit einem Aufsatz für ein Volumen bis 5ml verwendet.

Sofort nach dem Entnehmen der Proben aus dem Gefrierschrank wurden sie mit 600µl Lysispuffer „RLT“ versetzt und auf Eis gehalten. Der Puffer enthält Guanidin-Isocyanat und β-Mercaptoethanol, wodurch RNAsen sofort inaktiviert werden. Die Proben wurden dann nacheinander für jeweils 3min mit dem Homogenisator auf höchster Stufe bearbeitet. Danach wurden die Lysate bei 15.800g in einer Tischzentrifuge für drei Minuten zentrifugiert. Bei allen weiteren Schritten wurde nur der Überstand verwendet.

Dieser wurde nach dem Zentrifugieren mit 600µl Ethanol (70%) versetzt. Das 70%ige Ethanol wurde durch Verdünnen von 98% Ethanol mit DEPC-Wasser hergestellt.

Nach dem Zusetzen des Ethanol und vorsichtigem Durchmischen mittels einer Pipette fiel die RNA aus. Die trübe Lösung wurde nun auf Säulen mit einer Silica-Gel-Membran pipettiert und erneut zentrifugiert. Danach wurde auf jede Säule DNase I (0,2U/ μ l, Fa. Roche) in DNase-Inkubationspuffer pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 15min bei Raumtemperatur. Beim weiteren Vorgehen wurde die Versuchsvorschrift der Fa. Qiagen eingehalten. Nachdem die RNA in 100 μ l DEPC-Wasser gelöst war, wurde die Konzentration photometrisch bestimmt. Danach wurde die RNA aliquotiert und bis zur Reversen Transkription bei -80°C tiefgefroren.

3.4.1 Aufreinigung der RNA

In einem Fall waren die RNA-Proben nach der photometrischen Bestimmung, vermutlich mit Guanidin-Isothiocyanat, verunreinigt. Daher musste bei diesen Proben eine zusätzliche Aufreinigung durchgeführt werden.

Dazu wurden zu 100 μ l RNA-Extrakt jeweils 100 μ l 4M Ammoniumacetat und 600 μ l Ethanol abs. gegeben. Dieses Gemisch wurde für 1½ h auf Eis gehalten und dann auf Raumtemperatur aufgewärmt. Danach wurden die Proben 20min lang bei 20°C und 10.000g zentrifugiert. Die gebildeten Pellets wurden in je 700 μ l 70% Ethanol aufgenommen und abermals, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet, waagrecht liegend, an der Luft getrocknet. Die RNA wurde dann in 50 μ l DEPC-Wasser aufgenommen und durch Inkubation bei 60°C (15min) gelöst. Danach wurde die RNA erneut photometrisch bestimmt und die aufgereinigte RNA auf ein Gel aufgetragen (siehe Anhang).

3.4.2 Extraktion von RNA aus Gesamthirn

Für die weitere Analyse der Proben musste auch RNA aus Gesamthirn extrahiert werden. Sie diente zur Erstellung der Standardkurven für die *Light-Cycler*-Untersuchung (siehe 3.7.1). Im Prinzip wurde die RNA aus Gesamthirn genau wie die Hippocampus-RNA extrahiert. Die Homogenisation wurde allerdings im Falcon-Röhrchen (50ml) durchgeführt, da die Gewebemasse höher war und dadurch auch eine größere Menge Lysispuffer zugesetzt werden musste. Das Homogenisat wurde dann zu 600 μ l in Eppendorf-Gefäße (1,5ml) aliquotiert. Der weitere Isolierungsgang ist unter 3.4 beschrieben.

3.5. Reverse Transkription

Da RNA-Moleküle durch ubiquitär vorkommende RNAsen schnell abgebaut werden und zudem aufgrund ihrer OH-Gruppen leicht degradierbar sind, werden sie in molekularbiologischen Untersuchungen häufig durch cDNA-Sequenzen ersetzt. Mit Hilfe der

Reversen Transkription können RNA-Sequenzen in DNA-Sequenzen umgeschrieben werden. Die entstehenden DNA-Kopien sind komplementär zur Ausgangs-RNA und werden als *complementary*DNA, copy-DNA oder cDNA bezeichnet.

Um mit der Synthese beginnen zu können, benötigt die Reverse Transkriptase ein Stück doppelsträngige Nukleinsäure. Die Reaktionsgemische enthalten daher Zufallsexamere (*random hexamers*). Dabei handelt es sich um ein Gemisch einzelsträngiger Hexanucleotide. Jede mögliche Sechs-Basen-Sequenz ist in diesem Gemisch in gleicher Menge enthalten. Die Hexanucleotide hybridisieren mit komplementären mRNA-Sequenzen und bilden so die Startpunkte für die cDNA-Synthese. Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der Verwendung von oligo(dT)-Primern besteht darin, dass die so synthetisierte cDNA 5'-und 3'-terminale Bereiche der mRNA zu gleichen Teilen repräsentiert. Pro Reaktionsansatz wurden 50ng Gesamt-RNA-Extrakt (~5µl) und 4µl rHexa-Primer (20pMol/µl) mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20µl aufgefüllt, zur Denaturierung 5min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt.

Pro Ansatz wurden 12µl 5x Erststrang-Puffer (GIBCO-BRL), 6µl 0,1M DTT (GIBCO BRL) sowie 2µl 5mM dNTP-Mix (5mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP) hinzugefügt. Die Proben wurden durch Pipettieren gemischt und anschließend mit je 2µl SuperScript II Reverse Transkriptase (200U/µl; GIBCO BRL) versetzt. Danach wurden die Proben für 10min bei Raumtemperatur gehalten, um die Bildung stabiler Primer-mRNA-Hybride zu ermöglichen. Im Wasserbad bei 37°C wurde dann die Reverse Transkription gestartet. Nach 45min wurde die Reaktion durch 10minütige Denaturierung des Enzyms bei 65°C gestoppt und die Ansätze bei -20°C eingefroren.

3.5.1 cDNA von naiven Tieren und Gesamthirn-cDNA

Als sogenannte Kalibratoren in der Real-Time-PCR-Analyse (siehe 3.7) dienen naive C57BL/6J Mäuse. Diese Tiere verbrachten die Adaptionsphase von zwei Wochen im Tierraum parallel mit den anderen Tieren. Sie wurden zum Testzeitpunkt der anderen Tiere getötet und die Hippocampi präpariert. Die extrahierte RNA wurde revers transkribiert. Die Aliquots der cDNA wurden mittels konventioneller PCR vervielfältigt und die Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Danach wurden alle positiven Proben vereinigt, gut durchmischt, erneut aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren. Dadurch wurde sichergestellt, dass jedes Aliquot die gleiche Menge cDNA enthält, und auch Real-Time-PCR's, die an verschiedenen Tagen durchgeführt werden, miteinander verglichen werden können. Genauso wurde auch mit der cDNA aus Gesamthirn verfahren. Aus dieser cDNA wurde für jede Real-Time-PCR die Kalibrierungsgerade erstellt.

3.6 Polymerase-Kettenreaktion, Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR ermöglicht die gezielte Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente, ohne die Verwendung von Restriktionsenzymen, Vektoren oder Wirtszellen. Man benötigt zwei Oligonucleotide (Primer), die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisieren. Außerdem sind die vier Desoxynucleosidtriphosphate und eine wärmebeständige DNA-Polymerase notwendig.

Zunächst wird der Doppelstrang durch Erhitzen in Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Dann erfolgt unter Abkühlung die Hybridisierung der *Primer* (*Annealing*). Von diesen ausgehend werden nun in beide Richtungen komplementäre DNA-Stränge neu synthetisiert (*Elongation*). Dieser Zyklus wird mit derselben Reaktionsmischung 20-30mal wiederholt. Schon nach dem dritten Zyklus bilden sich Doppelstränge, deren Länge dem Abstand der Primer entspricht. Ihr Anteil erhöht sich mit jedem Zyklus etwa auf das Doppelte, bis schließlich fast alle der neu synthetisierten Abschnitte die richtige Länge haben. Die PCR zur Überprüfung der cDNA (siehe 3.6.1) wurde nach dem PCR-Programm von Dr. Thomas Tilling, ZMNH, durchgeführt (siehe Anhang). Es wurden Primer für das Gen NCAM (Sequenzen siehe Anhang) verwendet.

3.6.1 Echt-Zeit-PCR, *Real-Time PCR*

Die *Real-Time PCR* ist eine Methode zur Analyse von PCR-Produkten während der Amplifikation. Die einzelnen Messwerte und Ergebnisse werden also bereits dargestellt, während die Nukleinsäureamplifikation stattfindet. Eine weitere Bearbeitung der Proben im Anschluss an die Amplifikation ist nicht erforderlich (z.B. Gelelektrophorese). Durch die Messung der entstehenden PCR-Produkte in jedem einzelnen Zyklus ist ihre genaue Quantifizierung in einem einzigen Reaktionsgefäß möglich. Das Detektionsprinzip der *Real-Time-PCR* ist eine Fluoreszenzmessung. Dem PCR-Ansatz werden vor dem Reaktionsstart Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenz-markierte Sonden zugesetzt. Die Fluoreszenz wird bei jedem Zyklus detektiert und graphisch mittels der Computersoftware auf einem Monitor dargestellt. Auf diese Weise kann man erkennen, wann sich die PCR im Bereich der exponentiellen Amplifikation befindet, da nur in diesem Bereich die PCR-Produktmenge mit der cDNA-Ausgangsmenge korreliert. Nur in diesem Bereich ist also eine Quantifizierung möglich, nicht jedoch im späteren „Plateau“.

3.7 Light Cycler

Der *Light Cycler* ist ein *Real-Time* PCR-Instrument, das auf dem Prinzip der *Rapid-Cycle-PCR* beruht. Diese *Rapid-Cycle-PCR* erlaubt es, 30 PCR-Cyclen in nur 10-20min durchzuführen. Durch diese schnelle Reaktionsführung verbessert sich auch die Spezifität. Zur schnellen und genauen Kontrolle der Temperatur werden Glaskapillaren mit 10-20µl Reaktionsansätzen als Reaktionsgefäße verwendet. Darüber hinaus ist der Einsatz eines Luftstroms als Temperatur-Transfer-Medium eine wesentliche Voraussetzung für die schnelle Reaktionsführung. Die Glaskapillaren ermöglichen die Fluoreszenzmessungen. Der *Light Cycler* kombiniert das „*Rapid Cycling*“ mit einem Fluoreszenz-Photometer (Fluorimeter), welches die Spitzen der Kapillaren ausleuchtet. Die Kapillaren befinden sich in einem Karussell, das im Gerät rotiert. Durch eine Diode, die blaues Licht emittiert, werden die Moleküle der Sonde angeregt und ebenfalls dazu gebracht zu fluoreszieren (FRET). Diese Fluoreszenz wird von drei verschiedenen Photodioden detektiert und als Zyklusverlauf dargestellt. Die Optimierung der Protokolle, der Versuchsdurchführung und die Auswahl der Sonden- und Primersequenzen (siehe jeweils im Anhang) wurden von Dr. Thomas Laue (Firma Artus GmbH, Hamburg) durchgeführt.

Um die relative mRNA-Menge einer Probe zu bestimmen, wird zuerst eine Standardkurve erstellt. Dazu wurde cDNA aus Gesamthirn synthetisiert (siehe 3.5.1) und in logarithmischen Schritten verdünnt. Den einzelnen Verdünnungen werden entsprechende Werte zugewiesen: 1000; 100; 10 usw. Aus der Korrelation von cDNA-Menge (in „Verdünnungseinheiten“) und Schwellenzykluszahl (c_T -Wert) resultiert eine Standardkurve. Die Bestimmung relativer mRNA-Menge ist möglich, falls eine Standardkurve erstellt werden kann, die einen Korrelationskoeffizienten von ≥ 0.95 aufweist und die c_T -Werte unbekannter Proben im Mehrfachansatz auf dieser Standardkurve liegen.

In diesem Versuchsaufbau wurden durch entsprechende Mehrfachbestimmungen die Standardabweichungen für die einzelnen Messpunkte bestimmt. Um etwaige Verunreinigungen der Versuchsansätze zu erkennen, wurden parallel jeweils Kontrollreaktionen ohne cDNA-*Template* eingesetzt (Negativkontrollen).

Die Fluoreszenzsignale der Hybridisierungssonden werden einmal pro Zyklus gemessen. Die Ergebnisse werden in einer Amplifikationskurve dargestellt, die die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zykluszahl anzeigt.

Die Zykluszahl mit dem maximalen Anstieg ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der eingesetzten Kopienzahl. Dies ermöglicht die genaue Quantifizierung unbekannter Proben im Vergleich mit einer Standardkurve.

3.7.1 Sonden

Zur Untersuchung der Genexpression wurden Hybridisierungs-Sonden (sogenannte *TaqMan*-Sonden) eingesetzt. Sie bestehen aus einem Paar von Oligonukleotiden, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Es wurden Sonden für die mRNA von GAPDH, Tenascin-R, L1, CHL-1, NCAM und NCAM180 eingesetzt. GAPDH diente als Referenzgen (*Housekeeping-Gene*). Es wurde vorausgesetzt, dass es durch die Behandlung und des Lernverhaltens der Tiere nicht reguliert wurde.

Um einen weiteren Normalisierungsfaktor zur Quantifizierung neben GAPDH zu entwickeln, wurde versucht, Cyclophilin ebenfalls zu etablieren. Dieser Versuch ist nicht gelungen, da die Kurvenverläufe des Cyclophilin-Standards nicht linear waren und somit eine relative Quantifizierung nicht möglich ist (persönliche Mitteilung von Dr. Thomas Laue).

3.7.2 Überprüfen des relativen DNA-Gehaltes in den zu quantifizierenden Proben

Alle der Fa. Artus zur Verfügung gestellten Proben zur Etablierung des Experiments wurden einem DNase-Verdau unterzogen. Es wurde von Herrn Dr. T. Laue aber trotzdem eine leichte Kontamination der RNA-Präparation mit genomischer DNA festgestellt. Um zu überprüfen, ob diese DNA-Kontamination die Quantifizierungsversuche verfälschen kann, wurde für diese Vorversuche folgende Vorgehensweise gewählt: Reverse Transkriptions-Reaktionen wurden im Doppelversuch angesetzt, d.h. exakt die gleiche Reaktion wurde einmal mit und einmal ohne Reverse Transkriptase durchgeführt. Gleichzeitig wurden die erhaltenen Ergebnisse mittels einer Standardkurve quantifiziert. So ließ sich feststellen, ob eine DNA-Kontamination die Werte der Quantifizierung beeinflusst. Für alle Proben wurde ein DNA-Gehalt gemessen, der unter 1% (bezogen auf die Menge mRNA) liegt. Die Quantifizierung wird also erst in der Nachkommastelle durch die DNA-Kontamination berührt.

3.7.3 Vorversuche und Auswahl der Proben

Es war durch die Vorversuche des Dr. Thomas Laue bekannt, dass eventuell vorhandene Expressionsunterschiede sehr gering ausfallen können. In einem ersten Ansatz wurden daher jeweils zwei Tiere, die sehr gut gelernt hatten und zwei Tiere der nicht geschockten Kontrollgruppe für die Gene GAPDH, Ten-R, CHL-1, L1, NCAM gesamt und der Isoform NCAM 180 untersucht.

3.7.4 Auswertung der *Light-Cycler*-Daten

Anhand der Standardkurve (siehe 3.7) wurden mit Hilfe der *Light-Cycler-Software* die Konzentrationen der einzelnen mRNAs in den Proben berechnet. Bei der Auswertung mit der Software sind zwei verschiedene Wege möglich. Einerseits kann ein Schnittpunkt mit den Kurven per Hand (*fit point method*) oder andererseits automatisch (*second derivative maximum method*) gelegt werden.

Das Fluoreszenz-Ausgangsniveau variiert von Probe zu Probe, z.B. durch unterschiedlichen cDNA-Gehalt, Pipettierfehler oder Probenaufbereitung. Durch die *fit point method* werden alle Proben auf ein vergleichbares Niveau gesetzt. Dazu wird die Gerade zur Erzeugung des Schnittpunktes (*noise band*) in eine Position gelegt, in der es alle Kurven der Proben schneidet. Der Schnittpunkt sollte dabei im unteren log-linearen Bereich liegen. Das *noise band* dient zur Bestimmung des Korrelationskoeffizienten der Kalibrierungsgeraden. Außerdem werden die Konzentrationen der Proben an diesem Schnittpunkt zur weiteren Auswertung ermittelt.

Danach wird der Befehl „*minimize error*“ ausgeführt. Dadurch wird das *noise band* feinjustiert und in dem per Hand festgelegten Bereich in die optimale Position geschoben.

Die *fit point method* stellt das *noise band* automatisch auf einen Wert der dreifachen Standardabweichung der fünf niedrigsten Fluoreszenz-Werte eines Laufes ein.

Durch die *second derivative maximum method* werden die Schnittpunkte für die einzelnen Proben automatisch festgelegt. Dies wird durch einen Software-Algorithmus erreicht, der die ersten Wendepunkte der Fluoreszenzkurven erkennt. Diese Punkte werden dann als Schnittpunkte festgelegt.

Beide Methoden wurden zur Auswertung der Daten angewendet.

Ob es nun Unterschiede der Expression, abhängig von der Behandlung des Tieres gab, ließ sich dann durch einfache Quotientenbildung berechnen. Zuerst wurde der Quotient aus der Menge der zu untersuchenden mRNAs, dividiert durch die Menge an GAPDH-mRNA, gebildet. GAPDH wurde als sogenanntes *Housekeeping-Gene* verwendet. Es wurde davon ausgegangen, dass die Behandlung der Tiere nicht zu einer Veränderung der GAPDH-mRNA führt. Es wurde dann die cDNA der naiven Tiere als sogenannter Kalibrator eingesetzt. Da diese Mäuse keine Behandlung erfahren hatten, wurde vorausgesetzt, dass es bei ihnen keine lerninduzierten und/oder behandlungsinduzierten Veränderungen der Expression der zu untersuchenden Gene gibt.

Das relative Expressionsniveau in dieser cDNA, also z.B. für NCAM wurde daher gleich 1 gesetzt.

Zuerst wurde der Quotient von GAPDH und z.B. NCAM gebildet, um zu sehen, ob es relative Unterschiede zwischen den mRNA-Expressionen gibt:

$$\frac{\text{Menge}(\text{NCAM} - \text{mRNA})}{\text{Menge}(\text{GAPDH} - \text{mRNA})}$$

Die mRNA-Expressionsunterschiede für die einzelnen Proben wurden dann anhand der cDNA von naiven Tieren relativ zu diesem Quotienten bestimmt.

Beispiel: (Probe: x, mRNA: NCAM) :

$$\frac{\frac{\text{Menge}(\text{NCAM} - \text{mRNA})x}{\text{Menge}(\text{GAPDH} - \text{mRNA})x}}{\frac{\text{Menge}(\text{NCAM} - \text{mRNA})\text{Kalibrator}}{\text{Menge}(\text{GAPDH} - \text{mRNA})\text{Kalibrator}}} = \text{mRNA} - \text{Expression}(\text{NCAM}; x)$$

IV. Ergebnisse

4.1 Latenzzeiten der Gruppen im *Retest* nach allen getesteten Zeitpunkten

4.1.1 Überblick über alle Latenzzeiten im *Retest*

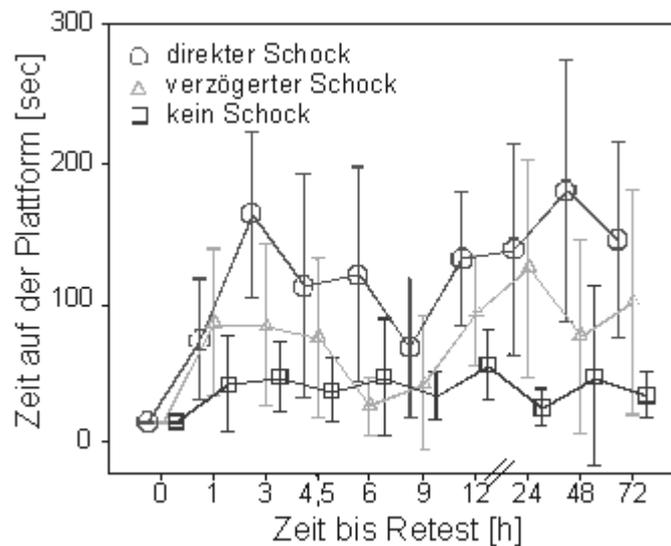


Abbildung 12 Überblick über die Latenzzeiten im *Retest*

In der Abbildung 12 ist die Latenzzeit beim *Retest* für alle Zeitpunkte als Mittelwert mit Fehlerbalken (95% Konfidenzintervall) dargestellt. Bei diesen Tests wurde eine Latenzzeit von mehr als 50sec als Lernverhalten gewertet.

Auf der Abzisse sind die einzelnen Zeitpunkte des *Retest* dargestellt. Auf der Ordinate ist die Latenzzeit, also die Zeit die die Tiere auf der Plattform verbracht haben, aufgetragen. Eine Verbindung der einzelnen Punkte durch eine Linie erfolgte in dieser Darstellung, um die Lage der einzelnen Gruppen zu verdeutlichen. Es ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass die Verbindung der einzelnen Punkte keinen zeitlichen Verlauf darstellt. Es wurden zu jedem Zeitpunkt andere Tiere getestet.

In dieser Darstellung wird bei der Gruppe 2 nicht zwischen ‚Plattform vor Schockgabe betreten‘ und ‚Plattform vor Schockgabe nicht wieder betreten‘ unterschieden. Der Zeitpunkt 12h schließt die Tiere von 12h a und 12h b (siehe unten) ein.

Die Latenzzeit der Gruppe 1 (direkt nach dem Verlassen der Plattform geschockt) liegt fast bei allen Zeitpunkten höher als bei den anderen beiden Gruppen. Allerdings ist nach einer Stunde der Unterschied zwischen den Gruppen nicht sehr groß. Die Latenzzeit der Gruppe 1 liegt zum Zeitpunkt 1h mit der von Gruppe 2 annähernd auf einer Höhe. Insgesamt stellen sich die Mittelwerte der einzelnen Zeitpunkte für die Gruppe 1 sehr einheitlich dar. Eine Ausnahme macht hier jedoch der Zeitpunkt 9h. Zu dieser Zeit liegt die durchschnittliche Latenzzeit der Gruppe 1 unter 100sec, während sie zu den anderen Zeitpunkten ca. bei 100sec

oder darüber liegt. Die Mäuse der Gruppe 2 verbrachten insgesamt mehr Zeit auf der Plattform als die Gruppe 3, zum Zeitpunkt 6h liegt die Latenzzeit allerdings unter der von Gruppe 3.

Die Latenzzeit der Gruppe 3 liegt deutlich unter der von Gruppe 1. Nur bei dem 6h-Wert liegt der Mittelwert der Latenzzeit der Gruppe 3 über dem der Gruppe 2.

4.1.2 Vergleich der Latenzzeit von *Baseline* und *Retest* bei allen Gruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten

In den Abbildungen 13 bis 20 wurde für die einzelnen Zeitpunkte des *Retest* immer die gleiche Darstellungsform gewählt. Es handelt sich hierbei um Boxplot-Diagramme (*Whisker-Diagramm*). Das Boxplot-Diagramm stellt eine schematische Häufigkeitsverteilung dar. Der durch ein Rechteck markierte Bereich repräsentiert den Interquartilbereich. Der Median wird als horizontal verlaufende Linie im Rechteck eingetragen. Der *Range* wird durch *Whiskers* dargestellt. Im linken Teil der Abbildung ist die Latenzzeit der *Baseline* und in der rechten Hälfte die Latenzzeit des *Retest* zum getesteten Zeitpunkt dargestellt. Abgebildet sind sowohl bei der *Baseline* als auch beim *Retest* alle drei Gruppen: Links jeweils die Gruppe 1, die sofort nach Verlassen der Plattform einen Fußschock bekommen hat, in der Mitte jeweils die Gruppe 2, die mit 60sec Verzögerung geschockt wurde und rechts die Gruppe 3, die die nicht geschockte Gruppe darstellt. Eine Unterscheidung der Gruppe 2 in ‚Plattform betreten‘ und ‚nicht betreten‘ findet bei diesen Darstellungen noch nicht statt.

Es wurde auch eine einfaktorielle Varianzanalyse (*One-Way-Anova*) durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Tests sind als Signifikanzen in den Abbildungen 13 bis 20 dargestellt. (Für ausführliche Ergebnisse der Varianzanalyse siehe Anhang).

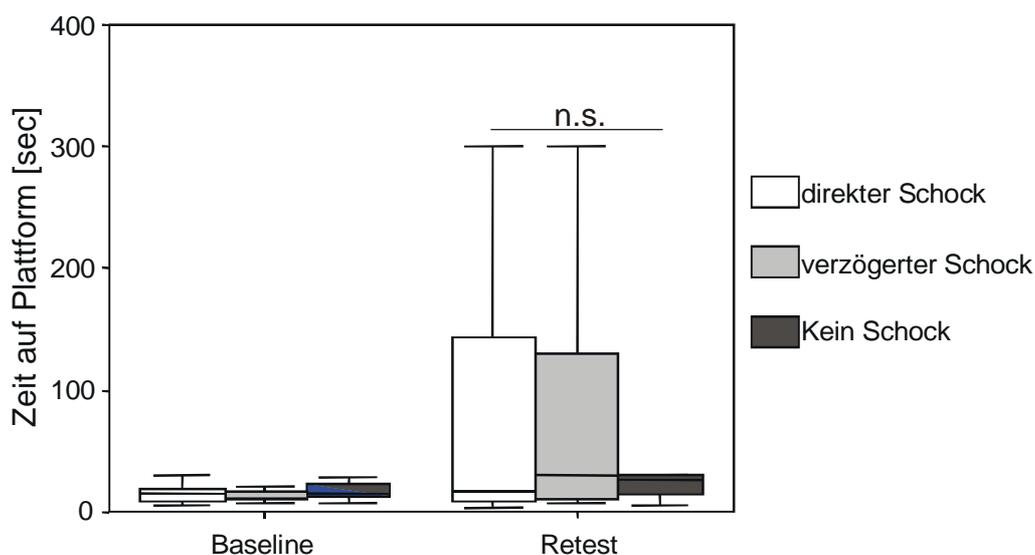


Abbildung 13 Latenzzeiten im *Retest* nach 1h (n.s. = nicht signifikant)

Abbildung 13 zeigt die Latenzzeit der Mäuse für die einzelnen Gruppen beim *Retest* nach 1h. Der Zeitabstand 1h überprüft i. a. bei Lerntests das Kurzzeitgedächtnis. Die Zeit, die die Tiere der einzelnen Gruppen auf der Plattform verbrachten, unterscheidet sich in der *Baseline* nicht. Alle Tiere haben nach ca.10-20sec die Plattform verlassen. In der Gruppe 1 saßen 50% der Tiere im *Retest* bis zu 100sec auf der Plattform, bevor sie heruntertraten. Ein ähnliches Verhalten war auch in der Gruppe 2 zu beobachten. In beiden Gruppen gab es Tiere, die die gesamte Testzeit von 300sec auf der Plattform gesessen haben, wie man am großen *Range* erkennen kann. Der Median der Gruppen 1 und 2 liegt nicht oder nur wenig höher als die Werte der *Baseline*. Die Gruppe 3 hingegen liegt insgesamt mit ihrer Latenzzeit nur wenig höher als ihre *Baseline*. Bei diesem Zeitpunkt zeigen sowohl die Gruppe 1 als auch die Gruppe 2 einen deutlichen Anstieg in der Latenzzeit verglichen mit der *Baseline*, woraus zu schließen ist, dass einige Tiere nach 1h gelernt haben, die Plattform nicht zu verlassen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen im *Retest* sind nicht signifikant.

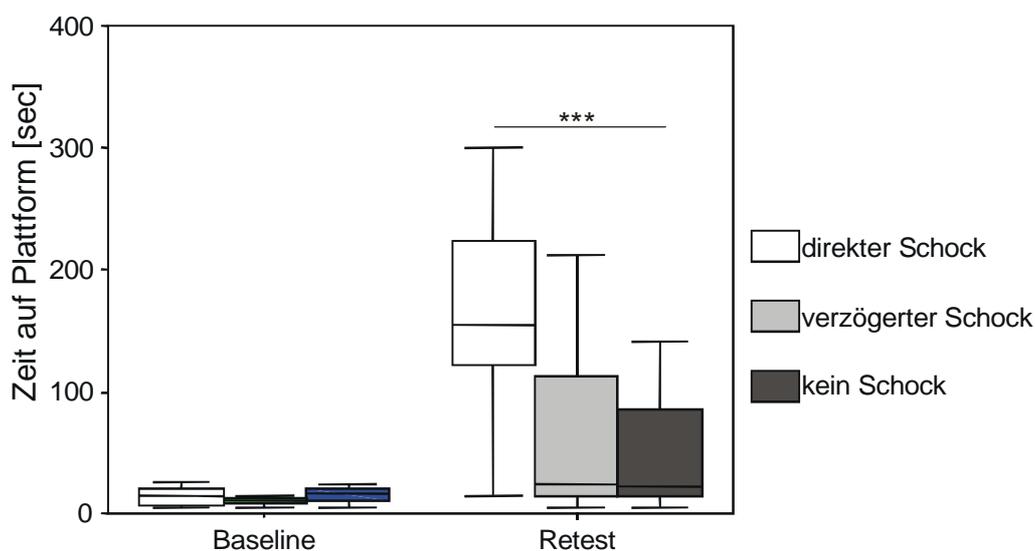


Abbildung 14 Latenzzeiten im *Retest* nach 3h (***) = hoch signifikant, $p < 0,001$)

Abbildung 14 zeigt die Latenzzeit der Mäuse für die einzelnen Gruppen beim *Retest* nach 3h. Die Zeit, die die Tiere der einzelnen Gruppen auf der Plattform verbrachten, unterscheidet sich in der *Baseline* nicht. Alle Tiere haben nach ca.10-20sec die Plattform verlassen. Bei Betrachtung des *Retests* ergeben sich deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. In der Gruppe 1 haben 50% der Tiere eine Latenzzeit von mehr als 100sec. Der Median dieser Gruppe liegt bei ca. 150sec, während er bei Gruppe 2 und 3 nicht höher als die *Baseline* liegt. Allerdings zeigen diese Gruppen ebenfalls eine Erhöhung in ihrer Latenzzeit. Bei 50% der Tiere bewegt sich diese im Rahmen von ca.10 bis ca.100sec. In beiden Gruppen (2 und 3) liegen andere Tiere deutlich über 100sec. Insgesamt lässt sich festhalten, dass bei allen drei

Gruppen die Latenzzeit des *Retest* im Vergleich zur *Baseline* ansteigt, jedoch bei Gruppe 2 nicht so viel wie bei Gruppe 1 und bei Gruppe 3 nicht soviel wie bei Gruppe 2.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen im *Retest* sind bei diesem Zeitpunkt hoch signifikant.

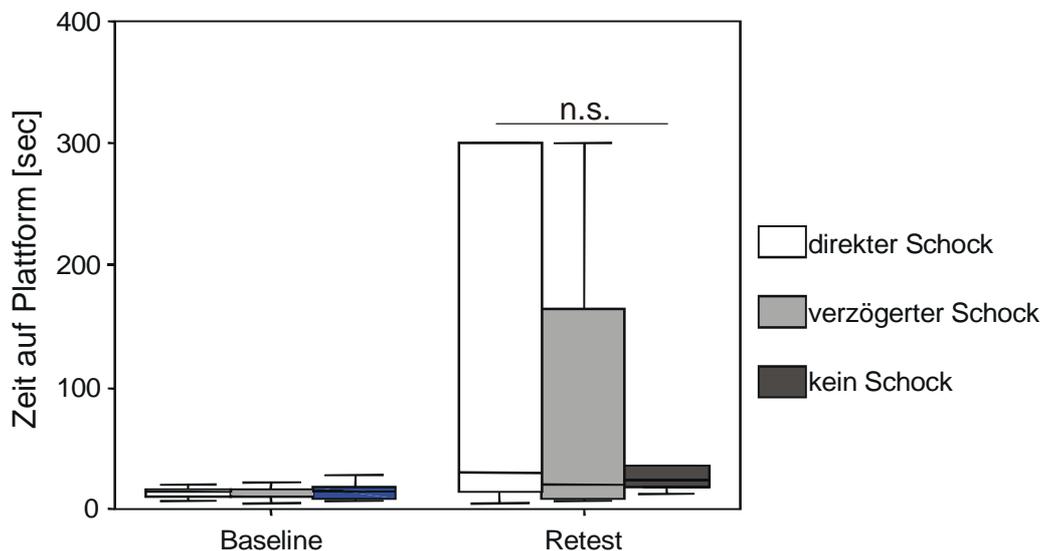


Abbildung 15 Latenzzeiten im *Retest* nach 4,5h (n.s. = nicht signifikant)

Abbildung 15 zeigt die Latenzzeit der Mäuse für die einzelnen Gruppen beim *Retest* nach 4,5h.

Die Zeit, die die Tiere der einzelnen Gruppen auf der Plattform verbrachten, unterscheidet sich in der *Baseline* nicht. Alle Tiere haben nach ca. 10-20sec die Plattform verlassen. In der Gruppe 1 befinden sich bis auf wenige Ausnahmen alle Tiere im Bereich des Quadrates. Daraus ist zu sehen, dass eine große Streuung der Latenzzeiten bei diesem Zeitpunkt in dieser Gruppe auftaucht. Der Median ist sehr klein. Er ist in Höhe der *Baseline*-Mediane angesiedelt. Bei der Gruppe 2 ist der Median ebenfalls nicht sehr groß. Auch hier ist er in Höhe der *Baseline* zu finden. Die Gruppe 2 zeigt nicht die große Streuung der Werte wie die Gruppe 1. Die Hälfte der Tiere ist im Bereich von ca. 10 bis ca. 150sec zu finden, die andere Hälfte bewegt sich noch in der Zeit darüber, so dass auch bei dieser Gruppe Latenzzeiten von 300sec, d.h. bis zum Testende zu finden sind. Die dritte Gruppe stellt sich hier als sehr homogen dar. Ihre Latenzzeiten im *Retest* unterscheiden sich kaum von denen der *Baseline*. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant.

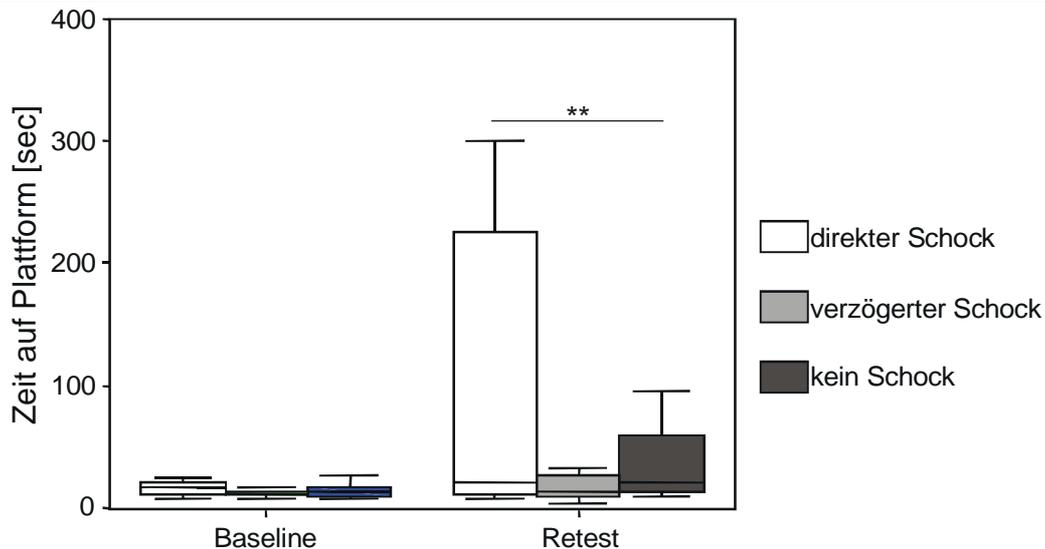


Abbildung 16 Latenzzeiten im *Retest* nach 6h (** = signifikant, $p < 0,01$)

Abbildung 16 zeigt die Latenzzeit der Mäuse für die einzelnen Gruppen beim *Retest* nach 6h. Die Zeit, die die Tiere der einzelnen Gruppen auf der Plattform verbrachten, unterscheidet sich in der *Baseline* nicht. Alle Tiere haben nach ca.10-20sec die Plattform verlassen. Bei diesem Zeitpunkt unterscheidet sich die erste Gruppe von den anderen beiden Gruppen deutlich. Die Hälfte der Tiere zeigt auch hier eine große Varianz in ihrer Latenzzeit. Das 1. Quartil liegt in etwa der Höhe der *Baseline*-Werte, das 3.Quartil bei ungefähr 200sec. Die anderen 50% der Tiere saßen länger als ca.200sec auf der Plattform. Der Median liegt auch bei diesem Zeitpunkt in Höhe der *Baseline*.

Wie auch schon in der Abbildung 12 deutlich zu sehen ist, liegt die Latenzzeit der Gruppe 2 bei diesem Zeitpunkt nur so hoch wie die Latenzzeiten der *Baseline*, während die Latenzzeit der Gruppe 3 deutlich - im Vergleich mit den Latenzzeiten der *Baseline* - ansteigt. Die Gruppe 3 zeigt hier zwar ein längeres Verbleiben auf der Plattform als die Gruppe 2, aber nicht als die Gruppe 1. Die Mediane aller drei Gruppen liegen ca. auf gleicher Höhe. Die Unterschiede der Latenzzeiten sind bei diesem Zeitpunkt signifikant.

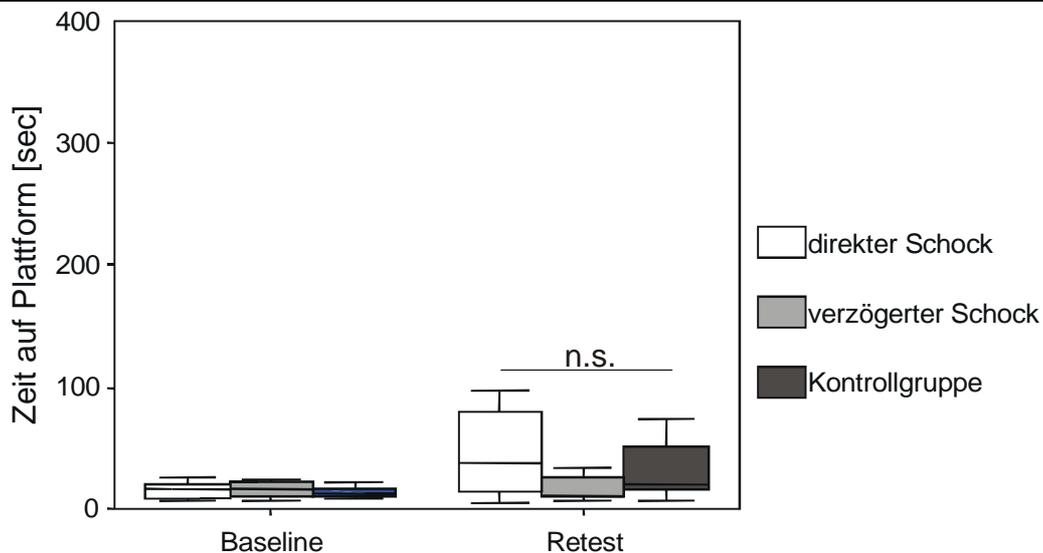


Abbildung 17 Latenzzeiten im *Retest* nach 9h (n.s. = nicht signifikant)

Abbildung 17 zeigt die Latenzzeit der Mäuse für die einzelnen Gruppen beim *Retest* nach 9h. Die Zeit, die die Tiere der einzelnen Gruppen auf der Plattform verbrachten, unterscheidet sich in den *Baseline*-Daten nicht. Alle Tiere haben nach ca.10-20sec die Plattform verlassen. Insgesamt betrachtet liegen die Latenzzeiten bei allen drei Gruppen eng beieinander, weisen also nur geringe Streuung auf. Dies ist an dem Interquartilbereich zu sehen. Auch der *Range* zeigt, dass die Latenzzeiten der Tiere nahe beieinander liegen. Allerdings sind auch die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht sehr groß. Kein Tier verbringt die gesamte Testzeit von 300sec auf der Plattform. Die Tiere der Gruppe 1 sitzen maximal ca. 100sec auf der Plattform. Der Median dieser Gruppe liegt allerdings höher als die *Baseline*-Werte. Wie schon zum Zeitpunkt 6h bemerkt, liegen auch bei 9h die Zeiten der Gruppe 3 höher als die der Gruppe 2. Wobei der Median der Gruppe 3 in Höhe der Werte der Gruppe 2 zu sehen ist.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind nicht signifikant.

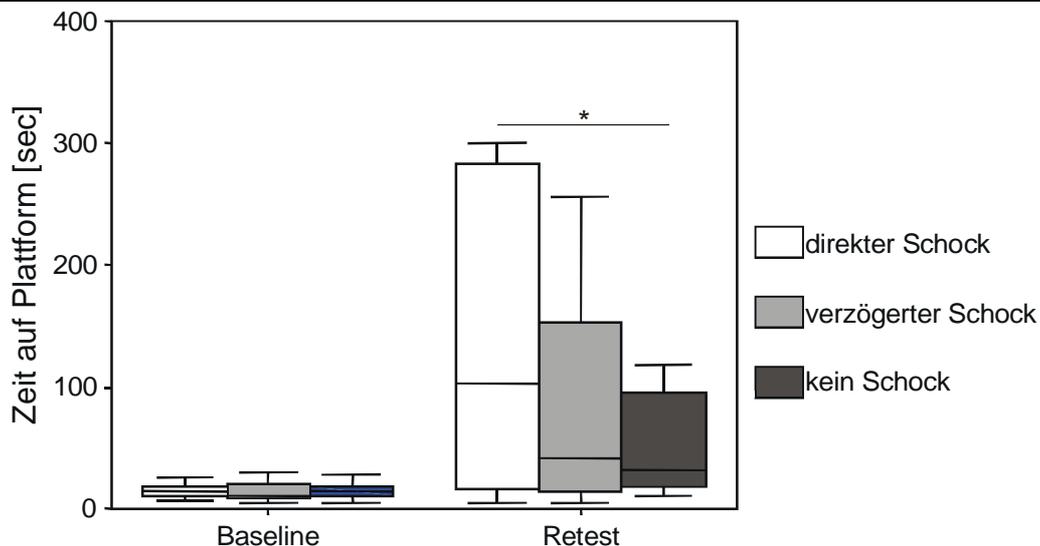


Abbildung 18 Latenzzeiten im *Retest* nach 12h (* = schwach signifikant, $p < 0,05$)

Abbildung 18 zeigt die Latenzzeit der Mäuse für die einzelnen Gruppen beim *Retest* nach 12h.

Der Zeitraum von 12h zwischen *Baseline*-Testen und *Retest* noch einmal unterteilt. Bei einer Gruppe (12h a) fanden morgens das *Baseline*-Testen und abends der *Retest* statt. Bei einer anderen Gruppe war es genau anders herum: abends wurden die *Baseline*-Daten ermittelt und morgens wurden die Tiere wiedergetestet (12h b). In diesem Diagramm sind beide Gruppen, die nach 12h wiedergetestet wurden, zusammengefasst.

Die Zeit, die die Tiere der einzelnen Gruppen auf der Plattform verbrachten, unterscheidet sich in den *Baseline*-Werten nicht. Alle Tiere hatten nach ca. 10-20sec die Plattform verlassen. Allerdings ist bei allen drei Gruppen während des *Retest* ein deutlicher Anstieg in der Latenzzeit zu sehen. In der Gruppe 1 saßen die Mäuse länger auf der Plattform als in den anderen beiden Gruppen. Dieses Ergebnis wird auch durch den Median, der etwa bei 100sec liegt, deutlich. Bei Gruppe 2 und 3 liegen die Mediane nur wenig über der *Baseline*. Aber sowohl in der Gruppe 2 als auch in der Gruppe 3 hat die Hälfte der Tiere bis zu bzw. über 100sec auf der Plattform gesessen.

Die Varianz der Latenzzeiten ist allerdings bei der Gruppe 3 nicht so groß wie bei der Gruppe 2. Die Gruppe 3 weist zudem kürzere Latenzzeiten als die Gruppe 2 auf.

Die Unterschiede sind bei diesem Zeitpunkt schwach signifikant.

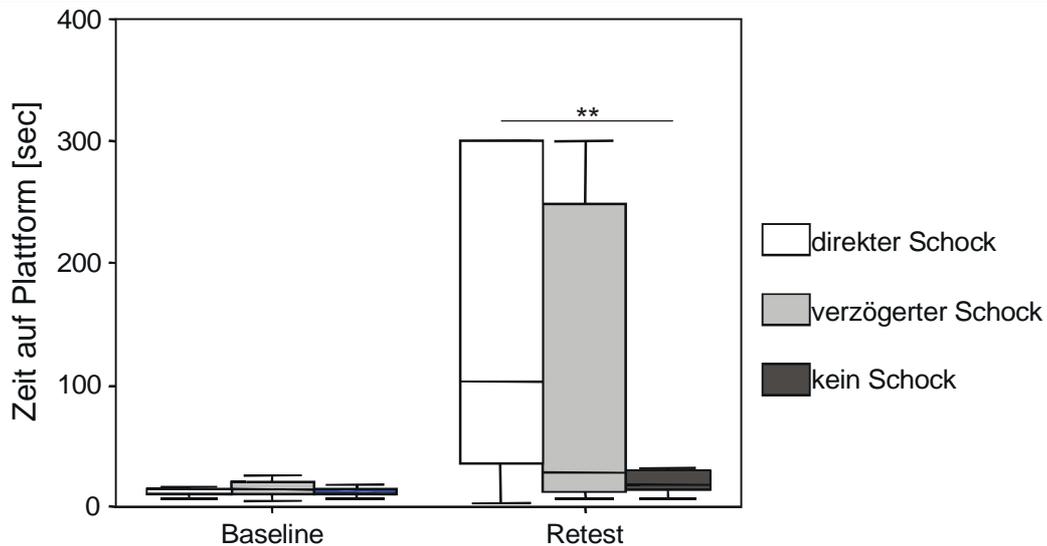


Abbildung 19 Latenzzeiten im *Retest* nach 24h (** = signifikant, $p < 0,01$)

Abbildung 19 zeigt die Latenzzeit der Mäuse für die einzelnen Gruppen beim *Retest* nach 24h.

Der 24h-Zeitpunkt wird in der Literatur als Zeitwert für das Langzeitgedächtnis betrachtet.

Die Zeit, die die Tiere der einzelnen Gruppen auf der Plattform verbrachten, unterscheidet sich in der *Baseline* nicht. Alle Tiere haben nach ca. 10-20sec die Plattform verlassen. Bei der Gruppe 1 ist ein deutlicher Anstieg der Latenzzeit im *Retest* zu sehen, obwohl auch hier die Werte stark streuen. Die Hälfte der Tiere zeigt eine Latenz von ca. 50sec-300sec. Der Median der Gruppe 1 liegt bei ca. 100sec, während der von Gruppe 2 und Gruppe 3 in Höhe der *Baseline*-Werte zu finden ist. Allerdings ist auch bei diesem Zeitpunkt ein Anstieg der Latenzzeit von Gruppe 2 zu sehen. Auch in dieser Gruppe saßen Tiere bis zum Testende von 300sec auf der Plattform.

In den Gruppen 2 und 3 gibt es aber auch Mäuse, die keine erhöhte Latenz aufweisen, sondern genauso schnell wie beim *Baseline*-Testen die Plattform wieder verlassen haben. In der Gruppe 3 zeigen beim *Retest* alle Tiere eine geringe Latenzzeit. Die Unterschiede der Latenzzeiten bei diesem Zeitpunkt sind signifikant.

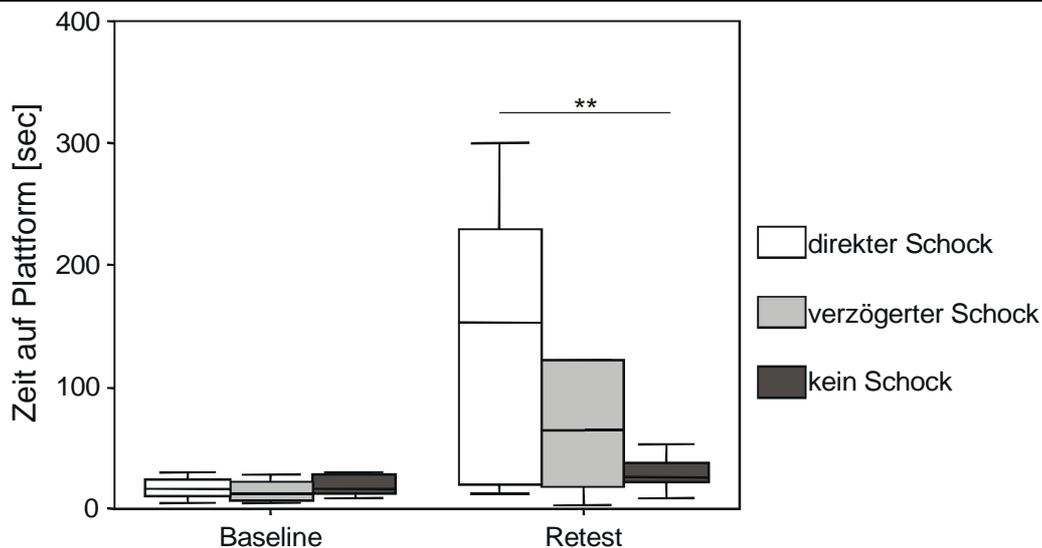


Abbildung 20 Latenzzeiten im *Retest* nach 72h (** = signifikant, $p < 0,01$)

Abbildung 20 zeigt die Latenzzeit der Mäuse für die einzelnen Gruppen beim *Retest* nach 72h.

Die Zeit, die die Tiere der einzelnen Gruppen auf der Plattform verbrachten, unterscheidet sich in den *Baseline*-Zeiten nicht. Alle Tiere haben nach ca. 10-20sec die Plattform verlassen. Bei der Gruppe 1 ist im Vergleich zum 24h-Zeitpunkt ein deutlicher Anstieg der Latenzzeit im *Retest* zu sehen, obwohl die Werte stark streuen. Die Hälfte der Tiere zeigt eine Latenz von ca. 30-250sec. Der Median der Gruppe 1 liegt bei ca. 150sec. Es haben auch bei einem *Retest* nach 72h einige Tiere die gesamte Testzeit auf der Plattform gesessen. Diese hohe Latenzzeit von 300sec taucht bei der Gruppe 2 nicht auf. Insgesamt stellt sich diese Gruppe nach 72h als sehr homogen dar, der *Range* und der Interquartilbereich sind sehr klein. Die Gruppe 3 unterscheidet sich in ihrem *Retest*-Verhalten verglichen mit dem *Baseline*-Verhalten nur wenig. Die Streuung in den Daten des *Retest* ist in dieser Gruppe etwas größer, liegt aber deutlich unter den Werten von der Gruppe 2. Die Unterschiede der Latenzzeiten bei diesem Zeitpunkt sind signifikant.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei allen Gruppen zu jedem Zeitpunkt die Latenzzeiten in den *Baseline*-Werten gleich sind.

Im *Retest* weisen die Mäuse der Gruppe 1 bei allen Zeitpunkten die höchste Latenzzeit auf, wenn auch die Werte stark streuen. Es gibt in dieser Gruppe bei allen Zeitpunkten Tiere, die keine Erhöhung der Latenzzeit zeigen. Es gibt allerdings aber auch bei allen Zeitpunkten Tiere, die die gesamte Testzeit von 300sec auf der Plattform gesessen haben.

Der 9h-Zeitpunkt bildet eine Ausnahme. Hier sind die Latenzzeiten der Gruppe 1 insgesamt nicht sehr hoch und streuen wenig. Die Tiere zeigen *per definitionem* also kaum Lernverhalten.

Die Gruppen 2 und 3 stellen Kontrollgruppen dar und sollten, verglichen mit ihren *Baseline*-Werten, keine Erhöhung in der Latenzzeit zeigen. Besonders in Gruppe 2 ist jedoch ein Anstieg zu sehen. Diese Gruppe liegt zwar bei allen Zeitpunkten in der Latenzzeit unter der Gruppe 1, zeigt aber einen deutlichen Anstieg im Vergleich mit der Gruppe 3. Nur bei den Zeitpunkten 6h und 9h sind die Latenzzeiten der beiden Gruppen etwa gleich.

Um den Anstieg der Latenzzeit in der Gruppe 2 weiter zu untersuchen, wurde im folgenden die Gruppe in ‚Plattform vor Schockgabe wieder betreten‘ und ‚Plattform vor Schockgabe nicht wieder betreten‘ unterteilt (siehe Kapitel 4.1.4). Diese Untergruppen wurden dann mit der Gruppe 1 verglichen.

4.1.3 Vergleich der Latenzzeiten von Gruppe 1 und Gruppe 2 Plattform betreten-nicht betreten

Während der Videoauswertung ist beobachtet worden, dass hauptsächlich bei Tieren der Gruppe 2 die Latenzzeit ansteigt, die zwischen Verlassen der Plattform und Schockgabe die Plattform wieder betreten. Daher wurde diese Gruppe nach diesem Kriterium unterteilt und im Folgenden statistisch untersucht. Es wurden die Tiere aller Zeitpunkte des *Retest* zusammengefasst.

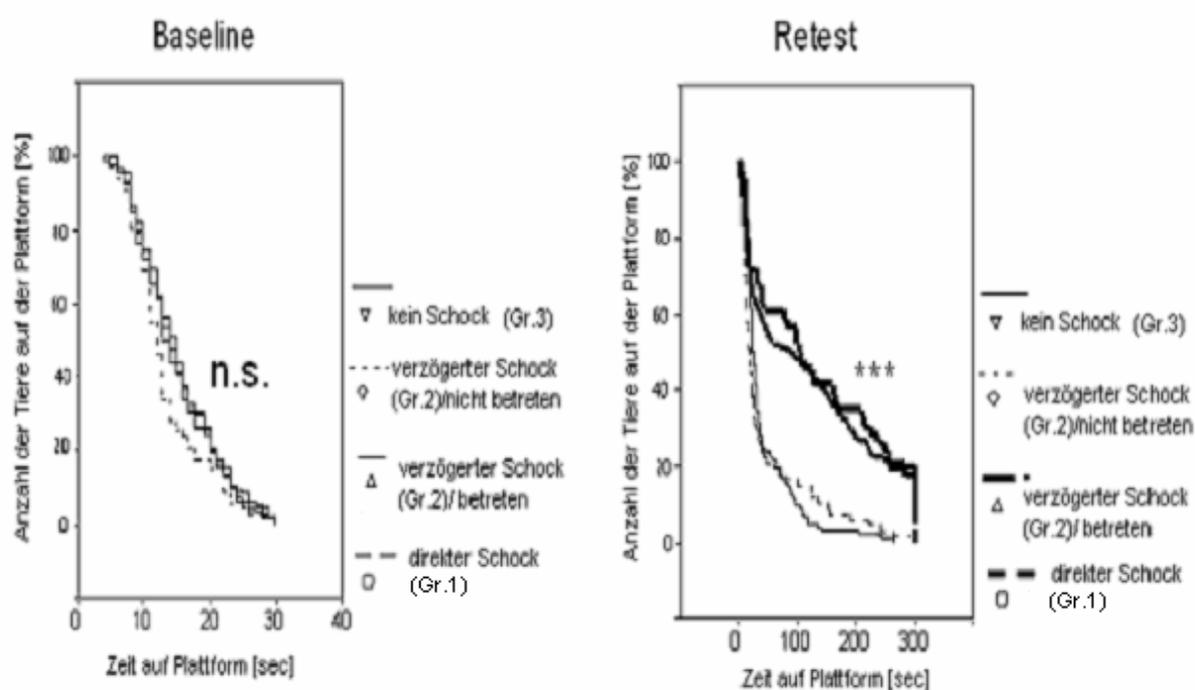


Abbildung 21 Latenzzeiten von *Baseline* (n.s. = nicht signifikant) und *Retest* (***) = hoch signifikant; $p < 0,001$) mit Unterteilung der Gruppe 2

Abbildung 21 zeigt den Verlauf der Latenzzeiten in der *Baseline* und im *Retest* nach der Kaplan-Meier-Methode. Auf der Abszisse ist jeweils die Zeit, die die Mäuse auf der Plattform verbrachten, eingetragen. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Tiere (angegeben in %) zu sehen, die die Plattform noch nicht verlassen haben.

Das *Baseline*-Verhalten der Tiere aller Gruppen ist gleich. Alle Kurven liegen auf- bzw. nahe beieinander. Die Mäuse haben frühestens nach 5sec die Plattform verlassen. Die Hälfte aller Tiere saß nach 15sec, also der halben Testzeit, noch auf der Plattform. Nach 30sec war der Test beendet. Bis zu diesem Zeitpunkt hatten alle Tiere die Plattform verlassen.

Die Kurven der Gruppen im *Retest* zeigen jeweils bei zwei Gruppen einen ähnlichen Verlauf. Die Tiere der Gruppe 3 und der Gruppe 2/nicht betreten unterscheiden sich kaum voneinander und ebenso die Kurven der Gruppe 1 und der Gruppe 2/betreten (zur besseren Übersicht im Diagramm fett dargestellt).

Nach einer Zeit von 50sec haben ca. 15% der Tiere von den Gruppen ‚direkter Schock‘ (Gr.1) und ‚verzögerter Schock/Plattform betreten‘ (Gr.2) die Plattform verlassen. Ein deutlich höherer Prozentsatz, nämlich ca. 80% saß nach der gleichen Zeit bei den anderen beiden Gruppen nicht mehr auf der Plattform.

Der Kurvenverlauf der Gruppe 3 ist etwas steiler als der Kurvenverlauf als der Gruppe 2/nicht betreten. Dadurch wird gezeigt, dass mehr Tiere in einer bestimmten Zeit die Plattform verlassen haben. Von der Gruppe 3 saß kein Tier bis zum Testende von 300sec auf der Plattform. An der Kurve der Gruppe 2/nicht betreten ist zu erkennen, dass bis zum Testende Tiere dieser Gruppe auf der Plattform saßen. Die Anzahl dieser Tiere ist kleiner als 10.

Bei den anderen beiden Gruppen sitzen auch nach Ablauf der Testzeit immer noch ca. 20% der Mäuse auf der Plattform. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Gruppen 3 und 2/nicht betreten einen ähnlichen Kurvenverlauf haben. Circa 80% dieser Tiere verlassen in den ersten 50sec die Plattform. Nur wenige Ausnahmen der Gruppe 2/nicht betreten sitzen den gesamten Test auf der Plattform. Bei den anderen beiden Gruppen haben nur 15% die Plattform in den ersten 50sec verlassen. 55% weisen eine Latenzzeit bis zu 300sec auf und 30% verlassen über den gesamten Testzeitraum die Plattform nicht. Das Ergebnis des Logranktests zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen während des *Baseline*-Testens. Der Unterschied zwischen den Gruppen beim *Retest* ist hoch signifikant (***)=hoch signifikant; $p < 0,001$; Logranktest).

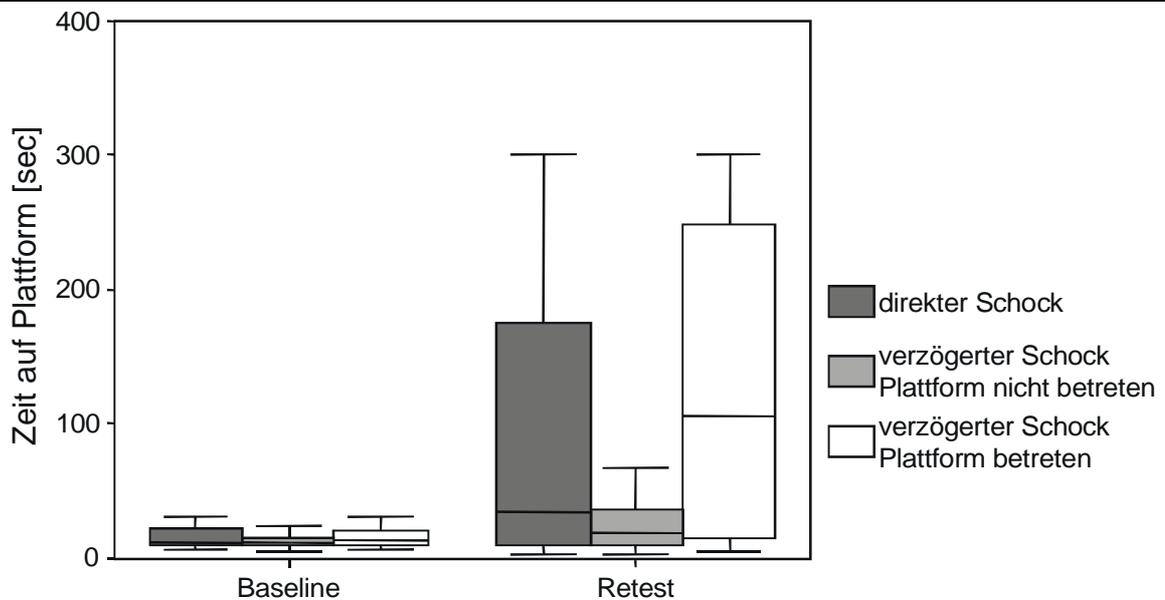


Abbildung 22 Vergleich Gr.1 und Gr.2 Plattform betreten oder nicht betreten

Abbildung 22 entspricht der Darstellung der Diagramme unter 4.1.2

Es ist die Latenzzeit der Gruppe 1, der Gruppe 2/nicht betreten und der Gruppe 2/betreteten, dargestellt.

Die Latenzzeit der *Baseline*-Daten unterscheidet sich in keiner Gruppe. Es sind jedoch deutliche Unterschiede im *Retest* zu beobachten. Die Hälfte der Tiere der Gruppe 1 verlässt bis zu einer Zeit von ca. 180sec die Plattform. Die andere Hälfte dieser Gruppe sitzt bis zum Testende auf der Plattform. In der Gruppe 2/betreteten liegt die Latenzzeit, die die Hälfte der Tiere auf der Plattform verbringen höher, die Werte streuen aber auch insgesamt mehr. Der Median dieser Gruppe liegt auch deutlich höher als der Median der Gruppe 1. Eine vergleichsweise geringe Latenzzeit weist dagegen die Gruppe 2/nicht betreten auf. Die eine Hälfte der Tiere sitzt nur wenig länger auf der Plattform als beim *Baseline*-Testen. Die andere Hälfte hat bis zu einem Zeitpunkt von 50sec die Plattform verlassen.

Mann-Whitney-U Test

Tabelle 2 Ergebnisse des U-Tests nach Mann-Whitney (Gr.1 =Gruppe1, Gr.2b=Gruppe 2 betreten; Gr.2nb=Gruppe2 nicht betreten)

Verhalten	Dyade	Zeitpunkt <i>Retest</i>							
		1h	3h	4,5h	6h	9h	12h	24h	72h
Zeit auf Plattform	Gr.1 vs. Gr.2b	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Baseline</i> [sec]	Gr.1 vs. Gr.2nb	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Zeit auf Plattform	Gr.1 vs Gr.2b	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Retest</i> [sec]	Gr.1 vs. Gr.2nb	n.s.	***	*	**	n.s.	**	**	**

In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests dargestellt. Es wurde jeweils die Latenzzeit der Gruppe 1 gegen die Gruppe 2 ‚betreten‘ und die Gruppe 1 gegen die Gruppe 2 ‚nicht betreten‘ auf signifikante Unterschiede untersucht. Die Analyse wurde zum einen für die *Baseline* und zum anderen für den *Retest* durchgeführt. Es werden alle Zeitpunkte des *Retests* einzeln betrachtet. Zum Zeitpunkt des *Baseline*-Testens sind die Gruppen nicht signifikant unterschiedlich voneinander. Betrachtet man hingegen die Latenzzeiten während der *Retests*, ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe 1 und der Gruppe 2/nicht betreten zu sehen. Dieser Unterschied ist bei fast jedem Zeitpunkt des *Retest* vorhanden, außer bei dem 1h-Wert und 9h-Wert. Die Gruppe 2/betreten ist zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich zur Gruppe 1. Die Latenzzeiten der Gruppe 1 und der Gruppe 2/betreten unterscheiden sich also nicht voneinander.

4.1.4 Vergleich der Latenzzeiten von Gruppe 12h a und 12h b

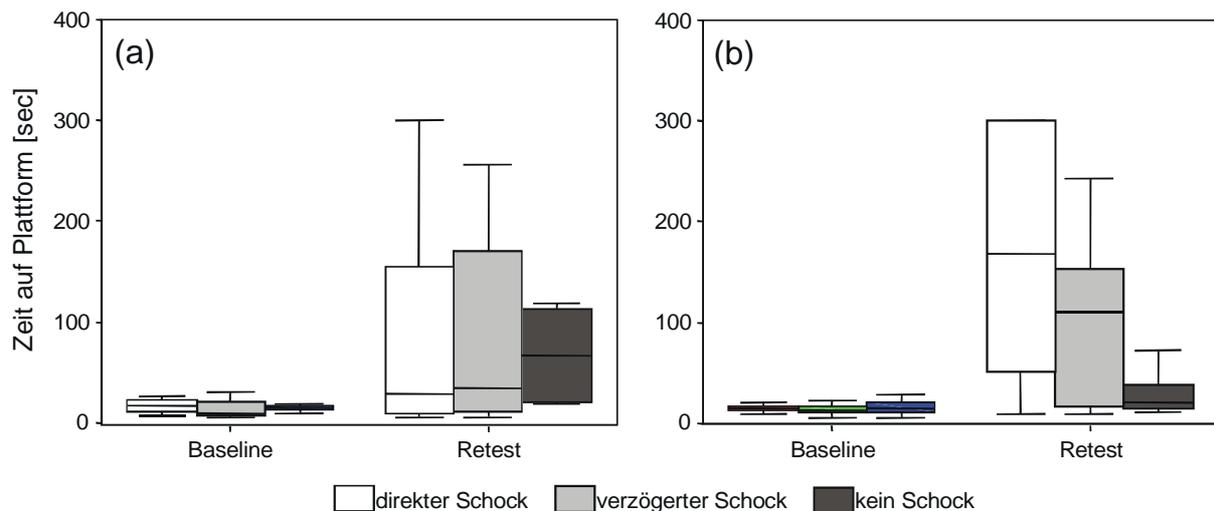


Abbildung 23 (a) Latenzzeiten von Gruppe 12h a und (b) Gruppe 12h b im Vergleich

Die Abbildung 23 entspricht der Darstellung der Diagramme unter 4.1.2.

Diese Boxplot-Diagramme zeigen die Latenzzeit der Mäuse in den einzelnen Gruppen, wenn der *Retest* jeweils nach 12h durchgeführt wurde. Bei diesem Zeitpunkt war es aufgrund des Zeitabstandes nicht zu vermeiden, das die Tiere sowohl in ihrer inaktiven als auch in ihrer aktiven Phase getestet wurden. An dieser Stelle sei noch mal erwähnt, dass die Mäuse in einem inversen Hell-Dunkel-Zyklus gehalten wurden. Zum Zeitpunkt des *Retests* morgens war das Licht aus und die Tiere befanden sich in ihrer Aktivitätsphase. Das *Baseline*-Testen zu diesem Zeitpunkt fand dementsprechend während der Ruhephase statt.

Beim Zeitpunkt des *Retests* abends war es genau anders herum: Das *Baseline*-Testen fand während der Aktivitätsphase statt und der *Retest* in der inaktiven Phase der Tiere.

In der Abbildung 23a sind die Ergebnisse dargestellt, wenn das *Baseline*-Testen (T1) morgens und der *Retest* (T2) abends durchgeführt wurden. In der Abbildung 23b hat T1 abends und T2 morgens stattgefunden. Die Zeit, die die Tiere der einzelnen Gruppen auf der Plattform verbrachten, unterscheidet sich in der *Baseline*-Werten bei beiden Diagrammen nicht. Alle Tiere haben nach ca. 10-20sec die Plattform verlassen.

Ein deutlicher Unterschied ist jedoch zwischen den beiden Diagrammen zu sehen, wenn man die einzelnen Gruppen während des *Retest* ansieht. Hat der *Retest* abends stattgefunden, sitzen die Tiere der Gruppe 1 und Gruppe 2 ähnlich lange auf der Plattform. Die höchste Latenzzeit bei der Hälfte der Tiere liegt bei ca. 150sec. Es gibt aber auch Tiere in beiden Gruppen, die eine sehr geringe Latenzzeit und damit kein Lernverhalten aufweisen. Der Median beider Gruppen liegt fast in gleicher Höhe wie die Werte der Baseline. Die Gruppe 3 zeigt hier ein völlig anderes Verhalten. Das erste Quartil dieser Gruppe liegt deutlich über den ersten Quartilen der Gruppen 1 und 2. Auch der Median dieser Gruppe liegt deutlich höher als die

anderen beiden Mediane. Die Latenzzeiten der Gruppe 3 sind hier auch gegenüber den anderen Zeitpunkten deutlich erhöht. In der Abbildung 23b entsteht bei der Darstellung der Latenzzeiten ein völlig anderes Diagramm. Der Retest hat morgens stattgefunden. Die Latenzzeiten der Gruppe 3 sind deutlich kleiner als bei der Abbildung 23a. Der Boxplot der Gruppe 3 zeigt, dass 50% der Tiere länger als 50sec auf der Plattform gesessen haben. Es saßen in dieser Gruppe auch deutlich mehr Tiere bis zum Testende auf der Plattform, als es bei Abbildung 23b zu sehen ist. Die Gruppe 2 unterscheidet sich bei beiden Diagrammen kaum von einander. Ein Unterschied in der Verteilung der Latenzzeiten ist anhand des Diagramms nicht zu erkennen. Nur der Median liegt bei dem *Retest* morgens, deutlich höher als bei dem Boxplot *Retest* abends.

Die Zeit, zu der die Tiere diesen Verhaltenstest durchlaufen, hat also einen Einfluss auf das Verhalten der Tiere in diesem Test.

4.2 Korrelationsanalysen nach Pearson

Die Tabellen 3 bis 9 stellen die Ergebnisse aus den Korrelationsanalysen zwischen den einzelnen analysierten Verhaltensweisen und der Latenzzeit im *Retest* dar. Eine höhere Latenzzeit im *Retest* im Vergleich mit den *Baseline*-Daten wird in der Literatur als Lernverhalten interpretiert. Es wird hier untersucht, ob eine Verhaltensweise nur bei einer hohen Latenzzeit auftaucht oder ob es auch negativ korrelierte Verhaltensweisen gibt. Das bedeutet, dass eine Verhaltensweise eventuell nur bei einer kurzen Latenzzeit gezeigt wird. Die Korrelationsanalysen wurden durchgeführt, um zum einen zu zeigen, dass die erhöhte Latenzzeit der Gruppe 2, die die Plattform wieder betritt, bevor sie geschockt werden, den Test lernt. Zum andern soll gezeigt werden, dass sich die Gruppe 3, die auch eine höhere, aber nicht signifikante höhere Latenzzeit, aufweist, von den anderen beiden Gruppen in ihrem Verhalten unterscheidet. Bei signifikanten positiven Korrelationen sind diese mit ‚***‘ gekennzeichnet. Signifikante negative Korrelationen werden mit ‚***^{neg}‘ bezeichnet. ‚ns‘ bedeutet, dass kein signifikanter Unterschied vorhanden ist.

4.2.1 Korrelationen nach Pearson ohne Differenzierung der Zeitpunkte

Die Tabellen 3 bis 5 zeigen die Ergebnisse der Korrelationsanalyse. Diese Korrelationsanalyse wurde mit N=120 Mäusen (Gruppe 1), N=114 Mäusen (Gruppe 2) und N=106 Mäusen (Gruppe 3) durchgeführt. Es wurde hier nur nach den einzelnen Gruppen differenziert, nicht nach den Zeitpunkten, zu denen die Tiere wiedertestet wurden.

Tabelle 3 Untersuchung der Korrelation Latenzzeit (*Retest*) und Verhaltensweisen in der *Baseline* nach Pearson

Verhaltensparameter	Gruppe 1 direkter Schock	Gruppe 2 verzögerter Schock	Gruppe 3 kein Schock
<i>risk assessment</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>front paws on the grid</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>back paws on the grid</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>self-grooming</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>tail rattling</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Freezing</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Resting</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>go down forward</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>go down backward</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Rearing</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>contact to platform</i>	n.s.	n.s.	n.s.

In der linken Spalte der Tabelle 3 sind die Verhaltensweisen, die während der *Baseline*-Tests untersucht wurden, aufgelistet. Für jede der drei Gruppen wird die Korrelation zwischen der Latenzzeit im *Retest* und den Verhaltensweisen während der *Baseline*-Tests analysiert. Während dieser Tests korreliert keine Verhaltensweise mit der Latenzzeit (vergleiche Abbildung 12).

Tabelle 4 Untersuchung der Korrelation Latenzzeit (*Retest*) und Verhaltensweisen während der Habituationszeit (T2) nach Pearson

Verhaltensparameter	Gruppe 1 direkter Schock	Gruppe 2 verzögerter Schock	Gruppe 3 kein Schock
<i>self-grooming</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>tail-rattling</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>rearing on cylinder</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>rearing off cylinder</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Freezing</i>	***	n.s.	n.s.
<i>jump of cylinder</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Resting</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>avoid to contact platform</i>	n.s.	n.s.	n.s.

In der linken Spalte von Tabelle 4 sind die Verhaltensweisen, die während der Habituation vor dem *Retest* untersucht wurden, aufgelistet. Für jede der drei Gruppen wird die Korrelation zwischen der Latenzzeit im *Retest* und den Verhaltensweisen der Habituation analysiert. Es besteht eine hoch signifikante Korrelation zwischen der Latenzzeit im *Retest* und dem *Freezing*-Verhalten von Gruppe 1. Das bedeutet, je höher die Latenzzeit in dieser Gruppe liegt, desto mehr *Freezing*-Verhalten zeigen diese Tiere schon während der Habituation.

Tabelle 5 Untersuchung der Korrelation Latenzzeit (*Retest*) und Verhaltensweisen während des *Retest*

Verhaltensparameter	Gruppe 1 direkter Schock	Gruppe 2 verzögerter Schock	Gruppe 3 kein Schock
<i>risk assessment</i>	***	***	***
<i>front paws on the grid</i>	***	***	***
<i>back paws on the grid</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>self-grooming</i>	***	***	***
<i>tail rattling</i>	***	***	n.s., nicht gezeigt
<i>Freezing</i>	***	***	*
<i>Resting</i>	***	***	***
<i>go down forward</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>go down backward</i>	*** ^{neg}	*** ^{neg}	n.s.
<i>Rearing</i>	n.s.	n.s.	n.s.
<i>contact to platform</i>	n.s.	n.s.	n.s., nicht gezeigt

In der linken Spalte der Tabelle 5 sind die Verhaltensweisen, die während des *Retests* analysiert wurden, aufgelistet. Für jede der drei Gruppen wird die Korrelation zwischen der Latenzzeit im *Retest* und den Verhaltensweisen während dieser Zeit analysiert. In dieser Zeit treten die meisten Korrelationen zwischen Verhaltensweise und Latenzzeit auf. Zwei Verhaltensweisen konnten in der Gruppe 3 nicht beobachtet werden: ‚*tail rattling*‘ und ‚*contact to platform (after stepping down)*‘. Dieses Verhalten konnte zwar bei den anderen beiden Gruppen beobachtet werden, korreliert aber nicht mit der Latenzzeit. Bemerkenswert ist die hoch signifikante negative Korrelation des Verhaltens ‚*go down backward*‘ mit der Latenzzeit. Es tritt sowohl in Gruppe 1 als auch in Gruppe 2 auf, aber nicht in Gruppe 3. Die Tiere verlassen nach einer kurzen Zeit die Plattform rückwärts, also mit den Hinterpfoten zuerst. Dieses Verhalten tritt nicht auf, wenn die Tiere länger auf der Plattform saßen. ‚*Risk Assessment*‘ und die ähnliche Verhaltensweise ‚*front paws on the grid*‘ korrelieren in allen drei Gruppen hoch signifikant, ebenso das ‚*self-grooming* und ‚*Resting*‘ mit einer hohen Latenzzeit. Andere Verhaltensweisen wie *Rearing* und *back paws on the grid* korrelieren bei keiner Gruppe signifikant. Das *Freezing*-Verhalten korreliert während der Habituation nur bei Gruppe 1 signifikant. Während des *Retests* ist eine hoch signifikante Korrelation zwischen Gruppe 1 und der Latenzzeit bzw. der Gruppe 2 und der Latenzzeit zu beobachten. Aber auch Gruppe 3 korreliert dieses Verhalten bei einer höheren Latenzzeit leicht signifikant.

4.2.2 Korrelationen nach Pearson im *Retest* mit Einzelbetrachtung der Zeitpunkte

Die folgenden Tabellen geben die Ergebnisse der Korrelationsanalysen nach Pearson zu jedem einzelnen Zeitpunkt des *Retest* wieder.

Jede Tabelle zeigt die Korrelationen zwischen Latenzzeit des *Retest* und der Verhaltensweise im *Retest* einer Gruppe. Bei signifikanten positiven Korrelationen sind diese mit „****“ gekennzeichnet. Signifikante negative Korrelationen werden ebenfalls mit „****“ und dem Zusatz „neg“ bezeichnet. „ns“ bedeutet, dass kein signifikanter Unterschied vorhanden ist.

Tabelle 6 Korrelationen nach Pearson im *Retest* für Gruppe 1

Verhaltensparameter	Zeitpunkte								
	1	3	4,5	6	9	12h a	12h b	24	72
<i>risk assessment</i>	***	0,06	***	***	***	***	***	***	***
<i>front paws on the grid</i>	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.
<i>back paws on the grid</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>self-grooming</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	**	n.s.	n.s.
<i>tail rattling</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Freezing</i>	***	***	***	***	***	n.s.	***	***	***
<i>Resting</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	***	***	***	***
<i>go down forward</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>go down backward</i>	n.s.	n.s.	n.s.	*** ^{neg}	n.s.	n.s.	*** ^{neg}	n.s.	n.s.
<i>Rearing</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>contact to platform</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

In der Tabelle 6 sind die Korrelationen zwischen den in der linken Spalte eingetragenen Verhaltensweisen der Gruppe 1 und den Latenzzeiten zu jedem Zeitpunkt des *Retests* dargestellt.

Die Verhaltensweise ‚*risk assessment*‘ ist zu fast jedem Zeitpunkt hoch signifikant. Nur der 3h-Wert stellt hier eine Ausnahme dar. Allerdings liegt das Ergebnis der Korrelationsanalyse knapp oberhalb der Signifikanzgrenze. Es ist auch bei diesem Wert eine Tendenz zu sehen.

Ein weiteres Verhalten, das über fast alle Zeitpunkte hinweg hoch signifikant ist, ist das *Freezing*-Verhalten. Mit Ausnahme des 12-Wertes, an dem die Tiere abends den *Retest* durchlaufen haben, zeigen alle Tiere der Gruppe 1 auch mehr *Freezing*-Verhalten, wenn sie länger auf der Plattform bleiben. Das Verhalten ‚*Resting*‘ korreliert erst bei einem größeren Zeitabstand (ab 9h) zwischen *Baseline* und *Retest* mit der Latenzzeit.

Ein besonderes Phänomen stellen die negativen Korrelationen der Verhaltensweise ‚*go down backward*‘ dar. Dieses Verhalten konnte nicht sehr häufig beobachtet werden, trotzdem ist das Ergebnis hoch signifikant. Tiere, die eine niedrige Latenzzeit beim *Retest* haben, verlassen die Plattform rückwärts, d.h. mit den Hinterpfoten zuerst. Dieses Verhalten ist nur in den Gruppen 1 und 2 aufgetreten, nie in der Gruppe 3 (siehe Tabellen 6-9).

Tabelle 7 Korrelationen nach Pearson im Retest für Gruppe 2/betreten

Verhaltensparameter	Zeitpunkte								
	1	3	4,5	6	9	12h a	12h b	24	72
<i>risk assessment</i>	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	***	***	n.s.
<i>front paws on the grid</i>	n.s.	n.s.	**	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.
<i>back paws on the grid</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.
<i>self-grooming</i>	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.
<i>tail rattling</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Freezing</i>	***	***	***	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Resting</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.
<i>go down forward</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>go down backward</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*** ^{neg}	n.s.
<i>Rearing</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>contact to platform</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

In der Tabelle 7 sind die Korrelationen zwischen den in der linken Spalte eingetragenen Verhaltensweisen der Gruppe 2/betreten und den Latenzzeiten zu jedem Zeitpunkt des *Retests* dargestellt. Bei einigen Zeitpunkten (1h, 12h a, 12h b und 24h) korreliert das *risk assessment* hoch signifikant mit der Latenzzeit. Das *Freezing*-Verhalten korreliert bei den kleineren Zeitabständen und bei dem Zeitpunkt 12h a mit der Latenzzeit in dieser Gruppe. Das Verhalten *resting* zeigt nur zu dem Zeitpunkt 12h a eine signifikante Korrelation. Das Verhalten ‚*go down backward*‘ ist nur bei 24h signifikant korreliert.

Alle anderen Verhaltensweisen zeigen in dieser Gruppe keine Korrelationen mit der Latenzzeit.

Tabelle 8 Korrelationen nach Pearson im Retest Gruppe 2/nicht betreten

Verhaltensparameter	Zeitpunkte								
	1	3	4,5	6	9	12h a	12h b	24	72
<i>risk assessment</i>	n.s.	n.s.	***	***	***	***	***	n.s.	n.s.
<i>front paws on the grid</i>	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>back paws on the grid</i>	***	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*** ^{neg}	n.s.	n.s.
<i>self-grooming</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>tail rattling</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Freezing</i>	***	n.s.	***	***	***	***	n.s.	n.s.	***
<i>Resting</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.
<i>go down forward</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.
<i>go down backward</i>	*** ^{neg}	*** ^{neg}	n.s.	n.s.	n.s.	*** ^{neg}	*** ^{neg}	n.s.	n.s.
<i>Rearing</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>contact to platform</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

In der Tabelle 8 sind die Korrelationen zwischen den in der linken Spalte eingetragenen Verhaltensweisen der Gruppe 2/nicht betreten und den Latenzzeiten zu jedem Zeitpunkt des

Retests dargestellt. Das Verhalten *Risk assessment* ist bei den ersten beiden Zeitpunkten des *Retest* (1h und 3h) und letzten beiden Zeitpunkten des *Retests* (24h und 72h) nicht signifikant korreliert. Zu den anderen Zeitpunkten zeigt dieses Verhalten jedoch eine signifikante Korrelation mit der Latenzzeit. Interessanterweise sind bei dieser Gruppe das Verhalten ‚*go down backward*‘ und ‚*back paws on the grid*‘ beide negativ korreliert. Diese negative Korrelation der Verhaltensweisen tritt auch parallel auf (1h und 12h b). Das *Freezing*-Verhalten zeigt bei vielen Zeitpunkten signifikante Korrelationen.

Tabelle 9 Korrelationen nach Pearson im Retest Gruppe 3

Verhaltensparameter	Zeitpunkte								
	1	3	4,5	6	9	12h a	12h b	24	72
<i>risk assessment</i>	n.s.	***	***	n.s.	***	***	***	***	***
<i>front paws on the grid</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.
<i>back paws on the grid</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>self-grooming</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.
<i>tail rattling</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Freezing</i>	*	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Resting</i>	n.s.	***	n.s.	***	n.s.	***	n.s.	n.s.	n.s.
<i>go down forward</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>go down backward</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
<i>Rearing</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

In der Tabelle 9 sind die Korrelationen zwischen den in der linken Spalte eingetragenen Verhaltensweisen der Gruppe 2/nicht betreten und den Latenzzeiten zu jedem Zeitpunkt des *Retests* dargestellt. Das ‚*Risk assessment*‘ ist auch bei der Gruppe 3 bei vielen Zeitpunkten (außer bei 1h und 6h) signifikant mit der Latenzzeit korreliert. Auch das ‚*Self-grooming*‘ zeigte eine Korrelation mit der Latenzzeit und zwar zum Zeitpunkt 12h a (*Baseline*-Testen morgens; *Retest* abends). *Freezing*-Verhalten ist in dieser Gruppe zwar auch korreliert, allerdings nur bei geringen Zeitabständen (1h, 3h, 4,5h) zwischen *Retest* und *Baseline* und auch nur schwach signifikant. Die Verhaltensweise ‚*go down backward*‘ wird in dieser Gruppe nicht gezeigt.

4.3 Light Cycler

Anhand einiger Rohdaten von der cDNA von naiven Tieren, die als Kalibrator dienten und einem ausgewählten Testtier soll exemplarisch die Problematik, die bei der Auswertung der PCR auftauchte, aufgezeigt werden. Die Rohdaten von NCAM und GAPDH für die naiven Tiere und dem Testtier werden tabellarisch (Tabelle 10) aufgelistet.

Es sei an dieser Stelle noch einmal erwähnt, dass die cDNA der naiven Tiere zuerst *gepooled* und dann aliquotiert wurde. Jedes Aliquot sollte also auch den gleichen cDNA-Gehalt aufweisen. Von jeder RNA, die aus einem Hippocampus extrahiert wurde, wurden drei verschiedene Aliquots revers transkribiert. Von jeder dieser drei cDNA wurden Dreifach-Bestimmungen bei einem PCR-Lauf durchgeführt. Allerdings wurden nicht alle cDNA an einem Tag untersucht.

Von dem Mix für die Kalibrierungsgerade wurde soviel angesetzt, dass sie für die PCR eines jeden Gens an einem Tag reichte.

Tabelle 10 Ergebnisse von zwei verschiedenen PCR-Läufen für GAPDH und NCAM

NCAM			GAPDH			
naiv	Aliquot cDNA I	Aliquot cDNA II	Aliquot cDNA I	Aliquot cDNA II		
	1206	1046	1405	631		
	1272	886	1448	580		
	1250	856	1469	587		
NCAM			GAPDH			
Tier 1	cDNA I	cDNA II	cDNA III	cDNA I	cDNA II	cDNA III
	903	544	348	118	812	167
	893	601	332	126	711	174
	813	638	262	131	787	259

In der Tabelle 10 sind die Daten nach Bearbeitung mit der *Light Cycler Software* dargestellt. Die grau unterlegten Daten wurden an einem Tag ermittelt und die nicht unterlegten Daten an einem anderen. ‚Aliquot cDNA I‘ der naiven Tiere, ‚cDNA I‘ und ‚cDNA III‘ des Testtieres, wurden in einem Lauf für GAPDH und in einem anderen Lauf an demselben Tag für NCAM bestimmt. ‚Aliquot cDNA II‘ der naiven Tiere und die ‚cDNA II‘ des Testtieres an einem anderen Tag. Die Bestimmungen für die Gene NCAM und GAPDH werden mit derselben cDNA durchgeführt. Es werden jeweils unterschiedliche Primer und Sonden für das zu bestimmende Gen eingesetzt.

In der abgebildeten Tabelle ist zu sehen, dass die Triplet-Bestimmungen einer cDNA wenig Varianz aufweisen, während die Unterschiede zwischen den cDNA's im zwei- bis dreifachen Bereich liegen. Dabei ist keine Regelmäßigkeit zu sehen. Damit ist gemeint, dass

Schwankungen, die bei den PCR's von NCAM auftauchen, bei GAPDH nicht vorhanden sein müssen. Dies wird an der cDNA I und III von Tier 1 deutlich (grau unterlegt): Es gibt kaum Abweichungen bei dem Ergebnis der PCR bei GAPDH. Sieht man sich hingegen NCAM an, zeigen die PCR-Ergebnisse erhebliche Unterschiede. Die Ergebnisse der cDNA III sind etwa dreimal so hoch wie die von cDNA I. Auch die cDNA-Aliquots von naiven Tieren, die jeweils den gleichen Gehalt an DNA aufweisen sollten, zeigen erhebliche Schwankungen. Bei den Unterschieden, die hier allein durch die Methodik der Auswertung auftauchen, ist eine Aussage zu Expressionsunterschieden nicht möglich.

V. Diskussion

Die Biologie des Gedächtnisses lässt sich auf zwei verschiedenen Ebenen untersuchen: Auf der Ebene von Hirnstrukturen und Verhalten und auf der Ebene der Moleküle innerhalb der Nervenzellen. Die Synthese dieser beiden Ebenen war das Thema dieser Arbeit: Es sollte ein Verhaltenstest für Mäuse etabliert und anschließend die lerninduzierte Genexpression bestimmter Zelladhäsionsmoleküle auf RNA-Ebene mit der Real-Time-PCR untersucht werden.

Es gibt einige Veröffentlichungen, die die Einbeziehung vor allem von NCAM in Lerntests an Ratten bzw. Hühnern untersuchen (z.B. Doyle et al., 1992; Mileusnic et al., 1999; Foley et al., 2000). Diese Ergebnisse wurden allerdings erzielt, indem den Tieren zu bestimmten Zeitpunkten vor, nach oder während der Tests Antikörper gegen die zu untersuchenden Moleküle injiziert wurden. Diese Untersuchungen fanden also auf der Proteinebene statt. Es kann daher keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Zelladhäsionsmoleküle nach dem Lernereignis neu synthetisiert oder nur aktiviert werden. Ein Nachteil der Injektionen ist, dass es sich hierbei um eine invasive Methode handelt: Die Antikörper müssen in die einzelnen Gehirnareale appliziert werden, und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch diese Behandlung an sich eine Beeinflussung des Tieres in seinem Verhalten hervorgerufen wird.

5.1 Step-Down-Avoidance-Test

Ursprünglich wurden die für die Laboruntersuchungen konzipierten Verhaltenstests hauptsächlich mit Ratten durchgeführt. Ratten sind sehr intelligente Tiere, die die assoziativen Aufgaben solcher Tests meist schnell lösen können. Die kognitiven Leistungen von Mäusen sind deutlich schlechter. Daher ist es auch kaum möglich, Mäuse an bestimmte Situationen zu gewöhnen, so dass sie nicht mit Stress- oder Angstverhalten reagieren. Die Verhaltenstests für Ratten sind also für Mäuse nur bedingt geeignet.

Aufgrund der Kenntnisse, die man über das Genom von Mäusen besitzt und der gentechnischen Möglichkeiten, Gene bei Mäusen „auszuknocken“, um damit mehr über die Funktion des Gens zu erfahren, setzt sich die Maus als Versuchstier in der Grundlagenforschung jedoch mehr und mehr durch. Die Problematik, die hierbei auftaucht, ist der Versuch, die ursprünglich für Ratten konzipierten Verhaltenstests auf Mäuse anzuwenden, ohne die Durchführung oder das Testdesign an die Spezies Maus zu adaptieren. Dadurch stellt sich noch ein anderes Problem: es liegen keine Standards zum Versuchsaufbau oder zur Versuchsdurchführung vor. Selten findet man auch in Publikationen Hinweise auf die Einzelheiten der Testdurchführung (z.B. Lichtstärke, Testzeitpunkt, Haltung der Tiere usw.) oder des Testaufbaus (z.B. Größe der Testapparatur, Material der Apparatur usw.) (Yoshimi

und Iwata, 1995; Hascoet et al., 2001). Dies sind jedoch Parameter, die das Verhalten eines Tieres beeinflussen können und die für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse maßgeblich sind. Die einzelnen Faktoren des *Step-Down-Avoidance-Tests*, die einen Einfluss auf das Verhalten haben können, sollen deshalb hier diskutiert werden.

5.1.1 Fußschock

Assoziatives Lernen ist auf zwei verschiedenen Wegen möglich: durch positive (belohnende) oder negative (bestrafende) Erfahrung nach Ausführen einer bestimmten Handlung. Im Allgemeinen sind bei dem Training mit positiver Verstärkung mehrere Trainingsdurchgänge erforderlich, während das Tier bei negativer Erfahrung meist nach bereits einem Durchgang sein Verhalten ändert. Die Erklärung für dieses Phänomen ist darin begründet, dass jedes Lebewesen bemüht ist, Schaden an seinem Körper zu vermeiden. Dazu müssen Tiere nach einem einmaligen Ereignis in der Lage sein, sich eine schlechte Erfahrung zu merken, um sich daraufhin anders zu verhalten, z. B. diese Situation zu vermeiden. Bei einem positiven Erlebnis hingegen nimmt das Tier keinen existentiellen Schaden. Es besteht also für das Tier kein zwingender Grund, sein Verhalten zu ändern.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen dieser Arbeit war es notwendig, den Lernzeitpunkt des Tieres genau zu kennen. Daher wurde aus den oben genannten Gründen ein Bestrafungsreiz in Form eines Fußschocks gewählt. Auch hierdurch ergeben sich bei der Durchführung Probleme: Die Maus ist aufgrund ihrer Biologie als Beutetier sehr flink und versucht, durch Hochspringen mit allen vier Pfoten, dem Stromschlag zu entgehen. Demzufolge erhalten manche Tiere nicht die gesamte Zeit von 500msec einen Stromschlag. Dadurch wird eine Variation im Verhalten der Tiere in diesem Test verursacht. Eine andere Variation wird dadurch hervorgerufen, dass die Tiere das Gitter nicht gleichmäßig betreten, das bedeutet, dass der Widerstand (die Maus auf dem Gitter) unterschiedlich groß ist. Folglich ist der Stromfluss (Ohm'sches Gesetz) nicht bei jedem Tier gleich. Ergebnisse von Kohno et al. (1998, 1999) zeigen jedoch den Einfluss der Stromstärke auf das Lernverhalten. Je größer die Stromstärke oder Dauer des Stromflusses gewählt wurde, desto längere Latenzzeiten zeigen die Tiere. Allerdings wurde keine Publikation gefunden, in der die tatsächlichen Ströme (Ist-Werte), die die Tiere erhalten haben, angegeben wurden. Im Allgemeinen findet man in der Literatur nur Angaben über die Stromstärken, die am Gerät einstellbar sind und verabreicht werden sollten (Soll-Werte). In dieser Arbeit wurde der Ist-Wert der Stromstärke, den die Tiere abbekommen haben, mit Hilfe eines analogen Messwandlers auf einem LC-Display dargestellt. Tiere, die nur einen geringen oder keinen Strom abbekommen haben, wurden ausgeschlossen.

Der Fußschock stellt einen großen Stressor für das Tier dar (Dunn et al., 1988). Daher wurde versucht, die anderen Testparameter so stressfrei wie möglich zu gestalten, z.B. betrug die Lichtstärke bei der Versuchsdurchführung nur 25Lux.

5.1.2 Habituation

Mäuse vermeiden instinktiv aufgrund ihrer Stellung in der Nahrungskette als Beutetier nach Möglichkeit offene Flächen, da sie dort von Fressfeinden aus der Luft leichter entdeckt werden können. Aufgrund dieses Verhaltens und vermutlich Explorationsverhalten haben sie die Plattform im *Step-Down-Avoidance-Test* meist sofort verlassen und das Gitter betreten, wenn sie auf die Plattform gesetzt wurden. Dadurch war es ihnen vermutlich nicht möglich, die Assoziation ‚Plattform ist sicher‘ zu knüpfen. Es wurde daraufhin ein Plexiglas-Zylinder gefertigt, der die Fläche der Plattform umrundete. Die Tiere wurden zu Testbeginn in dem Zylinder auf die Plattform gesetzt. Dadurch sollten sie gezwungen werden, sich mit ihrer nächsten Umgebung, der Plattform auseinanderzusetzen. Dies wurde noch dadurch unterstützt, dass der Zylinder beim Testen der *Baseline* umwickelt war, so dass die Maus nicht ihr näheres Umfeld betrachten konnte. Nach 60sec Habituationszeit wurde der Zylinder entfernt. Ebenso wurde beim *Retest* nach den einzelnen Zeitpunkten verfahren. Allerdings war beim *Retest* der Zylinder nicht mehr umwickelt, da sich das Tier zu dieser Zeit an den Test und die Umgebung erinnern sollte.

5.1.3 Plattform

Da Mäuse u. a. durch Alarm-Pheromone Informationen an ihre Artgenossen weitergeben (Rottman und Snowdon, 1972) und damit das Verhalten untereinander beeinflussen können, musste die Plattform so konzipiert sein, dass sie leicht zu reinigen und für das Tier angenehm war. Deshalb wurde sie mit einer rauhen Kunststoffoberfläche beschichtet. Die Plattform musste im Verhältnis zur Größe der Maus groß genug sein, um dem Tier die Möglichkeit zu geben, diese Plattform zu erkunden. Zusammen mit der Größe spielt auch die Höhe der Plattform eine Rolle: Die Plattform sollte sich deutlich vom Metallgitter abheben, um der Maus die Assoziation ‚Plattform ist sicher‘ zu erleichtern. Die bei den Versuchen verwendete Plattform von 1,3cm Höhe und einer Kantenlänge von 11cm, stellte sich durch die Ergebnisse von Vorversuchen am geeignetsten heraus.

5.1.4 C57BL/6J-Mäuse

Der C57BL/6J-Inzuchtstamm wurde eingesetzt, weil er zum einen der am häufigsten verwendete Inzuchtstamm für Verhaltensexperimente ist und zum andern, weil diese Mauslinie oft Hintergrundstamm von gentechnisch veränderten Mäusen ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen als Grundlage für die Tests an ko-Tieren im Institut von Frau Prof. Schachner dienen, um Unterschiede im Verhalten der Tiere explizit auf das Fehlen eines bestimmten Gens zurückführen zu können. Daher war es wichtig, das Verhalten der Inzuchtlinien in den unterschiedlichen Tests genau zu analysieren.

Koop (2001) beschreibt das Aktivitätsmuster von C57BL/6J Mäusen unter einem 12h-Hell:12h-Dunkel-Zyklus. Die Mäuse zeigen in den ersten sechs Stunden der Dunkelphase die höchste Aktivität. In der zweiten Hälfte geht die Aktivität um ca. die Hälfte zurück. Während der Hellphase zeigen die Tiere keine nennenswerte Aktivität. Der Übergang von einer Phase zur anderen verläuft bei diesen Tieren im Aktivitätsmuster abrupt.

Kontrollgruppen

Ein Ziel dieser Arbeit sollte die Untersuchung der lerninduzierten Expression von Zelladhäsionsmolekülen sein. Das bedeutete, falls Änderungen zu messen waren, mussten diese explizit auf das Lernereignis zurückzuführen sein, denn es konnte durchaus sein, dass auch andere Faktoren, wie Exploration und Kennenlernen der *Step-Down-Avoidance*-Apparatur die Genexpression beeinflussen. Daher mussten geeignete Kontrollgruppen gefunden werden, die es ermöglichten, eine Aussage über die Korrelation von Verhalten und Genexpression zu treffen (Abbildung 24). Um die Details der einzelnen Gruppen nochmals vor Augen zu haben, wird die Abbildung hier noch einmal gezeigt.

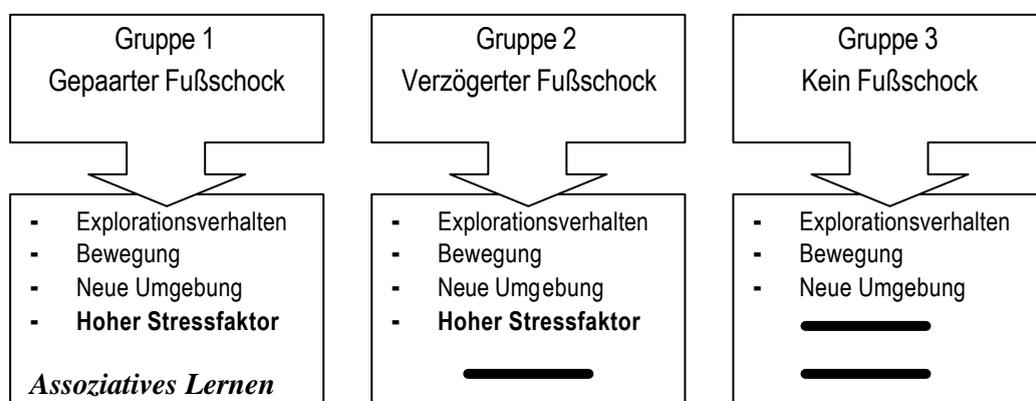


Abbildung 24 (entspricht Abbildung 11) Auswahl der Kontrollgruppen

5.1.5 Erhöhung der Latenzzeiten bei den Kontrollgruppen

Im Allgemeinen wird für diese Art von Verhaltenstests, wie er in dieser Arbeit angewendet wurde (*passive / active avoidance*), ein Anstieg in der Latenzzeit im *Retest*, im Vergleich zum *Baseline*-Testen, als Lernverhalten definiert (Jodar et al., 1995). Insgesamt gesehen zeigen die Tiere der Gruppe 1, wie erwartet, bei allen Zeitpunkten des *Retests* die längsten Latenzzeiten (Abbildung 12). Aber auch die Gruppe 2 und die Gruppe 3 zeigen einen Anstieg der Latenzzeiten in den *Retests*, wobei bei der Gruppe 3 kein Lernereignis stattgefunden haben kann.

Anstieg der Latenzzeit in Gruppe 3

Der Anstieg beim *Retest* in der Latenzzeit der Gruppe 3 könnte folgende Ursachen haben: zum einen kennen die Tiere zum Zeitpunkt des Wiedertestens die Testapparatur. Deshalb könnte ihr Explorationsverhalten weniger ausgeprägt sein. Dadurch verlassen die Tiere die Plattform langsamer, weil diese *per se* als Untergrund angenehmer für die Tiere ist, als das Metallgitter. Zum andern erscheint es durchaus möglich, da die Tiere alternierend aus jeder Gruppe getestet wurden, dass die Tiere aus Gruppe 2 oder Gruppe 1 während des *Baseline*-Testens oder während des *Retests* Alarm-Pheromone über ihren Urin abgegeben haben. Für diese Theorie spricht das schwach signifikante *Freezing*-Verhalten ($p < 0,05$) in der Gruppe 3 bei den Zeitpunkten 1h, 3h, 4,5h (Tabelle 9). *Freezing*-Verhalten wird im Allgemeinen jedoch von Tieren gezeigt, die einem fremden oder schädlichen Stimulus ausgesetzt werden (Denenberg et al., 1967). Vermutlich werden die Pheromone abgegeben, wenn die Tiere den Fußschock erhalten. Hierbei wurde besonders häufig das Absetzen von Urin beobachtet. Obwohl die SDA-Apparatur nach jedem Tier mit Seifenlösung und Ethanol gereinigt wurde, kann es durchaus sein, dass sich Moleküle der Pheromone in der Luft oder an der Apparatur befunden haben. Nach dem Zeitpunkt 4,5h zeigen die Tiere keine Korrelation von *Freezing*-Verhalten und längerer Latenzzeit mehr in Gruppe 3. Eventuell sind zu dieser Zeit die Duftmoleküle unwirksam geworden.

Ein Anstieg in der Latenzzeit der Gruppe 2 ist jedoch eindeutig auf die Tatsache zurückzuführen, dass die Tiere zwischen dem Verlassen der Plattform und Erhalten des Schocks die Plattform wieder betreten haben.

Wiederbetreten und nicht Wiederbetreten der Plattform in Gruppe 2

Die Gruppe 2 stellt eine der beiden Kontrollgruppen dar. Diese Gruppe sollte zwar den gleichen Umweltfaktoren, vor allem dem hohen Stressfaktor des Fußschocks ausgesetzt werden, sollte jedoch kein assoziatives Lernen zeigen (Abbildung 24). Um dies zu erreichen,

wurden die Tiere mit einer Verzögerung von 60sec nach dem Heruntertreten von der Plattform geschockt. Es stellte sich als problematisch heraus, den richtigen Zeitraum zwischen Heruntertreten und Schockgabe zu finden. Bei zu kurzem Zeitabstand (kleiner als 30sec) zwischen Heruntertreten von der Plattform und Schockgabe assoziierten die Tiere, genauso wie in der Gruppe 1, das Heruntertreten mit dem Schock. Bei zu langem Zeitabstand (länger als 30sec) bestand die Gefahr, dass die Tiere die Plattform während der Zeit zwischen Heruntertreten und Schockgabe erneut die Plattform bestiegen, weil die Tiere Explorationsverhalten zeigten. Beim Verlassen der Plattform wurde die Zeit bis zur Schockgabe auch erneut gestartet, so dass vom Heruntertreten bis zum Schock für alle Tiere der gleiche Zeitabstand eingehalten wurde. Trotzdem zeigten diese Tiere einen starken Anstieg in ihrer Latenzzeit, wenn sie die Plattform wieder betreten hatten. Ihre Latenzzeit liegt in etwa so hoch wie die der Gruppe 1. Wishaw et al. (1998; 1999) beschreiben, dass Ratten sich aufgrund von olfaktorischen Merkmalen eine Landkarte einer neuen Umgebung erstellen können, die ihnen bei der Orientierung hilft. Bei anderen Nagetieren ist ein ähnliches Verhalten beschrieben worden. Sie kehren immer wieder zu einem Ausgangspunkt zurück, um sich von dort aus neu zu orientieren. Beide Verhaltensweisen könnten auch im *Step-Down-Avoidance-Test* von den Mäusen durchgeführt werden. Beide Verhaltensweisen werden auch als hippocampusabhängig beschrieben (Shors et al., 2002; Macrides et al., 1975). Dass es sich bei den Tieren, die die Plattform wieder betreten, tatsächlich um Lernverhalten handelt, ist erstens daran zu sehen, dass dieser Effekt bei fast allen Zeitpunkten (bis auf Zeitpunkt 1h und 9h) des *Retest* auftaucht. Zweitens gibt es in dieser Gruppe bei vielen Zeitpunkten zwischen *Freezing*-Verhalten und langer Latenzzeit eine hoch signifikante Korrelation. Interessanterweise zeigen manche Tiere der Gruppe 2, die die Plattform nicht wieder betreten haben, ein deutlich aversives Verhalten gegen die Plattform, was sich durch die Verhaltensweise *avoid to contact platform* während der Habituationszeit des *Retests* geäußert hat.

Es bleibt also festzuhalten, dass diese Gruppe durchaus in der Lage war, die Assoziation ‚Plattform ist sicher‘ zu knüpfen, wenn sie die Plattform vor der Schockgabe wieder betreten hat.

5.1.6 Einfluss der circadianen Rhythmik auf die Latenzzeiten

Es gibt viele Verhaltensweisen von Nagetieren, die durch unterschiedliche Lichtintensitäten oder unterschiedliche Lichtdauer beeinflusst werden. Hierzu zählen z.B. das emotionale Verhalten und die Gedächtnisausbildung (Kopp, 2001). Es ist offensichtlich, dass die Verhaltensantworten eines Tieres in strenger Beziehung zu seinem Aktivitätsniveau stehen.

Daher ist es für verhaltensbiologische Studien von Interesse, den Zusammenhang zwischen dem Testzeitpunkt und dem täglichen Aktivitätsmusters aufzuklären (Kopp, 2001).

Das *Baseline*-Testen wurde bei allen Zeitpunkten (außer 12h b) morgens in der Zeit von 9.00h-12.00h (da im Tierraum und im Verhaltenslabor ein inverser Hell-Dunkel-Zyklus herrschte, also während der aktiven Phase der Tiere) durchgeführt. Da der *Retest* nach unterschiedlichen Zeiten nach dem *Baseline*-Testen stattfand, variieren hierfür die Zeitpunkte. Zum Teil wurden die Mäuse schon morgens wiedergetestet (1h-Wert), andererseits aber auch erst am späten Nachmittag (9h-Wert). Durch diese unterschiedlichen Zeitpunkte des *Retests* wird ein Einfluss der circadianen Rhythmik auf die Testergebnisse nicht ausgeschlossen.

Dies wird an den Ergebnissen der *Retests* nach 9h und nach 12h deutlich. Wurden die Tiere nach 9h getestet, lag der *Retest* kurz vor Ende der aktiven Phase der Mäuse, ca. um 18.00h. Bei dem Wiedertesten nach 12h war es unvermeidbar, den Hell-Dunkel-Wechsel zu schneiden. Dies bedeutete, dass die Tiere zum Zeitpunkt 12h a während ihrer inaktiven Phase wiedergetestet wurden (nachdem das Licht im Tierraum anging, ca. 21.00h). Bei dem Zeitpunkt 12h b fand der *Retest* morgens ab 9.00h statt (die Tiere wurden dementsprechend abends um 21.00h in ihrem *Baseline*-Verhalten getestet). Bei dem 4,5h-Zeitpunkt fand der *Retest* jeweils um die Mittagszeit statt.

Glass et al. (2000) beschreiben einen Einfluss von PSA-NCAM auf das circadiane Aktivitätsmuster der Mäuse. Parallel zu der natürlichen Abnahme von PSA-NCAM im suprachiasmatischen Nucleus (SCN) fehlt älteren Tieren die Anpassungsfähigkeit an eine lichtinduzierte Phasenverschiebung. Jüngeren Tieren, bei denen größere Mengen von PSA-NCAM im SCN nachweisbar sind, zeigen bei der Adaptation keine Probleme. Die Autoren schließen daraus, dass PSA-NCAM bei der lichtinduzierten Phasenverschiebung eine Rolle spielt. Da PSA-NCAM auch bei der synaptischen Plastizität eine Rolle spielt, liegt der Schluss nahe, dass PSA-NCAM durchaus das Lernen zu bestimmten Zeitpunkten forcieren oder hemmen könnte. Vor allem, weil der Lerntest nicht bei völliger Dunkelheit, sondern bei einer schwachen Lichtintensität durchgeführt wurde. Vielleicht reichte dieser Stimulus bereits aus, um einen Einfluss auf die PSA-NCAM-Expression im SCN auszuüben. Es liegen jedoch leider noch keine Ergebnisse über die Expressionsunterschiede von PSA-NCAM im SCN während 24h oder nach einem Lernereignis vor, so dass an dieser Stelle über den Einfluss des SCN auf das Lernverhalten nur spekuliert werden kann.

Verhalten der Tiere zu den Testzeitpunkten 12h a und 12h b

An den beiden Diagrammen (Abbildung 23) ist deutlich der Einfluss der Tageszeit auf das Verhalten der Tiere zu erkennen. In dem linken Diagramm wurden die Tiere morgens (ab ca. 9.00h) in ihrer *Baseline* getestet und abends wiedergetestet. Der *Retest* fand also während der Zeit statt, wenn die Tiere eher ruhen. Die Ergebnisse dieses Tests zu diesem Zeitpunkt zeigen bei der Gruppe 3 einen deutlichen Anstieg in der Latenzzeit, verglichen mit allen anderen Zeitpunkten des *Retests*. Da diese keine negativen Erfahrungen gemacht haben, verbringen sie die meiste Zeit während des *Retest* mit *Resting*. Die Korrelation von *Resting* mit der Latenzzeit ist in dieser Gruppe ist hoch signifikant. Bei der Gruppe 2/nicht betreten wurde auch ein hoch signifikant korreliertes *Resting*- und *Freezing*-Verhalten beobachtet. Das gleiche Ergebnis gilt für die Gruppe 2/betreten und Gruppe 1. Zu keinem anderen Zeitpunkt zeigen alle Gruppen gemeinsam ein so ausgeprägtes *Resting*-Verhalten, so dass ein Teil des Anstiegs in der Latenzzeit auf den Zeitpunkt des *Retests* zurückzuführen ist.

Abbildung 23b zeigt die Latenzzeiten der Gruppen bei Durchführung des *Retests* am Morgen. Das *Baseline*-Testen fand dementsprechend am Abend davor statt. Diese Gruppe unterscheidet sich in ihrem Protokoll deutlich von den anderen Zeitpunkten, weil das *Baseline*-Testen sonst immer morgens ab 9.00h in der aktiven Phase der Tiere gelegt wurde. Zu diesem hier diskutierten Zeitpunkt findet das *Baseline*-Testen während der Ruhephase der Tiere statt. Die Ergebnisse zeigen ein deutliches Lernverhalten in der Gruppe 1 und kaum eine Erhöhung in der Latenzzeit bei der Gruppe 3. Damit lässt sich festhalten, dass nicht der Zeitraum zwischen dem *Baseline*-Testen und dem *Retest* entscheidend für die Ergebnisse war, sondern die Zeit der Testdurchführung.

Es wird in der Literatur der Einfluss von ‚Schlafen‘ auf das Gedächtnis diskutiert (Nitz und McNaughton, 1999; Ribeiro et al., 1999). Am Beispiel der Latenzzeit der 1h-Werte, bei dem die Tiere nicht viel Zeit während des *Baseline*-Testens und des *Retests* haben, bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Dies kann aber auch darin begründet liegen, dass hier die Speicherung von Gedächtnisinhalten noch nicht voll abgeschlossen ist. Zu ca. diesem Zeitpunkt findet ein Umschalten von Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis statt. Bei dem Zeitraum von 12h und dem *Baseline*-Testen am Abend umspannt dieser Zeitraum die gesamte passive Zeit der Mäuse. Das Lernverhalten ist deutlich besser als zum Beispiel nach 6h. Auch bei den späteren Zeitpunkten (24h, 72h) zeigen die Tiere ein deutlich besseres Lernverhalten als zu den früheren Zeitpunkten, obwohl das Ereignis Fußschock viel weiter zurückliegt. Diese Ergebnisse können ebenfalls daraufhin deuten, dass Schlaf- bzw. Ruhepausen unbedingt notwendig sind, um Gelerntes für längere Zeit abzuspeichern.

5.1.7 Verhaltensweisen der Tiere im *Step-Down-Avoidance-Test*

Freezing-Verhalten

Dieses Verhalten hat seinen Ursprung im periaquäductalem Grau (Substantia grisea periaqueductalis) (Amorapanth et al., 1999).

Es handelt sich bei diesem Gebiet um eine Ansammlung grauer Substanz, die im Mittelhirn unmittelbar das Aquädukt umscheidet und kann als Gebiet der *Formatio Reticularis* aufgefasst werden. Dieser Kernkomplex generiert bzw. koordiniert über intensive Faserverbindungen zum limbischen System Angst- und Fluchtreflexe. Über absteigende Bahnen ins Rückenmark und zu monoaminergen Zellgruppen nimmt das Kerngebiet entscheidenden Einfluss auf die endogene Schmerzunterdrückung.

Freezing-Verhalten konnte während des *Step-Down-Avoidance-Tests* bei allen Gruppen beobachtet werden, jedoch nie während des *Baseline*-Testens (Tabelle 3), sondern nur während der *Retests* (Tabelle 4 und 5). In den Gruppen 1 und 2 zeigt dieses Verhalten eine hoch signifikante positive Korrelation mit der Latenzzeit, während es in der Gruppe 3 nur schwach signifikant korreliert. Es wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass die Gruppe 3 dieses Verhalten nicht zeigt. Ein Einfluss von Pheromonen, die von den Tieren der Gruppe 1 und 2 abgegeben wurden, wird unter ‚Anstieg der Latenzzeit in Gruppe 3‘ diskutiert.

Das *Freezing*-Verhalten ist in der Gruppe 1 bei allen Zeitpunkten, bis auf 12h a hoch signifikant mit einem langen Sitzenbleiben auf der Plattform korreliert. Aufgrund der Funktion, die das periaquäductale Grau besitzt, wird deutlich, warum die Tiere mit diesem Verhalten auf einen Fußschock reagieren. Das bedeutet, dass diese Tiere eindeutig die Assoziation ‚Plattform ist sicher‘ geknüpft haben und deshalb mit *Freezing*-Verhalten reagieren. Das *Freezing*-Verhalten stellt also ein sicheres Kriterium dar, das Lernverhalten in diesem Verhaltenstest zu charakterisieren. Dieses sehr robuste Verhalten wird bei einem anderen Verhaltenstest, dem *Fear Conditioning* ebenfalls als Parameter gewählt, ob eine Ratte oder Maus einen Ton mit einem Fußschock assoziiert. Wird nach mehreren Paarungen der Fußschock nicht mehr gegeben, zeigen die Tiere *Freezing*-Verhalten nur bei der Präsentation des Tons (siehe Anhang, Tang et al., 2001).

In der Gruppe 2, die unterteilt wurde in ‚Plattform betreten‘ und ‚Plattform nicht betreten‘ taucht ebenfalls eine hoch signifikante Korrelation zwischen Latenzzeit und *Freezing*-Verhalten auf. Allerdings nicht in der Regelmäßigkeit wie bei der Gruppe 1. Dies kann mit der Anzahl der Tiere zusammenhängen, da diese Gruppe erst während der statistischen Untersuchungen in die Untergruppen ‚betreten‘ und ‚nicht betreten‘ aufgeteilt wurde.

Verhalten ‚*Go down backward*‘

Da während der Videoanalyse der Eindruck entstand, dass nur Tiere die Plattform rückwärts verließen, die eine kurze Latenzzeit hatten, und es sich nur um Tiere der Gruppen 1 und 2 handelte. Deshalb wurde dieses Verhalten ebenfalls auf Korrelation mit der Latenzzeit untersucht. Die statistischen Ergebnisse bestätigten den Eindruck: nur Tiere der Gruppen 1 und 2 mit einer kurzen Latenzzeit verlassen die Plattform mit den Hinterpfoten zuerst. Die Gruppe 3 zeigt dieses hoch signifikant negativ korrelierte Verhalten nicht. Man könnte dieses Verhalten jedoch vielleicht als ‚Zurückziehen aus einer Situation‘ interpretieren. Die Tiere haben eine schlechte Erfahrung (Fußschock) in einer bestimmten Umgebung gemacht (der SDA-Apparatur). Sie möchten aus dieser Umgebung entweichen und weichen zurück. Es könnte auch sein, dass die Tiere eine andere Assoziation geknüpft haben, als die gewollte ‚Plattform ist sicher‘. Die Tiere zeigen im Allgemeinen Explorationsverhalten, d. h. sie gehen mit dem Kopf und den Vorderpfoten voran, wenn sie die Plattform verlassen. Damit haben sie schlechte Erfahrung gemacht und assoziieren jetzt ‚rückwärts ist sicher‘.

Verhalten ‚*Risk assessment*‘

Risk assessment wird als Verhaltenskriterium zur Ängstlichkeitsbestimmung im *Elevated Plus Maze* eingesetzt. Das *Elevated Plus Maze* besteht aus einem Kreuz, bei dem zwei gegenüberliegende Arme mit Wänden (geschlossene Flächen) versehen sind und die anderen beiden Arme nicht (offene Flächen). Das Kreuz befindet sich ca. einen Meter über dem Boden. Es werden in diesem Test die Eintritte des Tieres in die geschlossenen und offenen Arme gezählt. Die Ergebnisse geben dann Aufschluss über die Ängstlichkeit des Tieres, da ängstliche Tiere sich überwiegend in den geschlossenen Armen aufhalten. Es wird mit diesem Test häufig die Wirkung von Anxiolytika untersucht.

Häufig wechselt das Tier nicht sofort in einen anderen Arm, sondern zeigt *Risk assessment*. Es streckt nur den Kopf und/oder die Vorderpfoten aus dem Arm heraus, ohne ihn zu verlassen. Oft wird dieses Verhalten mehrmals hintereinander gezeigt, bis das Tier den Arm wechselt.

Im *Step-Down-Avoidance-Test* wurde dieses Verhalten ebenfalls beobachtet, bevor die Tiere die Plattform verlassen haben. Diese Verhaltensweise war bei allen Gruppen hoch signifikant mit der Länge der Latenzzeit korreliert und war bei der Gruppe 3 besonders ausgeprägt. Hier war dieses Verhalten, abgesehen vom 1h *Retest* und 6h *Retest*, bei jedem Zeitpunkt hoch signifikant korreliert.

Dieses Verhalten wird hier vermutlich aus einer anderen Intention heraus gezeigt als beim *Elevated Plus Maze*, da es auch in der Gruppe 3 intensiv gezeigt wird. Ein Zusammenhang mit dem Fußschock wird daher ausgeschlossen. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte

das unterschiedliche Material von Plattform und Metallgitter sein. Die Tiere empfinden vermutlich die Oberfläche der Plattform als angenehmer. Daher wollen die Tiere einerseits auf der Plattform bleiben, andererseits zeigen sie aber auch natürliches Explorationsverhalten und wollen die Plattform verlassen. Das Resultat dieses Zwiespalts wäre dann das *Risk assessment*. Es soll an dieser Stelle aber nicht ausgeschlossen werden, dass Tiere der Gruppe 1 und 2, die die Assoziation ‚Plattform ist sicher‘ geknüpft haben, in einem ähnlichen Zwiespalt stecken. Einerseits wollen auch diese Tiere ihrem Bewegungsdrang nachgeben, andererseits haben sie beim Heruntertreten von der Plattform schlechte Erfahrungen gemacht. Da die Ursache für dieses Verhalten (komfortable Oberfläche der Plattform oder Assoziation) nicht eindeutig bestimmt werden kann, ist dieses Verhalten nicht zur Definition von Lernverhalten in diesem Test geeignet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es nicht ausreicht, im *Step-Down-Avoidance-Test* von Mäusen nur die Latenzzeiten anzusehen, um eine Aussage zum Lernverhalten treffen zu können.

Der Einfluss des Testzeitpunktes ist zu groß. Aufgrund der ultradianen Rhythmik der Tiere wechseln sich aktive Phasen und Ruhephasen bei den Tieren ab. Diese Phasen nehmen großen Einfluss auf die Latenzzeit, da die Tiere in einer Ruhephase auch weniger Explorationsverhalten zeigen und damit die Plattform später verlassen, ohne dass sie etwas gelernt haben können (Abbildung 23, Gruppe 3).

Eine Verhaltensweise, die aufgrund ihres Ursprungs und ihres robusten Effektes als geeignet zur Beurteilung von ‚Tier hat gelernt‘ und ‚Tier hat nicht gelernt‘ erscheint, ist das *Freezing*-Verhalten. Es wird auch im *Fear-Conditioning* als Lernkriterium angewendet. Damit können die Ergebnisse des *Step-Down-Avoidance-Test* dieser Arbeit eine Grundlage für die Standardisierung dieses Tests sein.

5.2 Light-Cycler Ergebnisse

Es sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob es eine lerninduzierte Expression von bestimmten Zelladhäsionsmolekülen gibt. Falls Expressionsunterschiede vorhanden wären, würden diese vermutlich nicht sehr groß ausfallen, dies konnte durch Vorversuche sowohl mit konventioneller PCR als auch mit der Real-Time-PCR gezeigt werden. Dies war ein großes Problem dar. Es musste eine Methode gefunden werden, die sensitiv genug war und eine quantitative Beurteilung der Ergebnisse erlaubte. Als Methode erster Wahl stellte sich die Real-Time-PCR heraus. Die Ergebnisse von Vorversuchen von Dr. Thomas Laue, Artus

GmbH, Hamburg ließen diese Methode als geeignet erscheinen. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, wurden nicht nur die cDNA der einzelnen Tiere getestet, sondern auch cDNA von Tieren, die zwar unter gleichen Bedingungen wie die anderen Mäuse gehalten wurden, allerdings getötet wurden, als die anderen Mäuse in den SDA gingen. Aus diesen Tieren wurde die RNA isoliert, revers transkribiert, vereinigt und wieder aliquotiert. Die PCR-Ergebnisse dieser naiven Tiere wurden bei der Auswertung gleich eins gesetzt. Die Ergebnisse der anderen Tiere wurden dann zu diesen Zahlen ins Verhältnis gesetzt, um zu sehen, ob eine Regulation der Expression stattgefunden hatte. Doch bei der Auswertung stellte sich heraus, dass die Variation selbst dieser einheitlichen cDNA von PCR zu PCR sehr groß war. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war nicht gegeben. So ist aber auf jeden Fall auszuschließen, dass die hohe Varianz auf Unterschiede bei der Reversen Transkription zurückzuführen sind. Die Variation innerhalb der Proben während einer PCR war sehr gering, so dass ein Pipettierfehler auszuschließen ist (Tabelle 10). Die Ursache der Varianz ist vermutlich zum einen in der Methodik der Auswertung zu suchen, zum andern kann es durchaus möglich, dass mit diesen Bestimmungen die untere Nachweisgrenze des Systems erreicht wurde.

Das Problem dieser Auswertmethoden liegt sicherlich auch darin begründet, dass die Light Cycler Software für die Routine-Diagnostik entwickelt wurde und dafür sehr gut geeignet ist, jedoch nicht zur Quantifizierung.

Bei der Festlegung des Themas für diese Studie war von Anfang an klar, dass die Expressionsunterschiede, wenn vorhanden, sich nur auf einem ganz geringen Niveau bewegen.

Der Light Cycler stellte aufgrund seiner Sensitivität in der Detektion von einer halben log-Stufe das geeignete Instrument für die Untersuchungen in dieser Studie. Bei den Unterschieden, die hier allein durch die Methodik der Auswertung auftauchen, ist allerdings eine Aussage zu Expressionsunterschieden nicht möglich.

VI. Ausblick

Da sich der Light Cycler für diese Untersuchungen als nicht geeignet herausgestellt hat, könnte als nächster Ansatz zum einen versucht werden, die Auswertung der Ergebnisse anders durchzuführen.

Zum andern könnten auch Konkurrenzgeräte, wie z.B. der TaqMan, ausprobiert werden.

Falls es möglich ist, eine Methode zu finden, mit der Expressionsunterschiede gefunden werden können, bietet sich als nächster Schritt die Untersuchung von anderen Hirnregionen an, die beim Verhalten der Tiere im *Step-Down-Avoidance* eine Rolle spielen könnten. Eine Präparation von Cerebellum und präfrontalem Cortex wurde ebenfalls bei der Entnahme der Hippocampi durchgeführt. So könnte auch ein Vergleich zwischen einzelnen Hirnregionen bei demselben Tier angestellt werden.

Ein weiterer Ansatz wäre, vorausgesetzt, Genexpression ist detektierbar, noch andere Gene zu untersuchen. Sehr interessant wäre es z.B., die PSA-Expression zu analysieren.

Dies könnte zum einen mit weiteren Verhaltensversuchen passieren, bei denen man den Tieren zu bestimmten Zeitpunkten Endo-N injiziert. Zum andern könnten auch Primer und Sonden für die Polysialinsäure (PSA) synthetisiert werden, um Regulationsunterschiede zu verschiedenen Zeitpunkten oder auch zeitliche Unterschiede in der Regulation von NCAM und PSA zu finden.

Auf der verhaltensbiologischen Ebene könnte z.B. untersucht werden, ob das Lernen in der Gruppe 2, ‚Plattform betreten‘ ebenfalls hippocampusabhängig ist, wie von Gruppe 1 beschrieben. In diesem Zusammenhang wäre auch interessant zu klären, wie und wann die Assoziation ‚Plattform ist sicher‘ in der Gruppe 2 geknüpft wird.

Eine andere beobachtete Verhaltensweise sollte auf jeden Fall weiter untersucht werden: ‚Go down backward‘. Möglichkeiten zur Interpretation dieses Verhaltens wurden in dieser Arbeit aufgezeigt.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Wirkung der Alarm-Pheromone (Freezing-Verhalten Gruppe 3) oder auch Sexual-Pheromone auf das Verhalten der Tiere im *Step-Down-Avoidance* zu untersuchen. Da häufig bei ko-Linien nicht genügend Tiere eines Geschlechts zur Verfügung stehen, werden oft gemischte Gruppen aus beiden Geschlechtern getestet. Hierbei könnte eine Beeinflussung der Tiere untereinander durch Pheromone z.B. die Varianz der Testergebnisse erhöhen.

Etwas focussierter zu betrachten wäre auch der Einfluss der circadianen Rhythmik auf das Lernverhalten der Tiere. Da PSA sowohl bei der synaptischen Plastizität als auch bei der circadianen Rhythmik involviert ist, wäre es interessant zu wissen, ob PSA eine Schlüsselrolle spielt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wären sicherlich auch von medizinischem Interesse.

VII. Literaturverzeichnis

- Abel, T., Nguyen, P. V., Barad, M., Deuel, T. A., Kandel, E. R. und Bourtchouladze, R.** (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* **88**, 615-626.
- Abel, T., Martin, K. C., Bartsch, D. und Kandel, E. R.** (1998). Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science* **279**, 338-341.
- Abraham, W. C., Mason, S. E., Demmer, J., Williams, J. M., Richardson, C. L., Tate, W. P., Lawlor, P. A. und Dragunow, M.** (1993). Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neuroscience* **56**, 717-727.
- Acheson, A., Sunshine, J. L. und Rutishauser, U.** (1991). NCAM polysialic acid can regulate both cell-cell and cell-substrate interactions. *J. Cell Biol.* **114**, 143-153.
- Aguilera, G., Kapur, S., Feuillan, P., Sunar-Akbasak, B. und Bathia, A. J.** (1994). Developmental changes in angiotensin II receptor subtypes and AT1 receptor mRNA in rat kidney. *Kidney Int.* **46**, 973-979.
- Alexander, M. C., Lomanto, M., Nasrin, N. und Ramaika, C.** (1988). Insulin stimulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression through cis-acting DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **85**, 5092-5096.
- Amorapanth, P., Nader, K. und LeDoux, J. E.** (1999). Lesions of periaqueductal gray dissociate-conditioned freezing from conditioned suppression behavior in rats. *Learn. Mem.* **6**, 491-499.
- Angelov, D. N., Walther, M., Streppel, M., Guntinas-Lichius, O., Neiss, W. F., Probstmeier, R. und Pesheva, P.** (1998). Tenascin-R is antiadhesive for activated microglia that induce downregulation of the protein after peripheral nerve injury: a new role in neuronal protection. *J. Neurosci.* **18**, 6218-6229.
- Anokhin, K. V. und Rose, S. P.** (1991). Learning-induced Increase of Immediate Early Gene Messenger RNA in the Chick Forebrain. *Eur. J. Neurosci.* **3**, 162-167.
- Arami, S., Jucker, M., Schachner, M. und Welzl, H.** (1996). The effect of continuous intraventricular infusion of L1 and NCAM antibodies on spatial learning in rats. *Behav. Brain Res.* **81**, 81-87.
- Bannerman, D. M., Good, M. A., Butcher, S. P., Ramsay, M. und Morris, R. G.** (1995). Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature* **378**, 182-186.
- Barroso, I., Benito, B., Garci-Jimenez, C., Hernandez, A., Obregon, M. J. und Santisteban, P.** (1999). Norepinephrine, tri-iodothyronine and insulin upregulate glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA during Brown adipocyte differentiation. *Eur. J. Endocrinol.* **141**, 169-179.
- Bartsch, D., Ghirardi, M., Skehel, P. A., Karl, K. A., Herder, S. P., Chen, M., Bailey, C. H. und Kandel, E. R.** (1995). Aplysia CREB2 represses long-term facilitation: relief of repression converts transient facilitation into long-term functional and structural change. *Cell* **83**, 979-992.
- Bartsch, U., Pesheva, P., Raff, M. und Schachner, M.** (1993). Expression of janusin (J1-160/180) in the retina and optic nerve of the developing and adult mouse. *Glia* **9**, 57-69.

- Bateman, A., Jouet, M., MacFarlane, J., Du, J. S., Kenwrick, S. und Chothia, C.** (1996). Outline structure of the human L1 cell adhesion molecule and the sites where mutations cause neurological disorders. *EMBO J.* **15**, 6050-6059.
- Bechara, A., Tranel, D., Damasio, H., Adolphs, R., Rockland, C. und Damasio, A. R.** (1995). Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science* **269**, 1115-1118.
- Becker, C. G., Artola, A., Gerardy-Schahn, R., Becker, T., Welzl, H. und Schachner, M.** (1996). The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J.Neurosci.Res.* **45**, 143-152.
- Becker, C. G., Becker, T., Meyer, R. L. und Schachner, M.** (1999). Tenascin-R inhibits the growth of optic fibers in vitro but is rapidly eliminated during nerve regeneration in the salamander *Pleurodeles waltl*. *J.Neurosci.* **19**, 813-827.
- Bereta, J. und Bereta, M.** (1995). Stimulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels by endogenous nitric oxide in cytokine-activated endothelium. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **217**, 363-369.
- Bernabeu, R., Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M., Izquierdo, I. und Medina, J. H.** (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 7041-7046.
- Bernabeu, R., Schroder, N., Quevedo, J., Cammarota, M., Izquierdo, I. und Medina, J. H.** (1997). Further evidence for the involvement of a hippocampal cGMP/cGMP-dependent protein kinase cascade in memory consolidation. *Neuroreport* **8**, 2221-2224.
- Bernabeu, R., Cammarota, M., Izquierdo, I. und Medina, J. H.** (1997). Involvement of hippocampal AMPA glutamate receptor changes and the cAMP/protein kinase A/CREB-P signalling pathway in memory consolidation of an avoidance task in rats. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **30**, 961-965.
- Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Schroder, N., Bromberg, E., Quevedo, J., Schmitz, P. K., Bianchin, M., Walz, R., Schaeffer, E., Medina, J. H. und Izquierdo, I.** (1997). Agents that affect cAMP levels or protein kinase A activity modulate memory consolidation when injected into rat hippocampus but not amygdala. *Braz.J.Med.Biol.Res.* **30**, 967-970.
- Bevilaqua, L. R., Cammarota, M., Paratcha, G., de Stein, M. L., Izquierdo, I. und Medina, J. H.** (1999). Experience-dependent increase in cAMP-responsive element binding protein in synaptic and nonsynaptic mitochondria of the rat hippocampus. *Eur.J.Neurosci.* **11**, 3753-3756.
- Bianchin, M., Da Silva, R. C., Schmitz, P. K., Medina, J. H. und Izquierdo, I.** (1994). Memory of inhibitory avoidance in the rat is regulated by glutamate metabotropic receptors in the hippocampus. *Behav.Pharmacol.* **5**, 356-359.
- Bliss, T. V. und Collingridge, G. L.** (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-39.
- Bontempi, B., Jaffard, R. und Destrade, C.** (1996). Differential temporal evolution of post-training changes in regional brain glucose metabolism induced by repeated spatial discrimination training in mice: visualization of the memory consolidation process? *Eur.J.Neurosci.* **8**, 2348-2360.

- Bourtchouladze, R., Abel, T., Berman, N., Gordon, R., Lapidus, K. und Kandel, E. R.** (1998). Different training procedures recruit either one or two critical periods for contextual memory consolidation, each of which requires protein synthesis and PKA. *Learn.Mem.* **5**, 365-374.
- Brandon, J. G. und Coss, R. G.** (1982). Rapid dendritic spine stem shortening during one-trial learning: the honeybee's first orientation flight. *Brain Res.* **252**, 51-61.
- Brook, G. A., Houweling, D. A. , Gieling, R. G., Hermanns, T., Joosten, E. A., Bar, D. P., Gispen, W. H., Schmitt, A. B., Leprince, P., Noth, J. und Nacimiento, W.** (2000). Attempted endogenous tissue repair following experimental spinal cord injury in the rat: involvement of cell adhesion molecules L1 and NCAM? *Eur.J.Neurosci.* **12**, 3224-3238.
- Brummendorf, T. und Rathjen, F. G.** (1995). Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. *Protein Profile.* **2**, 963-1108.
- Brummendorf, T., Kenwrick, S., und Rathjen, F. G.** (1998). Neural cell recognition molecule L1: from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr.Opin.Neurobiol.* **8** , 87-97.
- Brune, B. und Mohr, S.** (2001). Protein Thiol Modification of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase and Caspase-3 by Nitric Oxide. *Curr.Protein Pept.Sci.* **2**, 61-72.
- Bunsey, M. und Eichenbaum, H.** (1996). Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature* **379**, 255-257.
- Bustin, S. A.** (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* **25**, 169-193.
- Cain, D. P.** (1997). LTP, NMDA, genes and learning. *Curr.Opin.Neurobiol.* **7**, 235-242.
- Cale, J. M., Millican, D. S., Itoh, H., Magness, R. R. und Bird, I. M.** (1997). Pregnancy induces an increase in the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in uterine artery endothelial cells. *J.Soc.Gynecol.Investig.* **4**, 284-292.
- Calvo, E. L., Boucher, C., Coulombe, Z. und Morisset, J.** (1997). Pancreatic GAPDH gene expression during ontogeny and acute pancreatitis induced by caerulein. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **235**, 636-640.
- Cammarota, M., Bernabeu, R., Izquierdo, I. und Medina, J. H.** (1996). Reversible changes in hippocampal 3H-AMPA binding following inhibitory avoidance training in the rat. *Neurobiol.Learn.Mem.* **66**, 85-88.
- Cammarota, M., Paratcha, G., Levi, d. S., Bernabeu, R., Izquierdo, I. und Medina, J. H.** (1997). B-50/GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. *Neurochem.Res.* **22**, 499-505.
- Cammarota, M., Bevilaqua, L. R., Ardenghi, P., Paratcha, G., Levi, d. S., Izquierdo, I. und Medina, J. H.** (2000). Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **76**, 36-46.
- Carnemolla, B., Leprini, A., Borsi, L., Querze, G., Urbini, S. und Zardi, L.** (1996). Human tenascin-R. Complete primary structure, pre-mRNA alternative splicing and gene localization on chromosome 1q23-q24. *J.Biol.Chem.* **271** , 8157-8160.

- Castellucci, V. F., Blumenfeld, H., Goelet, P. und Kandel, E. R.** (1989). Inhibitor of protein synthesis blocks long-term behavioral sensitization in the isolated gill-withdrawal reflex of *Aplysia*. *J.Neurobiol.* **20**, 1-9.
- Celio, M. R.** (1993). Perineuronal nets of extracellular matrix around parvalbumin-containing neurons of the hippocampus. *Hippocampus* **3 Spec No**, 55-60.
- Chang, T. J., Juan, C. C., Yin, P. H., Chi, C. W. und Tsay, H. J.** (1998). Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol.Rep.* **5**, 469-471.
- Chen, R. W., Saunders, P. A., Wei, H., Li, Z., Seth, P. und Chuang, D. M.** (1999). Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and p53 in neuronal apoptosis: evidence that GAPDH is upregulated by p53. *J.Neurosci.* **19**, 9654-9662.
- Chiquet-Ehrismann, R., Hagios, C. und Matsumoto, K.** (1994). The tenascin gene family. *Perspect.Dev.Neurobiol.* **2**, 3-7.
- Choi, J. K., Holtzer, S., Chacko, S. A., Lin, Z. X., Hoffman, R. K. und Holtzer, H.** (1991). Phorbol esters selectively and reversibly inhibit a subset of myofibrillar genes responsible for the ongoing differentiation program of chick skeletal myotubes. *Mol.Cell Biol.* **11**, 4473-4482.
- Church, A. C., Flexner, J. B. und Flexner, L. B.** (1995). Complementary memory storage sites in mice: their development as affected by the competitive NMDA receptor antagonist, CPP. *Pharmacol.Biochem.Behav.* **52**, 237-240.
- Cohen, N. R., Taylor, J. S., Scott, L. B., Guillery, R. W., Soriano, P. und Furley, A. J.** (1998). Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr.Biol.* **8**, 26-33.
- Cole, G. J. und Akeson, R.** (1989). Identification of a heparin binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM using synthetic peptides. *Neuron* **2**, 1157-1165.
- Corkin, S., Cohen, N. J., Sullivan, E. V., Clegg, R. A., Rosen, T. J. und Ackerman, R. H.** (1985). Analyses of global memory impairments of different etiologies. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **444**, 10-40.
- Cremer, H., Lange, R., Christoph, A., Plomann, M., Vopper, G., Roes, J., Brown, R., Baldwin, S., Kraemer, P. und Scheff, S.** (1994). Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* **367**, 455-459.
- Cremer, H., Chazal, G., Carleton, A., Golidis, C., Vincent, J. D. und Lledo, P. M.** (1998). Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 13242-13247.
- Cunningham, B. A., Hoffman, S., Rutishauser, U., Hemperly, J. J und Edelman, G. M.** (1983). Molecular topography of the neural cell adhesion molecule N-CAM: surface orientation and location of sialic acid-rich and binding regions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **80**, 3116-3120.
- Dahme, M., Bartsch, U., Martini, R., Anliker, B., Schachner, M. und Mantei, N.** (1997). Disruption of the mouse L1 gene leads to malformations of the nervous system. *Nat.Genet.* **17**, 346-349.
- Damasio, A. R.** (1995). On some functions of the human prefrontal cortex. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **769**, 241-251.

- Davis, G. W., Schuster, C. M. und Goodman, C. S.** (1996). Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity. *Neuron* **17**, 669-679.
- Davis, H. P. und Squire, L. R.** (1984). Protein synthesis and memory: a review. *Psychol.Bull.* **96**, 518-559.
- Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D. und Staudt, L. M.** (1997). Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* **276**, 589-592.
- Derr, L. B., McKae, L. A. und Tucker, R. P.** (1998). The distribution of tenascin-R in the developing avian nervous system. *J.Exp.Zool.* **280**, 152-164.
- Desprez, P. Y., Poujol, D. und Saez, S.** (1992). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, E.C. 1.2.1.12.) gene expression in two malignant human mammary epithelial cell lines: BT-20 and MCF-7. Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25-(OH)2D3). *Cancer Lett.* **64**, 219-224.
- Doherty, P. und Walsh, F. S.** (1992). Cell adhesion molecules, second messengers and axonal growth. *Curr.Opin.Neurobiol.* **2** , 595-601.
- Doyle, E., Nolan, P. M., Bell, R. und Regan, C. M.** (1992). Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete posttraining period impair consolidation of a passive avoidance response in the rat. *J.Neurochem.* **59**, 1570-1573.
- Dragunow, M., Currie, R. W., Faull, R. L., Robertson, H. A. und Jansen, K.** (1989). Immediate-early genes, kindling and long-term potentiation. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **13**, 301-313.
- Dunn, A. J.** (1980). Neurochemistry of learning and memory: an evaluation of recent data. *Annu.Rev.Psychol.* **31**, 343-390.
- Dunn, A. J.** (1988). Changes in plasma and brain tryptophan and brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid after footshock stress. *Life Sci.* **42**, 1847-1853.
- Erickson, H. P.** (1993). Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr.Opin.Cell Biol.* **5**, 869-876.
- Ferrer, I., Blanco, R., Rivera, R., Carmona, M., Ballabriga, J., Olive, M. und Planas, A. M.** (1996). CREB-1 and CREB-2 immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res.* **712**, 159-164.
- Festing, M. F.** (1969). Inbred mice in research. *Nature* **221**, 716.
- Fields, R. D. und Itoh, K.** (1996). Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **19**, 473-480.
- Finne, J.** (1982). Occurrence of unique polysialosyl carbohydrate units in glycoproteins of developing brain. *J.Biol.Chem.* **257**, 11966-11970.
- Finnegan, M. C., Goepel, J. R. , Hancock, B. W. und Goyns, M. H.** (1993). Investigation of the expression of housekeeping genes in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk.Lymphoma* **10**, 387-393.
- Foley, A. G., Hartz, B. P., Gallagher, H. C., Ronn, L. C., Berezin, V., Bock, E. und Regan, C. M.** (2000). A synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule (NCAM) Igl domain prevents NCAM internalization and disrupts passive avoidance learning. *J.Neurochem.* **74**, 2607-2613.

- Forsberg, E., Hirsch, E., Frohlich, L., Meyer, M., Ekblom, P., Aszodi, A., Werner, S. und Fassler, R.** (1996). Skin wounds and severed nerves heal normally in mice lacking tenascin-C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 6594-6599.
- Foss, D. L., Baarsch, M. J. und Murtaugh, M. P.** (1998). Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol.* **9**, 67-78.
- Fransen, E., D'Hooge, R., Van Camp, G., Verhoye, M., Sijbers, J., Reyniers, E., Soriano, P., Kamiguchi, H., Willemsen, R., Koekkoek, S. K., De Zeeuw, C. I., De Deyn, P. P., Van der, L. A., Lemmon, V., Kooy, R. F. und Willems, P. J.** (1998). L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Hum.Mol.Genet.* **7**, 999-1009.
- Frei, T., Bohlen und, H. F., Wille, W. und Schachner, M.** (1992). Different extracellular domains of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) are involved in different functions. *J.Cell Biol.* **118**, 177-194.
- Freyschuss, B., Sahlin, L., Masironi, B. und Eriksson, H.** (1994). The hormonal regulation of the oestrogen receptor in rat liver: an interplay involving growth hormone, thyroid hormones and glucocorticoids. *J.Endocrinol.* **142**, 285-298.
- Fuss, B., Wintergerst, E. S., Bartsch, U. und Schachner, M.** (1993). Molecular characterization and in situ mRNA localization of the neural recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to tenascin. *J.Cell Biol.* **120**, 1237-1249.
- Fuster, J. M.** (1995). Memory in the cortex of the primate. *Biol.Res.* **28**, 59-72.
- Gabrielli, O., Giorgi, P. und Salvolini, U.** (1997). Magnetic resonance imaging in children with mental retardation. *J.Pediatr.* **130**, 334-335.
- Glare, E. M., Divjak, M., Bailey, M. J., and Walters, E. H.** (2002). beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax***57**, 765-770.
- Goelet, P., Castellucci, V. F., Schacher, S. und Kandel, E. R.** (1986). The long and the short of long-term memory--a molecular framework. *Nature* **322**, 419-422.
- Gold, P. E., Vogt, J. und Hall, J. L.** (1986). Glucose effects on memory: behavioral and pharmacological characteristics. *Behav.Neural Biol.* **46**, 145-155.
- Goodman, C. S. und Shatz, C. J.** (1993). Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity. *Cell* **72 Suppl**, 77-98.
- Graven, K. K., Troxler, R. F., Kornfeld, H., Panchenko, M. V. und Farber, H. W.** (1994). Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia. *J.Biol.Chem.* **269**, 24446-24453.
- Greenough, W. T., Hwang, H. M. und Gorman, C.** (1985). Evidence for active synapse formation or altered postsynaptic metabolism in visual cortex of rats reared in complex environments. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**, 4549-4552.
- Grumet, M., Hoffman, S. und Edelman, G. M.** (1984). Two antigenically related neuronal cell adhesion molecules of different specificities mediate neuron-neuron and neuron-glia adhesion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **81**, 267-271.

- Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K. und McGaugh, J. L.** (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos*, and *zif268*. *J.Neurosci.* **21**, 5089-5098.
- Hagihara, K., Miura, R., Kosaki, R., Berglund, E., Ranscht, B. und Yamaguchi, Y.** (1999). Immunohistochemical evidence for the brevicant-tenascin-R interaction: colocalization in perineuronal nets suggests a physiological role for the interaction in the adult rat brain. *J.Comp Neurol.* **410**, 256-264.
- Haney, C. A., Sahenk, Z., Li, C., Lemmon, V. P., Roder, J. und Trapp, B. D.** (1999). Heterophilic binding of L1 on unmyelinated sensory axons mediates Schwann cell adhesion and is required for axonal survival. *J.Cell Biol.* **146**, 1173-1184.
- Hascoet, M., Bourin, M. und Dhonnchadha, B. A.** (2001). The mouse light-dark paradigm: a review. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* **25**, 141-166.
- Hazell, A. S., Desjardins, P. und Butterworth, R. F.** (1999). Increased expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in cultured astrocytes following exposure to manganese. *Neurochem.Int.* **35**, 11-17.
- Hine, B. und Paolino, R. M.** (1970). Retrograde amnesia: production of skeletal but not cardiac response gradient by electroconvulsive shock. *Science* **169**, 1224-1226.
- Hobbs, S. L., Warkentin, T. D. und DeLong, C. M.** (1993). Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression. *Plant Mol.Biol.* **21**, 17-26.
- Hoh, T., Beiko, J., Boon, F., Weiss, S. und Cain, D. P.** (1999). Complex behavioral strategy and reversal learning in the water maze without NMDA receptor-dependent long-term potentiation. *J.Neurosci.* **19**, RC2.
- Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. und Gelfand, D. H.** (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 7276-7280.
- Horstkorte, R., Schachner, M., Magyar, J. P., Vorherr, T. und Schmitz, B.** (1993). The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth. *J.Cell Biol.* **121**, 1409-1421.
- Hortsch, M.** (1996). The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron* **17**, 587-593.
- Hortsch, M.** (2000). Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one? *Mol.Cell Neurosci.* **15**, 1-10.
- Huitorel, P. and Pantaloni, D.** (1985). Bundling of microtubules by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its modulation by ATP. *Eur.J.Biochem.* **150**, 265-269.
- Hulley, P., Schachner, M. und Lubbert, H.** (1998). L1 neural cell adhesion molecule is a survival factor for fetal dopaminergic neurons. *J.Neurosci.Res.* **53**, 129-134.
- Hyman, B. T., Van Hoesen, G. W., and Damasio, A. R.** Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study.

- Ide, C.** (1996). Peripheral nerve regeneration. *Neurosci.Res.* **25**, 101-121.
- Ishitani, R., Sunaga, K., Tanaka, M., Aishita, H. und Chuang, D. M.** (1997). Overexpression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in low K⁺-induced apoptosis but not necrosis of cultured cerebellar granule cells. *Mol.Pharmacol.* **51**, 542-550.
- Ito, I., Hidaka, H. und Sugiyama, H.** (1991). Effects of KN-62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, on long-term potentiation in the rat hippocampus. *Neurosci.Lett.* **121**, 119-121.
- Izquierdo, I. und Medina, J. H.** (1991). GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends Pharmacol.Sci.* **12**, 260-265.
- Izquierdo, I., da Cunha, C., Rosat, R., Jerusalinsky, D., Ferreira, M. B. und Medina, J. H.** (1992). Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav.Neural Biol.* **58**, 16-26.
- Izquierdo, I., Medina, J. H., Bianchin, M., Walz, R., Zanatta, M. S., Da Silva, R. C., Silva, M., Ruschel, A. C. und Paczko, N.** (1993). Memory processing by the limbic system: role of specific neurotransmitter systems. *Behav.Brain Res.* **58**, 91-98.
- Izquierdo, I. und Medina, J. H.** (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol.Learn.Mem.* **68**, 285-316.
- Izquierdo, I., Quillfeldt, J. A., Zanatta, M. S., Quevedo, J., Schaeffer, E., Schmitz, P. K. und Medina, J. H.** (1997). Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *Eur.J.Neurosci.* **9**, 786-793.
- Jaschke, A., Mi, H., and Tropschug, M.** (1998). Human T cell cyclophilin18 binds to thiol-specific antioxidant protein Aop1 and stimulates its activity. *J.Mol.Biol.* **277**, 763-769.
- Jerusalinsky, D., Ferreira, M. B., Walz, R., Da Silva, R. C., Bianchin, M., Ruschel, A. C., Zanatta, M. S., Medina, J. H. und Izquierdo, I.** (1992). Amnesia by post-training infusion of glutamate receptor antagonists into the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex. *Behav.Neural Biol.* **58**, 76-80.
- Jessell, T. M. und Kandel, E. R.** (1993). Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell- cell communication. *Cell* **72 Suppl**, 1-30.
- Jodar, L., Takahashi, M. und Kaneto, H.** (1995). Effects of footshock-, psychological- and forced swimming-stress on the learning and memory processes: involvement of opioidergic pathways. *Jpn.J.Pharmacol.* **67**, 143-147.
- Jorgensen, M., Tygesen, C. K. und Andersen, P. H.** (1995). Ionotropic glutamate receptors--focus on non-NMDA receptors. *Pharmacol.Toxicol.* **76**, 312-319.
- Jorgensen, O. S. und Bock, E.** (1974). Brain specific synaptosomal membrane proteins demonstrated by crossed immunoelectrophoresis. *J.Neurochem.* **23**, 879-880.
- Kadmon, G., Kowitz, A., Altevogt, P. und Schachner, M.** (1990). Functional cooperation between the neural adhesion molecules L1 and NCAM is carbohydrate dependent. *J.Cell Biol.* **110**, 209-218.

- Kiselyov, V. V., Berezin, V., Maar, T. E., Soroka, V., Edvardsen, K., Schousboe, A. und Bock, E.** (1997). The first immunoglobulin-like neural cell adhesion molecule (NCAM) domain is involved in double-reciprocal interaction with the second immunoglobulin-like NCAM domain and in heparin binding. *J.Biol.Chem.* **272**, 10125-10134.
- Kohno, H. und Ohkubo, Y.** (1998). Comparative glucoregulatory responses of mice to restraint and footshock stress stimuli. *Biol.Pharm.Bull.* **21**, 113-116.
- Kohno, H., Katayama, S., Ohuchi, Y. und Ohkubo, Y.** (1999). Possible neural mechanisms involved in footshock stress-induced enhancement of exploratory behavior in mice. *Biol.Pharm.Bull.* **22**, 418-421.
- Kopp, C., Vogel, E., Rettori, M. C., Delagrang, P. und Misslin, R.** (2000). Reentrainment of the spontaneous locomotor activity rhythm to a daylight reversal in C57BL/6 and C3H/He mice: implication of melatonin. *Physiol Behav.* **70**, 171-176.
- Kopp, C.** (2001). Locomotor activity rhythm in inbred strains of mice: implications for behavioural studies. *Behav.Brain Res.* **125**, 93-96.
- Lackie, P. M., Zuber, C. und Roth, J.** (1990). Polysialic acid and N-CAM localisation in embryonic rat kidney: mesenchymal and epithelial elements show different patterns of expression. *Development* **110**, 933-947.
- Latif, S., Bauer-Sardina, I., Ranade, K., Livak, K. J. und Kwok, P. Y.** (2001). Fluorescence polarization in homogeneous nucleic acid analysis II: 5'-nuclease assay. *Genome Res.* **11**, 436-440.
- Lemay, S., Mao, C. und Singh, A. K.** (1996). Cytokine gene expression in the MRL/lpr model of lupus nephritis. *Kidney Int.* **50**, 85-93.
- Lisman, J.** (1994). The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci.* **17**, 406-412.
- Lorenzini, C. A., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B. und Tassoni, G.** (1996). Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Res.* **730**, 32-39.
- Luthi, A., Laurent, J. P., Figurov, A., Muller, D. und Schachner, M.** (1994). Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM. *Nature* **372**, 777-779.
- Macrides, F., Bartke, A. und Dalterio, S.** (1975). Strange females increase plasma testosterone levels in male mice. *Science* **189**, 1104-1106.
- Maren, S. und Baudry, M.** (1995). Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: relationships to learning and memory. *Neurobiol.Learn.Mem.* **63**, 1-18.
- Martin, K. C. und Kandel, E. R.** (1996). Cell adhesion molecules, CREB, and the formation of new synaptic connections. *Neuron* **17**, 567-570.
- Martin, N. C. und Hopper, A. K.** (1994). How single genes provide tRNA processing enzymes to mitochondria, nuclei and the cytosol. *Biochimie* **76**, 1161-1167.

- Martini, R. und Schachner, M. (1988).** Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J.Cell Biol.* **106**, 1735-1746.
- Matthies, H. (1982).** [Knowledge theoretical problems of the neurosciences]. *Samml.Zwangl.Abh.Geb.Psychiatr.Neurol.* **50**, 13-17.
- Matthies, H. (1989).** In search of cellular mechanisms of memory. *Prog.Neurobiol.* **32**, 277-349.
- Mileusnic, R., Lancashire, C. und Rose, S. P. (1999).** Sequence-specific impairment of memory formation by NCAM antisense oligonucleotides. *Learn.Mem.* **6**, 120-127.
- Milner, B., Taylor, L. und Sperry, R. W. (1968).** Lateralized suppression of dichotically presented digits after commissural section in man. *Science* **161**, 184-186.
- Milner, B. und Taylor, L. B. (1970).** Somesthetic thresholds after commissural section in man. *Neurology* **20**, 378.
- Milner, B., Squire, L. R. und Kandel, E. R. (1998).** Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* **20**, 445-468.
- Mohajeri, M. H., Bartsch, U., van der, P. H., Sansig, G., Mucke, L. und Schachner, M. (1996).** Neurite outgrowth on non-permissive substrates in vitro is enhanced by ectopic expression of the neural adhesion molecule L1 by mouse astrocytes. *Eur.J.Neurosci.* **8**, 1085-1097.
- Morris, R. G. (1999).** D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949. *Brain Res.Bull.* **50**, 437.
- Muller, D., Wang, C., Skibo, G., Toni, N., Cremer, H., Calaora, V., Rougon, G. und Kiss, J. Z. (1996).** PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* **17**, 413-422.
- Murphy, K. J., O'Connell, A. W., and Regan, C. M. (1996).** Repetitive and transient increases in hippocampal neural cell adhesion molecule polysialylation state following multitrial spatial training. *J.Neurochem.* **67**, 1268-1274.
- Nasrin, N., Ercolani, L., Denaro, M., Kong, X. F., Kang, I. und Alexander, M. (1990).** An insulin response element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene binds a nuclear protein induced by insulin in cultured cells and by nutritional manipulations in vivo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 5273-5277.
- Nayak, A., Zastrow, D. J., Lickteig, R., Zahniser, N. R. und Browning, M. D. (1998).** Maintenance of late-phase LTP is accompanied by PKA-dependent increase in AMPA receptor synthesis. *Nature* **394**, 680-683.
- Nelson, R. W., Bates, P. A. und Rutishauser, U. (1995).** Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *J.Biol.Chem.* **270**, 17171-17179.
- Nicholls, J.G., Martin, A.R. und Wallace, B.G. (2002).** Vom Neuron zum Gehirn *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin*; ISBN 3-8274-1347-8
- Nieke, J. und Schachner, M. (1985).** Expression of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM and their common carbohydrate epitope L2/HNK-1 during development and after transection of the mouse sciatic nerve. *Differentiation* **30**, 141-151.

- Nitz, D. A. und McNaughton, B. L.** (1999). Hippocampal EEG and unit activity responses to modulation of serotonergic median raphe neurons in the freely behaving rat. *Learn.Mem.* **6**, 153-167.
- Nolte, C., Schachner, M. und Martini, R.** (1989). Immunocytochemical localization of the neural cell adhesion molecules L1, N-CAM, and J1 in Pacinian corpuscles of the mouse during development, in the adult and during regeneration. *J.Neurocytol.* **18**, 795-808.
- Norenberg, U., Wille, H., Wolff, J. M., Frank, R. und Rathjen, F. G.** (1992). The chicken neural extracellular matrix molecule restrictin: similarity with EGF-, fibronectin type III-, and fibrinogen-like motifs. *Neuron* **8**, 849-863.
- O'Connell, A. W., Fox, G. B., Barry, T., Murphy, K. J., Fichera, G., Foley, A. G., Kelly, J. und Regan, C. M.** (1997). Spatial learning activates neural cell adhesion molecule polysialylation in a corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe. *J.Neurochem.* **68**, 2538-2546.
- Packard, M. G. und McGaugh, J. L.** (1992). Double dissociation of fornix and caudate nucleus lesions on acquisition of two water maze tasks: further evidence for multiple memory systems. *Behav.Neurosci.* **106**, 439-446.
- Persohn, E., Pollerberg, G. E. und Schachner, M.** (1989). Immunoelectron-microscopic localization of the 180 kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM in postsynaptic membranes. *J.Comp Neurol.* **288**, 92-100.
- Pesheva, P., Spiess, E. und Schachner, M.** (1989). J1-160 and J1-180 are oligodendrocyte-secreted nonpermissive substrates for cell adhesion. *J.Cell Biol.* **109**, 1765-1778.
- Pesheva, P., Gloor, S., Schachner, M. und Probstmeier, R.** (1997). Tenascin-R is an intrinsic autocrine factor for oligodendrocyte differentiation and promotes cell adhesion by a sulfatide-mediated mechanism. *J.Neurosci.* **17**, 4642-4651.
- Pesheva, P. und Probstmeier, R.** (2000). The yin and yang of tenascin-R in CNS development and pathology. *Prog.Neurobiol.* **61**, 465-493.
- Petersen, M. B., Economou, E. P., Slaugenhaupt, S. A., Chakravarti, A. und Antonarakis, S. E.** (1990). Linkage analysis of the human HMG14 gene on chromosome 21 using a GT dinucleotide repeat as polymorphic marker. *Genomics* **7**, 136-138.
- Pollerberg, G. E., Schachner, M. und Davoust, J.** (1986). Differentiation state-dependent surface mobilities of two forms of the neural cell adhesion molecule. *Nature* **324**, 462-465.
- Pollerberg, G. E., Burridge, K., Krebs, K. E., Goodman, S. R. und Schachner, M.** (1987). The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in a cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. *Cell Tissue Res.* **250**, 227-236.
- Polster, M. R.** (1993). Drug-induced amnesia: implications for cognitive neuropsychological investigations of memory. *Psychol.Bull.* **114**, 477-493.
- Probstmeier, R., Braunewell, K. und Pesheva, P.** (2000). Involvement of chondroitin sulfates on brain-derived tenascin-R in carbohydrate-dependent interactions with fibronectin and tenascin-C. *Brain Res.* **863**, 42-51.

- Puissant, C., Bayat-Sarmadi, M., Devinoy, E. und Houdebine, L. M.** (1994). Variation of transferrin mRNA concentration in the rabbit mammary gland during the pregnancy-lactation-weaning cycle and in cultured mammary cells. A comparison with the other major milk protein mRNAs. *Eur.J.Endocrinol.* **130**, 522-529.
- Quillfeldt, J. A., Zanatta, M. S., Schmitz, P. K., Quevedo, J., Schaeffer, E., Lima, J. B., Medina, J. H. und Izquierdo, I.** (1996). Different brain areas are involved in memory expression at different times from training. *Neurobiol.Learn.Mem.* **66**, 97-101.
- Quinton, E. E. und Kramarcy, N. R.** (1977). Memory impairment correlates closely with cycloheximide dose and degree of inhibition of protein synthesis. *Brain Res.* **131**, 184-190.
- Rao, Y., Wu, X. F., Garipey, J., Rutishauser, U. und Siu, C. H.** (1992). Identification of a peptide sequence involved in homophilic binding in the neural cell adhesion molecule NCAM. *J.Cell Biol.* **118**, 937-949.
- Rao, Y., Zhao, X. und Siu, C. H.** (1994). Mechanism of homophilic binding mediated by the neural cell adhesion molecule NCAM. Evidence for isologous interaction. *J.Biol.Chem.* **269**, 27540-27548.
- Rathjen, F. G. und Schachner, M.** (1984). Immunocytological and biochemical characterization of a new neuronal cell surface component (L1 antigen) which is involved in cell adhesion. *EMBO J.* **3**, 1-10.
- Rathjen, F. G.** (1991). Neural cell contact and axonal growth. *Curr.Opin.Cell Biol.* **3**, 992-1000.
- Reichert, H. und Boyan, G.** (1997). Building a brain: developmental insights in insects. *Trends Neurosci.* **20**, 258-264.
- Rempel-Clower, N. L., Zola, S. M., Squire, L. R. und Amaral, D. G.** (1996). Three cases of enduring memory impairment after bilateral damage limited to the hippocampal formation. *J.Neurosci.* **16**, 5233-5255.
- Revest, P. und Longstaff, A.** (1998). *Molecular Neuroscience.* Bios Scientific Publishers Limited, ISBN 1-85996-2505
- Reyes, A. A., Akeson, R., Brezina, L. und Cole, G. J.** (1990). Structural requirements for neural cell adhesion molecule-heparin interaction. *Cell Regul.* **1**, 567-576.
- Reymann, K. G., Brodemann, R., Kase, H. und Matthies, H.** (1988). Inhibitors of calmodulin and protein kinase C block different phases of hippocampal long-term potentiation. *Brain Res.* **461**, 388-392.
- Reymann, K. G. und Matthies, H.** (1989). 2-Amino-4-phosphonobutyrate selectively eliminates late phases of long-term potentiation in rat hippocampus. *Neurosci.Lett.* **98**, 166-171.
- Ribeiro, S., Goyal, V., Mello, C. V. und Pavlides, C.** (1999). Brain gene expression during REM sleep depends on prior waking experience. *Learn.Mem.* **6**, 500-508.
- Richardson, C. L., Tate, W. P., Mason, S. E., Lawlor, P. A., Dragunow, M. und Abraham, W. C.** (1992). Correlation between the induction of an immediate early gene, zif/268, and long-term potentiation in the dentate gyrus. *Brain Res.* **580**, 147-154.

- Riedel, G., Wetzel, W. und Reymann, K. G.** (1996). Comparing the role of metabotropic glutamate receptors in long-term potentiation and in learning and memory. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* **20**, 761-789.
- Rieger, F., Grumet, M. und Edelman, G. M.** (1985). N-CAM at the vertebrate neuromuscular junction. *J.Cell Biol.* **101**, 285-293.
- Rimarachin, J. A., Norcross, J., Szabo, P. und Weksler, B. B.** (1992). GAPDH acts as an inducible not constitutive gene in cultured endothelial cells. *In Vitro Cell Dev.Biol.* **28A**, 705-707.
- Ripple, M. O. und Wilding, G.** (1995). Alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and messenger RNA content by androgen in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res.* **55**, 4234-4236.
- Rose, S. P.** (1995). Glycoproteins and memory formation. *Behav.Brain Res.* **66**, 73-78.
- Roth, J., Taatjes, D. J., Bitter-Suermann, D. und Finne, J.** (1987). Polysialic acid units are spatially and temporally expressed in developing postnatal rat kidney. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**, 1969-1973.
- Rottman, S. J. und Snowdon, C. T.** (1972). Demonstration and analysis of an alarm pheromone in mice. *J.Comp Physiol Psychol.* **81**, 483-490.
- Rusakov, D. A., Davies, H. A., Krivko, I. M., Stewart, M. G. und Schachner, M.** (1994). Training in chicks alters PSA-N-CAM distribution in forebrain cell membranes. *Neuroreport* **5**, 2469-2473.
- Rutishauser, U., Thiery, J. P., Brackenbury, R., Sela, B. A. und Edelman, G. M.** (1976). Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **73**, 577-581.
- Rutishauser, U. und Jessell, T. M.** (1988). Cell adhesion molecules in vertebrate neural development. *Physiol Rev.* **68**, 819-857.
- Sadoul, R., Hirn, M., Deagostini-Bazin, H., Rougon, G. und Goidis, C.** (1983). Adult and embryonic mouse neural cell adhesion molecules have different binding properties. *Nature* **304**, 347-349.
- Saffell, J. L., Walsh, F. S. und Doherty, P.** (1994). Expression of NCAM containing VASE in neurons can account for a developmental loss in their neurite outgrowth response to NCAM in a cellular substratum. *J.Cell Biol.* **125**, 427-436.
- Saga, Y., Yagi, T., Ikawa, Y., Sakakura, T. und Aizawa, S.** (1992). Mice develop normally without tenascin. *Genes Dev.* **6**, 1821-1831.
- Salton, S. R., Shelanski, M. L. und Greene, L. A.** (1983). Biochemical properties of the nerve growth factor-inducible large external (NILE) glycoprotein. *J.Neurosci.* **3**, 2420-2430.
- Schachner, M.** (1997). Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**, 627-634.
- Scharf, M. T., Woo, N. H., Lattal, K. M., Young, J. Z., Nguyen, P. V. und Abel, T.** (2002). Protein synthesis is required for the enhancement of long-term potentiation and long-term memory by spaced training. *J.Neurophysiol.* **87**, 2770-2777.

- Scholey, A. B., Mileusnic, R., Schachner, M. und Rose, S. P.** (1995). A role for a chicken homolog of the neural cell adhesion molecule L1 in consolidation of memory for a passive avoidance task in the chick. *Learn.Mem.* **2**, 17-25.
- Schreiber, S. S., Maren, S., Tocco, G., Shors, T. J. und Thompson, R. F.** (1991). A negative correlation between the induction of long-term potentiation and activation of immediate early genes. *Brain Res.Mol.Brain Res.* **11**, 89-91.
- Schuster, T., Krug, M., Hassan, H. und Schachner, M.** (1998). Increase in proportion of hippocampal spine synapses expressing neural cell adhesion molecule NCAM180 following long-term potentiation. *J.Neurobiol.* **37**, 359-372.
- Scoville, W. B. und Milner, B.** (2000). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J.Neuropsychiatry Clin.Neurosci.* **12**, 103-113.
- Segal, M.** (2002). Changing views of Cajal's neuron: the case of the dendritic spine. *Prog.Brain Res.* **136**, 101-107.
- Seilheimer, B., Persohn, E. und Schachner, M.** (1989). Antibodies to the L1 adhesion molecule inhibit Schwann cell ensheathment of neurons in vitro. *J.Cell Biol.* **109**, 3095-3103.
- Serels, S., Day, N. S., Wen, Y. P., Giraldi, A., Lee, S. W., Melman, A. und Christ, G. J.** (1998). Molecular studies of human connexin 43 (Cx43) expression in isolated corporal tissue strips and cultured corporal smooth muscle cells. *Int.J.Impot.Res.* **10**, 135-143.
- Shors, T. J., Townsend, D. A., Zhao, M., Kozorovitskiy, Y. und Gould, E.** (2002). Neurogenesis may relate to some but not all types of hippocampal- dependent learning. *Hippocampus* **12**, 578-584.
- Sirover, M. A.** (1999). New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim.Biophys.Acta* **1432**, 159-184.
- Squire, L.R. und Kandel, E.R.** (1999). Die Natur des Erinnerns. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin*; ISBN 3-8274-0522-X
- Storms, S. D., Kim, A. C., Tran, B. H., Cole, G. J. und Murray, B. A.** (1996). NCAM-mediated adhesion of transfected cells to agrin. *Cell Adhes.Commun.* **3**, 497-509.
- Suematsu, M., Wakabayashi, Y. und Ishimura, Y.** (1996). Gaseous monoxides: a new class of microvascular regulator in the liver. *Cardiovasc.Res.* **32**, 679-686.
- Tang, W. W., Qi, M., Van, G. Y., Wariner, G. P. und Samal, B.** (1996). Leukemia inhibitory factor ameliorates experimental anti-GBM Ab glomerulonephritis. *Kidney Int.* **50**, 1922-1927.
- Tang, Y. P., Shimizu, E., Dube, G. R., Rampon, C., Kerchner, G. A., Zhuo, M., Liu, G. und Tsien, J. Z.** (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice [see comments]. *Nature* **401**, 63-69.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. und Heinen, E.** (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J.Biotechnol.* **75**, 291-295.
- Tilbury, L., Butterworth, B. E., Moss, O. und Goldsworthy, T. L.** (1993). Hepatocyte cell proliferation in mice after inhalation exposure to unleaded gasoline vapor. *J.Toxicol.Environ.Health* **38**, 293-307.

- Toni, N., Buchs, P. A., Nikonenko, I., Bron, C. R. und Muller, D.** (1999). LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* **402**, 421-425.
- Topilko, P., Schneider-Maunoury, S., Levi, G., Baron-Van Evercooren, A., Chennoufi, A. B., Seitanidou, T., Babinet, C. und Charnay, P.** (1994). Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* **371**, 796-799.
- Tully, T., Preat, T., Boynton, S. C., und Del Vecchio, M.** (1994). Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* **79**, 35-47.
- Uphouse, L. L., MacInnes, J. W. und Schlesinger, K.** (1974). Role of RNA and protein in memory storage: a review. *Behav.Genet.* **4**, 29-81.
- Valenstein, E., Bowers, D., Verfaellie, M., Heilman, K. M., Day, A. und Watson, R. T.** (1987). Retrosplenial amnesia. *Brain* **110** (Pt 6), 1631-1646.
- Wallhauser, E. und Scheich, H.** (1987). Auditory imprinting leads to differential 2-deoxyglucose uptake and dendritic spine loss in the chick rostral forebrain. *Brain Res.* **428**, 29-44.
- Weber, P., Bartsch, U., Rasband, M. N., Czaniera, R., Lang, Y., Bluethmann, H., Margolis, R. U., Levinson, S. R., Shrager, P., Montag, D. und Schachner, M.** (1999). Mice deficient for tenascin-R display alterations of the extracellular matrix and decreased axonal conduction velocities in the CNS. *J.Neurosci.* **19**, 4245-4262.
- Wei, M. H., Karavanova, I., Ivanov, S. V., Popescu, N. C., Keck, C. L., Pack, S., Eisen, J. A. und Lerman, M. I.** (1998). In silico-initiated cloning and molecular characterization of a novel human member of the L1 gene family of neural cell adhesion molecules. *Hum.Genet.* **103**, 355-364.
- Whishaw, I. Q.** (1998). Place learning in hippocampal rats and the path integration hypothesis. *Neurosci.Biobehav.Rev.* **22**, 209-220.
- Whishaw, I. Q. und Gorny, B.** (1999). Path integration absent in scent-tracking fimbria-fornix rats: evidence for hippocampal involvement in "sense of direction" and "sense of distance" using self-movement cues. *J.Neurosci.* **19**, 4662-4673.
- Wilson, M. A. und Tonegawa, S.** (1997). Synaptic plasticity, place cells and spatial memory: study with second generation knockouts. *Trends Neurosci.* **20**, 102-106.
- Wintergerst, E. S., Fuss, B. und Bartsch, U.** (1993). Localization of janusin mRNA in the central nervous system of the developing and adult mouse. *Eur.J.Neurosci.* **5**, 299-310.
- Wintergerst, E. S., Faissner, A. und Celio, M. R.** (1996). The proteoglycan DSD-1-PG occurs in perineuronal nets around parvalbumin-immunoreactive interneurons of the rat cerebral cortex. *Int.J.Dev.Neurosci.* **14**, 249-255.
- Witter, M. P., Van Hoesen, G. W. und Amaral, D. G.** (1989). Topographical organization of the entorhinal projection to the dentate gyrus of the monkey. *J.Neurosci.* **9**, 216-228.
- Wolfman, C., Fin, C., Dias, M., Bianchin, M., Da Silva, R. C., Schmitz, P. K., Medina, J. H. und Izquierdo, I.** (1994). Intrahippocampal or intraamygdala infusion of KN62, a specific inhibitor of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, causes retrograde amnesia in the rat. *Behav.Neural Biol.* **61**, 203-205.

- Wood, E. R., Dudchenko, P. A. und Eichenbaum, H.** (1999). The global record of memory in hippocampal neuronal activity [see comments]. *Nature* **397**, 613-616.
- Wu, C., Dias, P., Kumar, S., Lauder, J. M. und Singh, S.** (1999). Differential expression of serotonin 5-HT₂ receptors during rat embryogenesis. *Dev. Neurosci.* **21**, 22-28.
- Yang, P., Yin, X. und Rutishauser, U.** (1992). Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. *J. Cell Biol.* **116**, 1487-1496.
- Yoshimi, K. und Iwata, N.** (1995). A supplemental measure of stay-times in the light box on step-through passive avoidance. *Jpn. J. Pharmacol.* **67**, 211-218.
- Zamze, S., Harvey, D. J., Pesheva, P., Mattu, T. S., Schachner, M., Dwek, R. A. und Wing, D. R.** (1999). Glycosylation of a CNS-specific extracellular matrix glycoprotein, tenascin-R, is dominated by O-linked sialylated glycans and "brain-type" neutral N-glycans. *Glycobiology* **9**, 823-831.
- Zanatta, M. S., Schaeffer, E., Schmitz, P. K., Medina, J. H., Quevedo, J., Quillfeldt, J. A. und Izquierdo, I.** (1996). Sequential involvement of NMDA receptor-dependent processes in hippocampus, amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in memory processing. *Behav. Pharmacol.* **7**, 341-345.
- Zhang, J. und Snyder, S. H.** (1992). Nitric oxide stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **89**, 9382-9385.
- Zhao, W. Q., Bennett, P., Rickard, N., Sedman, G. L., Gibbs, M. E. und Ng, K. T.** (1996). The involvement of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in memory formation in day-old chicks. *Neurobiol. Learn. Mem.* **66**, 24-35.
- Zhong, H. und Simons, J. W.** (1999). Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 523-526.
- Zola-Morgan, S., Squire, L. R. und Amaral, D. G.** (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J. Neurosci.* **6**, 2950-2967.
- Zuber, C., Lackie, P. M., Catterall, W. A. und Roth, J.** (1992). Polysialic acid is associated with sodium channels and the neural cell adhesion molecule N-CAM in adult rat brain. *J. Biol. Chem.* **267**, 9965-9971.

8.1 Futterzusammensetzung

Das Futter wurde ad libitum verabreicht und bestand aus einer pelletierten Standarddiät für Ratten und Mäuse der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH in Soest mit folgenden Inhaltsangaben:

Rohprotein	20,00%	Methionin	0,30%
Rohfett	3,50%	Calcium	1,00%
Rohfaser	4,90%	Phosphor	0,70%
Rohasche	6,70%	Magnesium	0,20%
Lysin	1,00%	Natrium	0,25%

Zusatzstoffe / kg : Vitamin A 15.000 IE

Vitamin D3 1000 IE

Vitamin E 100mg

8.2 Schadstoffanalyse der Einstreu

Kuopion kaupunki
YMPÄRISTÖTERVEYSLABORATORIO
Environmental Health Laboratory

13.02.2001

Tapvei Oy/Anne Korhonen
Vaikkojoentie 33
73620 KORTTEINEN

RESEARC REPORT

Product	Bedding material for laboratory animals
Made of	Aspen (Populus tremula)
Producer	Tapvei Oy, FIN-73620 Kortteinen
Subject of analysis	Quality analysis
Place of sampling	Tapvei Oy, FIN-73620 Kortteinen
Date of sampling	30.01.2001/Markku Oksman
Batch code	18012001T
The sample arrived to laboratory	02.02.2001
Laboratory sample number	2001-00381-01(Kuopion kaupungin ympäristölaboratorio)

Results

Total bacterial count	(method NMKL 86:99)	30 CFU/g
Yeasts	(method ISO 7954:87 mod.)	< 100 CFU/g
Moulds	(method ISO 7954:87 mod.)	< 100 CFU/g
Salmonella	(method NMKL 71/1999)	none / 25g
Coliforms	(method NMKL 44:95)	<10 CFU/g
Fecal coliforms	(method NMKL 125:95)	<10 CFU/g
Enterococcus	(method NMKL 68:92)	<100 CFU/g
Hemolytic bacteria	(method YTL 2226)	< 100 CFU/g
Anaerobic hemolytic bacteria	(method YTL 2226, anaerobic cultiv.)	< 100 CFU/g
Sulfite reducing clostridia	(method NMKL 95:97)	< 10 CFU/g
Mercury	(method YTL 1009)	< 0,01 mg/kg
Lead	(method YTL 1053)	0,07 mg/kg
Cadmium	(method YTL 1053)	0,28 mg/kg

Helinä Pihlaja
Helinä Pihlaja
Chemist

Ritva Rajala
Ritva Rajala
Microbiologist



Table 1. Concentrations of PCBs and pesticides in the sample.

Compound	Concentration, $\mu\text{g}/\text{kg}$
PCB No. 28	< 0.2
PCB No. 52	< 0.2
PCB No. 101	< 0.2
PCB No. 138	< 0.2
PCB No. 153	< 0.2
PCB No. 180	< 0.2
o,p'-DDD	< 0.2
p,p'-DDD	< 0.2
o,p'-DDE	< 0.2
p,p'-DDE	< 0.2
o,p'-DDT	< 0.2
p,p'-DDT	< 0.2
α -HCH	< 0.2
β -HCH	< 0.2
gamma-HCH	< 0.2
delta-HCH	< 0.2
epsilon-HCH	< 0.2

The limit of determination is 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Table 2. Concentrations of phenoxyherbicides in the sample.

Compound	Concentration, $\mu\text{g}/\text{g}$
2,4-D	< 0.1
2,4,5-T	< 0.1
MCPA	< 0.1
Dichlorprop	< 0.1
Mecoprop	< 0.1
Dicampa	< 0.1

The limit of determination is 0.1 $\mu\text{g}/\text{g}$.

Determination of PAH compounds

PAH compounds were determined after toluene extraction by gas chromatography-mass spectrometry using SIM-technique. Before analysis the extract was purified with DMSO liquid-liquid partition and silica column chromatography. Quantitation was done by using internal standard method (pyrene-D₁₀, β,β -binaphthyl, indeno[1,2,3-cd]fluoranthene). The limit of determination is 0.01 $\mu\text{g}/\text{g}$. The results and PAH-compounds analysed are given in the Table 3.

Table 3. Concentrations of PAH-compounds in the sample.

Compound	Concentration, µg/g
Naphthalene	<0,01
2-Methylnaphthalene	<0,01
1-Methylnaphthalene	<0,01
Biphenyl	<0,01
Acenaphthene	<0.01
Fluorene	<0.01
3-Methylbiphenyl	<0,01
Dibenzofuran	<0,01
Dibenzothiophene	<0.01
Phenanthrene	<0.01
Anthracene	<0.01
2-Methylanthracene	<0.01
1-Methylphenanthrene	<0.01
2-Phenylnaphthalene	<0.01
Fluoranthene	<0.01
Pyrene	<0.01
Benzo[a]fluorene	<0.01
Benzo[b]fluorene	<0.01
Benzo[b]naphtho[2,1-d]thiophene	<0.01
Benzo[b]naphtho[1,2-d]thiophene	<0.01
Benz[a]anthracene	<0.01
Chrysene/triphenylene	<0.01
Benzo[b]fluoranthene	<0.01
Benzo[k]fluoranthene	<0.01
Benzo[e]pyrene	<0.01
Benzo[a]pyrene	<0.01
Perylene	<0.01
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	<0.01
Benzo[g,h,i]perylene	<0.01
Dibenzo[a,h]anthracene	<0.01
Choronene	<0.01
Sum of PAH	0.01

Espoo, 12 January 2001

Senior Research Scientist

Research Scientist



Erik Sandell



Juha Kokkonen

8.3 RNA-Aufreinigung

1. 1 Zu 100µl Probe 100µl 4M (NH₄)OAc und je 600 µl Ethanol abs.
2. 1,5h auf Eis inkubieren, dann auf Raumtemperatur abkühlen lassen
3. 20min bei 20°C und 10 000g zentrifugieren
4. Pellets in je 200 µl 70% Ethanol aufnehmen
5. 20min bei 20°C und 10 000g zentrifugieren
6. Überstand vorsichtig abnehmen, Pellet an der Luft waagrecht liegend trocknen (5min)
7. Pellet in 50µl DEPC-H₂O aufnehmen
8. RNA durch Inkubation bei 60°C lösen, kurz abzentrifugieren

RNA-Gel

1. 36ml H₂O und 0,6g Agarose in der Mikrowelle zum Kochen bringen
2. 5ml MEA-Puffer, pH 7 und 9ml Formaldehyd (37%) hinzugeben und gut durchschwenken
3. In die Gelform gießen

MEA-Puffer (morpholine Propansulfonsäure, EDTA, Natriumacetat)
20mM morpholine Propansulfonsäure (Mops)
1mM Di-Natrium EDTA
5mM Natriumacetat

umrühren und bei kleiner Flamme köcheln lassen.

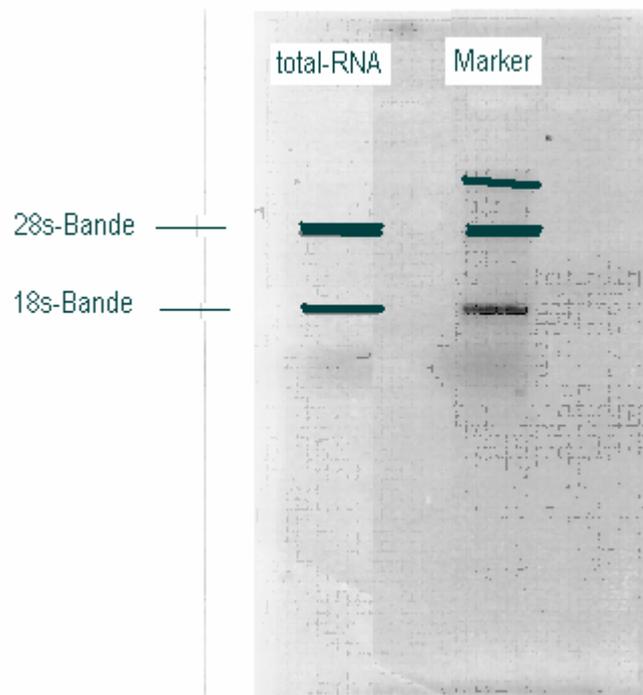


Abbildung 23 RNA-Gel nach Aufreinigung; 40 min Laufzeit bei 55-60V
100ng RNA wurden in 30µl DEPC-Wasser gelöst, mit 20µl PP_{RNA} versetzt
und aufgetragen

8.4 PCR-Programm

1. 15min 95°C
2. 0:30 min 94°C
3. 1°C / s to 57°C
4. 1:00 min 57°C
5. 1°C / s to 72°C
6. 3:00 min 72°C
7. Go to 2.; 34x
8. 7:00 min 72°C
9. 4°C for ever

8.5 Light CyclerPCR-Programm

Zur Durchführung der PCR am Light Cycler wurden die Reagenzien aus dem Roche Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland „Light Cycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes“; Cat. No. 2 239 272, verwendet.

8.5.1 PCR-Programm

1. Denaturierung
 - 95°C für 10 min ; temperature transition rate 20°C/s
2. Zyklen (40x)
 - 95°C 1 sec; temperature transition rate 20°C/s
 - 55°C 10 sec; temperature transition rate 20°C/s
 - 72°C 10 sec; temperature transition rate 20°C/s
3. Kühlen
 - 40°C 30 sec; temperature transition rate 20°C/s

8.5.2 PCR-Mix

1. GAPDH

H ₂ O, dd ster.	8,6 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,4 µl
Fast Mix (10µM)	2,0 µl
Primer fw (10µM)	2,0 µl
Primer rev (10µM)	2,0 µl
Sonde (3µM)	1,0 µl
Template	2,0 µl
2. NCAM, NCAM180,CHL1 und Tenascin-R

H ₂ O, dd ster.	10,6 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,4 µl
Fast Mix (10µM)	2,0 µl
Primer fw (10µM)	1,0 µl
Primer rev (10µM)	1,0 µl
Sonde (3µM)	1,0 µl
Template	2,0µl

Der Roche Kit enthält bereits das Wasser, Magnesiumchlorid und den Fast Mix (setzt sich zusammen aus der TaqPolymerase, Puffer, dNTP Mix und 10mMM MgCl₂)

8.6 Sequenzen

8.6.1 NCAM

Ausgehend vom Start-ATG

Forward Primer: TGCAGGTAGATATTGTTCCCAGC

Anneals zwischen den *Residues* 59 und 81 bei einer Temperatur von 59°C.

Reverse Primer: TCCTCAGCGGTGACCACAC

Anneals zwischen den *Residues* 305 und 287 bei einer Temperatur von 59°C

TaqMan Sonde :CGCCAACATCGACGATGCCG

Anneals zwischen *Residues* 255 und 274 bei einer Temperatur von 69°C

Bemerkungen:

Diese PCR läuft über die Exon-Grenze 1/2 von NCAM, eine Amplifikation genomischer DNA ist daher nicht möglich

vom Start ATG einschl. Amplifikat

5' ATGCTGCGAACTAAGGATCTCATCTGGACTTTGTTTTTCCTGGGAACTGCAGTTTCC
CTGCAGGTAGATATTGTTCCCAGCCAGGAGAATCAGCGTTGGAGAGTCCAAATTC
 TTCCTGTGTCAAGTGGCAGGAGATGCCAAAGATAAAGGACATCTTCTGGTTCTCCCCCAATGGGG
 AGAAGCTGAGCCCAAACCAGCAGCGGATCTCAGTGGTGTGGAATGATGA
 CGACTCTCTACCCTACCATCTACAAC**CGCCAACATCGACGATGCCGG**CATATACA
AGTGTGTGGTCACCGCTGAGGA 3'

8.6.2 L1

Forward Primer: TGGTCGTGATGCTGCGG

Anneals zwischen den *Residues* 2 und 18 bei einer Temperatur von 60°C

Reverse Primer: CCAGGCGCCGTGGAG

Anneals zwischen den *Residues* 136 und 122 bei einer Temperatur von 59°C

TaqMan Sonde : TGCTAGAGCCACCTGTCATCACGGAA

Bemerkungen:

Eine Amplifikation von genomischer DNA ist nicht möglich (5000bp Intron)

5' 3'

ATGGTCGTGATGCTGCGGTACGTGTGGCCTCTCCTCCTCTGCAGCCCTGCCTGCTCA
 TACAGATTCCAGACGAATATAAAGGACACCAT**GTGCTAGAGCCACCTGTCATCACGGA**
 ACAGT**CTCCACGGCGCCTGG**

8.6.3 CHL 1

Forward Primer :CCGTTCAACAGGTTCCAACA

Anneals zwischen den *Residues* 89 und 108 bei einer Temperatur von 58°C

Reverse Primer :GGCTTATCGTCCTTAGTCCATGA

Anneals zwischen den *Residues* 224 und 202 bei einer Temperatur von 58°C

TaqMan Sonde :CAGGTGGCCTTTCCCTTCGATGAGT

Anneals zwischen den *Residues* 130 und 154 bei einer Temperatur von 68°C

Bemerkungen :

Eine Amplifikation genomischer DNA kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Wahrscheinlich überspannt jedoch auch diese PCR ein oder mehrere Exons (DNA-Test). Die Amplifikation von L1 ist nicht möglich.

5' ATGATGGAATTGCCATTATGTGGAAGAGGACTGATCCTAAGTCTAATTTTCCTCCTGG
TAAAATTGTCAGCTGAAATACCACTCTCCGTTCAACAGGTTCCAACA ATTGTAAAGCA
GTCATACGTGCAGGTGGCCTTTCCCTTCGATGAGTATTTTCAAATTGAATGTGAAGCGA
AAGGAAACCCTGAACCAATATTTT CATGGACTAAGGACGATAAGCCTTTTGATCTTTC
TGAT 3'

8.6.4 Tenascin-R

Forward Primer : CTGCGAGACCAGTGCAATACC

Anneals zwischen den *Residues* 450 und 471 bei einer Temperatur von 59°C

Reverse Primer :CAGCCACAGGACTCGAAGCT

Anneals zwischen den *Residues* 560 und 542 bei einer Temperatur von 59°C

Bemerkungen:

Die PCR liegt über dem Exon 1/2. Die Zählung beginnt bei bp 1 des CDS (ATG)

ATGGGGATCGATGGGGAAACAGTAGTCTTGAAGAACATGCTCATTGGTGTAACCTGA
TCCTGTTGGGATCCATGCTCAAGCCTTCTGAGTGTGCGGCTGGAGGTGACTACAGAAAGG
GCTCAGAGACAAACTGTGGAGGAGGAAGGAGGGGCTTCCAGCTACAACACTTCCAGCA
AGGAACAGCCTATGGTCTTCAACCATGTGTATAACATCAACGTGCCACTTGAAAGCCTC
TGCTCCTCGGGGCTGGAGGCCTCAGCTGAGCAGGACATGAGTGCTGAAGATGATACTC
TGGCCGAATACATAGGCCAAACCTCAGACCATGAAAGCCAGGTTACCTTCACCCACAA
GATCAACCTCCCCAAAAAGCCTGCCCATGTGCAAGCTCTTCCAGGTAAGTGCAGGAAC
TGCTGAGCCGGATCGAGATGCTGGAGAGGGAGGTGTCCTTGCTGCGAGACCAGTGCA
ATACCAACTGCTGCTAGGAAAGCGCTGCCACAGGACAACCTGGACTATGCTCCCTCACT
GCAGCGGCCATGGCAACTTTAGCTTCGAGTCTGTGGCTGCATCTGCAATGAAGGCT
GGTTTGGCAAGAACTGCTCAGAGCCCTACTGCCACTGGGCTGCTCCAGTCGGGGTGTG
TGTGTCAGTGGCCAGTGCATT

8.7 Reagenzien zur Durchführung der Reversen Transkription

DEPC-H ₂ O	12 µl
rHexa Primer (20pMol/µl)	2 µl
5x RT-Puffer	6 µl
DTT (100mM)	3 µl
dNTP's (5mM each)	1 µl
RT (Superscript II)	1 µl
Template (50ng)	5µl

Die random Hexamers wurden von PE Applied Biosystems, Foster City, USA, bezogen.
Die reverse Transkriptase (Superscript II) wurde bei Life Technologies, Glasgow, UK, gekauft. Der RT-Puffer und DTT wurden jeweils zum Enzym mitgeliefert.

8.8 DEPC-H₂O und DNase-Inkubationspuffer

Wasser, mit 0,1Vol% Diethylpyrocarbonat über Nacht unterm Abzug rühren lassen,
danach autoklavieren.

DNase-Inkubationspuffer (100 ml)
33,3ml 3M NaCl
10ml 100mM MnCl₂
20ml 100mM NaCl TRIS/HCl pH 7,0

mit DEPC-Wasser ad 100ml auffüllen

8.9 Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA)

8.9.1 Retest nach 1h

Descriptives^a

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Zeit auf Plattform	22	15,59	6,731	1,435	12,61	18,58	6	30
Baseline [sec]	14	17,14	6,916	1,848	13,15	21,14	7	29
direkter Schock	9	14,33	6,690	2,230	9,19	19,48	8	30
Kontrolle	8	15,50	7,010	2,478	9,64	21,36	8	30
verzögert / nicht betr.								
verzögert / betreten								
Total	53	15,77	6,681	,918	13,93	17,62	6	30
Zeit auf Plattform	22	73,91	97,080	20,697	30,87	116,95	3	301
Retest [sec]	14	43,07	59,514	15,906	8,71	77,43	5	237
direkter Schock	9	81,00	108,362	36,121	-2,29	164,29	8	301
Kontrolle	8	92,75	102,274	36,159	7,25	178,25	10	301
verzögert / nicht betr.								
verzögert / betreten								
Total	53	69,81	90,600	12,445	44,84	94,78	3	301

a. Zeit bis Retest [h] = 1,0

Test of Homogeneity of Variances^a

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Zeit auf Plattform	,211	3	49	,888
Baseline [sec]				
Zeit auf Plattform	2,536	3	49	,067
Retest [sec]				

a. Zeit bis Retest [h] = 1,0

ANOVA^a

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Zeit auf Plattform	Between Groups	46,251	3	15,417	,332	,802
Baseline [sec]	Within Groups	2275,032	49	46,429		
	Total	2321,283	52			
Zeit auf Plattform	Between Groups	15715,866	3	5238,622	,624	,603
Retest [sec]	Within Groups	411116,2	49	8390,127		
	Total	426832,1	52			

a. Zeit bis Retest [h] = 1,0

8.9.2 Retest nach 3h

Descriptives^a

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Zeit auf Plattform	12	15,42	7,267	2,098	10,80	20,03	6	26
Baseline [sec]	15	15,60	6,127	1,582	12,21	18,99	5	25
direkter Schock	8	11,00	2,268	,802	9,10	12,90	8	14
Kontrolle	7	10,86	4,180	1,580	6,99	14,72	6	19
verzögert / nicht betr.								
verzögert / betreten								
Total	42	13,88	5,948	,918	12,03	15,73	5	26
Zeit auf Plattform	12	163,75	93,703	27,050	104,21	223,29	15	301
Retest [sec]	15	47,33	46,724	12,064	21,46	73,21	6	142
direkter Schock	8	17,63	8,618	3,047	10,42	24,83	6	27
Kontrolle	7	161,14	113,108	42,751	56,54	265,75	10	301
verzögert / nicht betr.								
verzögert / betreten								
Total	42	93,90	95,470	14,731	64,15	123,66	6	301

a. Zeit bis Retest [h] = 3,0

Test of Homogeneity of Variances^a

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Zeit auf Plattform	3,786	3	38	,018
Baseline [sec]				
Zeit auf Plattform	8,996	3	38	,000
Retest [sec]				

a. Zeit bis Retest [h] = 3,0

ANOVA^a

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	Between Groups	203,031	3	67,677	2,062	,122
	Within Groups	1247,374	38	32,826		
	Total	1450,405	41			
Zeit auf Plattform Retest [sec]	Between Groups	169269,3	3	56423,101	10,488	,000
	Within Groups	204426,3	38	5379,640		
	Total	373695,6	41			

a. Zeit bis Retest [h] = 3,0

8.9.3 Retest nach 4,5h

Descriptives^a

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum	
					Lower Bound	Upper Bound			
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	direkter Schock	13	14,85	5,900	1,636	11,28	18,41	7	29
	Kontrolle	12	14,92	6,360	1,836	10,88	18,96	7	29
	verzögert / nicht betr.	8	15,63	6,163	2,179	10,47	20,78	6	26
	verzögert / betreten	6	12,67	3,445	1,406	9,05	16,28	9	19
	Total	39	14,69	5,667	,907	12,86	16,53	6	29
Zeit auf Plattform Retest [sec]	direkter Schock	13	112,08	132,653	36,791	31,92	192,24	6	301
	Kontrolle	12	37,50	35,623	10,283	14,87	60,13	13	134
	verzögert / nicht betr.	8	40,50	62,815	22,208	-12,01	93,01	7	190
	verzögert / betreten	6	123,50	121,888	49,761	-4,41	251,41	9	301
	Total	39	76,21	100,701	16,125	43,56	108,85	6	301

a. Zeit bis Retest [h] = 4,5

Test of Homogeneity of Variances^a

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	,723	3	35	,545
Zeit auf Plattform Retest [sec]	11,732	3	35	,000

a. Zeit bis Retest [h] = 4,5

ANOVA^a

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	Between Groups	32,490	3	10,830	,319	,811
	Within Groups	1187,817	35	33,938		
	Total	1220,308	38			
Zeit auf Plattform Retest [sec]	Between Groups	58324,936	3	19441,645	2,081	,120
	Within Groups	327023,4	35	9343,526		
	Total	385348,4	38			

a. Zeit bis Retest [h] = 4,5

8.9.4 Retest nach 6h

Descriptives^a

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	direkter Schock	13	16,23	4,764	1,321	13,35	19,11	8	24
	Kontrolle	11	14,82	7,305	2,203	9,91	19,73	7	29
	verzögert / nicht betr.	10	12,40	2,989	,945	10,26	14,54	8	18
	verzögert / betreten	1	13,00	,	,	,	,	13	13
	Total	35	14,60	5,348	,904	12,76	16,44	7	29
Zeit auf Plattform Retest [sec]	direkter Schock	13	120,92	127,095	35,250	44,12	197,73	8	301
	Kontrolle	11	47,45	61,370	18,504	6,23	88,68	9	206
	verzögert / nicht betr.	10	18,40	18,910	5,980	4,87	31,93	3	67
	verzögert / betreten	1	107,00	,	,	,	,	107	107
	Total	35	68,14	94,230	15,928	35,77	100,51	3	301

a. Zeit bis Retest [h] = 6,0

ANOVA^a

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	Between Groups	86,056	3	28,685	1,003	,404
	Within Groups	886,344	31	28,592		
	Total	972,400	34			
Zeit auf Plattform Retest [sec]	Between Groups	67176,235	3	22392,078	2,957	,048
	Within Groups	234718,1	31	7571,550		
	Total	301894,3	34			

a. Zeit bis Retest [h] = 6,0

Test of Homogeneity of Variances^a

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	2,465	3	31	,081
Zeit auf Plattform Retest [sec]	18,007	3	31	,000

a. Zeit bis Retest [h] = 6,0

8.9.5 Retest nach 9h

Descriptives^a

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	direkter Schock	14	16,21	6,041	1,614	12,73	19,70	8	27
	Kontrolle	11	14,45	4,947	1,492	11,13	17,78	9	23
	verzögert / nicht betr.	10	15,30	6,255	1,978	10,83	19,77	7	23
	verzögert / betreten	1	24,00	,	,	,	,	24	24
	Total	36	15,64	5,763	,960	13,69	17,59	7	27
Zeit auf Plattform Retest [sec]	direkter Schock	14	69,07	87,196	23,304	18,73	119,42	6	301
	Kontrolle	11	33,55	24,464	7,376	17,11	49,98	7	74
	verzögert / nicht betr.	10	39,80	79,130	25,023	-16,81	96,41	8	264
	verzögert / betreten	1	9,00	,	,	,	,	9	9
	Total	36	48,42	70,078	11,680	24,71	72,13	6	301

a. Zeit bis Retest [h] = 9,0

Test of Homogeneity of Variances^a

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	1,675	3	32	,192
Zeit auf Plattform Retest [sec]	1,447	3	32	,248

a. Zeit bis Retest [h] = 9,0

ANOVA^a

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	Between Groups	91,121	3	30,374	,907	,448
	Within Groups	1071,184	32	33,475		
	Total	1162,306	35			
Zeit auf Plattform Retest [sec]	Between Groups	0701,494	3	3567,165	,708	,554
	Within Groups	161179,3	32	5036,852		
	Total	171880,8	35			

a. Zeit bis Retest [h] = 9,0

8.9.5 Retest nach 12h (12h a, Baseline-Testen morgens; Retest abends)

Descriptives^a

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	direkter Schock	13	15,00	4,223	1,171	12,45	17,55	9	24
	Kontrolle	12	15,50	6,585	1,901	11,32	19,68	6	28
	verzögert / nicht betr.	10	14,30	6,913	2,186	9,35	19,25	6	28
	verzögert / betreten	2	14,50	,707	,500	8,15	20,85	14	15
	Total	37	14,95	5,602	,921	13,08	16,81	6	28
Zeit auf Plattform Retest [sec]	direkter Schock	13	167,00	112,863	31,303	98,80	235,20	10	301
	Kontrolle	12	44,25	65,206	18,823	2,82	85,68	12	244
	verzögert / nicht betr.	10	90,70	81,426	25,749	32,45	148,95	10	242
	verzögert / betreten	2	168,50	98,288	69,500	-714,58	1051,58	99	238
	Total	37	106,65	101,821	16,739	72,70	140,60	10	301

a. Zeit bis Retest [h] = 12,0

Test of Homogeneity of Variances^a

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	2,233	3	33	,103
Zeit auf Plattform Retest [sec]	3,031	3	33	,043

a. Zeit bis Retest [h] = 12,0

ANOVA^a

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	Between Groups	8,292	3	2,764	,081	,970
	Within Groups	1121,600	33	33,988		
	Total	1129,892	36			
Zeit auf Plattform Retest [sec]	Between Groups	104267,6	3	34755,861	4,264	,012
	Within Groups	268960,9	33	8150,329		
	Total	373228,4	36			

a. Zeit bis Retest [h] = 12,0

8.9.6 Retest nach 12h (12h b, Baseline-Testen abends;Retest morgens)

Descriptives^a

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Zeit auf Plattform	13	16,23	6,685	1,854	12,19	20,27	7	26
Baseline [sec]	10	14,00	4,028	1,274	11,12	16,88	7	21
verzögert / nicht betr.	2	8,50	,707	,500	2,15	14,85	8	9
verzögert / betreten	9	13,67	7,018	2,339	8,27	19,06	6	24
Total	34	14,44	6,021	1,033	12,34	16,54	6	26
Zeit auf Plattform	13	96,77	120,675	33,469	23,85	169,69	5	301
Retest [sec]	10	68,60	45,581	14,414	35,99	101,21	18	119
verzögert / nicht betr.	2	22,00	12,728	9,000	-92,36	136,36	13	31
verzögert / betreten	9	108,89	108,458	36,153	25,52	192,26	5	257
Total	34	87,29	96,153	16,490	53,74	120,84	5	301

a. Zeit bis Retest [h] = 12,1

Test of Homogeneity of Variances^a

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	3,623	3	30	,024
Zeit auf Plattform Retest [sec]	5,057	3	30	,006

a. Zeit bis Retest [h] = 12,1

ANOVA^a

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Zeit auf Plattform	Between Groups	119,575	3	39,858	1,110	,360
Baseline [sec]	Within Groups	1076,808	30	35,894		
	Total	1196,382	33			
Zeit auf Plattform	Between Groups	17385,462	3	5795,154	,604	,617
Retest [sec]	Within Groups	287715,6	30	9590,520		
	Total	305101,1	33			

a. Zeit bis Retest [h] = 12,1

8.9.7 Retest nach 24h

Descriptives^a

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Zeit auf Plattform	13	11,69	3,497	,970	9,58	13,81	6	16
Baseline [sec]	13	13,23	4,065	1,127	10,77	15,69	8	23
verzögert / nicht betr.	4	9,75	3,403	1,702	4,33	15,17	5	13
verzögert / betreten	8	19,38	4,438	1,569	15,66	23,09	13	26
Total	38	13,63	4,912	,797	12,02	15,25	5	26
Zeit auf Plattform	13	138,54	124,957	34,657	63,03	214,05	4	301
Retest [sec]	13	26,31	22,073	6,122	12,97	39,65	8	85
verzögert / nicht betr.	4	17,25	10,874	5,437	-,05	34,55	8	29
verzögert / betreten	8	167,88	135,000	47,730	55,01	280,74	9	301
Total	38	93,55	113,151	18,356	56,36	130,74	4	301

a. Zeit bis Retest [h] = 24,0

Test of Homogeneity of Variance^a

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	,279	3	34	,840
Zeit auf Plattform Retest [sec]	19,081	3	34	,000

a. Zeit bis Retest [h] = 24,0

ANOVA^a

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	Between Groups	375,140	3	125,047	8,212	,000
	Within Groups	517,702	34	15,227		
	Total	892,842	37			
Zeit auf Plattform Retest [sec]	Between Groups	152571,8	3	50857,257	5,384	,004
	Within Groups	321147,6	34	9445,518		
	Total	473719,4	37			

a. Zeit bis Retest [h] = 24,0

8.9.8 Retest nach 72h

Descriptives^a

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	direkter Schock	12	17,58	7,960	2,298	12,53	22,64	5	30
	Kontrolle	10	19,60	8,262	2,613	13,69	25,51	10	30
	verzögert / nicht betr.	6	13,83	8,060	3,291	5,37	22,29	5	25
	verzögert / betreten	4	16,75	8,382	4,191	3,41	30,09	8	28
	Total	32	17,41	7,979	1,411	14,53	20,28	5	30
Zeit auf Plattform Retest [sec]	direkter Schock	12	145,42	110,806	31,987	75,01	215,82	13	301
	Kontrolle	10	34,30	22,465	7,104	18,23	50,37	10	89
	verzögert / nicht betr.	6	48,50	45,637	18,631	,61	96,39	3	123
	verzögert / betreten	4	180,25	144,086	72,043	-49,02	409,52	15	301
	Total	32	96,88	101,850	18,005	60,15	133,60	3	301

a. Zeit bis Retest [h] = 72,0

Test of Homogeneity of Variance^a

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	,190	3	28	,902
Zeit auf Plattform Retest [sec]	13,507	3	28	,000

a. Zeit bis Retest [h] = 72,0

ANOVA^a

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Zeit auf Plattform Baseline [sec]	Between Groups	126,819	3	42,273	,641	,595
	Within Groups	1846,900	28	65,961		
	Total	1973,719	31			
Zeit auf Plattform Retest [sec]	Between Groups	109278,2	3	36426,078	4,804	,008
	Within Groups	212295,3	28	7581,974		
	Total	321573,5	31			

a. Zeit bis Retest [h] = 72,0

Research report

Potentiated amygdaloid auditory-evoked potentials and freezing behavior after fear conditioning in mice

Jianrong Tang, Carsten T. Wotjak, Stefanie Wagner, Greg Williams, Melitta Schachner*, Alexander Dityatev

Zentrum für Molekulare Neurobiologie, Universität Hamburg, Martinistr. 52, D-20246 Hamburg, Germany

Accepted 17 August 2001

Abstract

Elucidation of cellular and molecular mechanisms underlying fear-related memory would greatly benefit from the possibility of combined behavioral and electrophysiological recordings in genetically modified mice. As a first step to this goal, we implanted adult C57BL/6J mice with recording electrodes aimed at the basolateral amygdaloid complex and trained them in an auditory fear conditioning paradigm. After conditioning, animals with paired tone and footshock presentation showed not only intensified freezing behavior lasting for 2 days, but also increases, lasting 4 days, in slope and amplitude of the most negative component of auditory-evoked potentials triggered by the conditioned stimulus. These effects could not be observed in animals with unpaired tone and footshock presentation. Thus, our data show that a long-lasting association of a former neutral tone with an aversive situation is accompanied by a long-lasting increase of auditory-evoked potentials in freely moving mice. However, extinction of the potentiation of auditory-evoked potentials and freezing behavior followed different time courses, thus making a direct relationship between these responses unlikely. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Theme: Neural basis of behavior

Topic: Learning and memory: physiology

Keywords: Amygdala; In vivo electrophysiology; Learning; Memory

1. Introduction

Fear conditioning has recently emerged as a leading paradigm to characterize changes in synaptic efficacy underlying learning and memory [5,6,21,29]. In this form of aversive learning, subjects associate a conditioned stimulus (CS), such as a tone, with an aversive unconditioned stimulus (US), often an electric footshock. The successful association between CS and US is commonly assessed by measuring freezing or the startle responses

[13], though other studies have used physiological measures such as changes in heart rate [30]. Lesion and pharmacological studies suggest the basolateral amygdaloid complex (BLAC), consisting of the lateral, basolateral and basomedial nuclei, to play an important role for acquisition and memory recall in a fear conditioning paradigm with a tone as CS [18,21,26,27]. Information about the auditory stimulus is relayed via brain stem nuclei to the magnocellular medial geniculate nucleus (MGm)/posterior intralaminar nucleus (PIN) complex. From there it reaches the BLAC via two alternative routes, either directly from the MGm/PIN or via the auditory cortex. Auditory information converges with somatosensory information about the footshock at the level of the MGm/PIN as well as within the BLAC [8,27]. Presentation of tones results in an activation of neurons within the BLAC that can be measured in vivo as evoked field potentials [24,25]. These auditory-evoked potentials (AEPs) are potentiated by prior high-frequency stimulation

Abbreviations: AEP, auditory-evoked potential; BLAC, basolateral amygdaloid complex; CS, conditioned stimulus (tone); LTP, long-term potentiation; MGm, magnocellular medial geniculate nucleus; PIN, posterior intralaminar nucleus; US, unconditioned stimulus (footshock)

*Corresponding author. Tel.: +49-40-42803-6246; fax: +49-40-42803-6248.

E-mail address: melitta.schachner@zmn.uni-hamburg.de (M. Schachner).

of the thalamo-amygdaloid pathway [25], a procedure which leads to the long-term potentiation (LTP) of synaptic transmission. Intriguingly, a comparable increase in AEPs could be observed following fear conditioning [26]. Together with the ability of pharmacological treatments or genetical manipulations to interfere with both LTP and the consolidation of fear conditioning [6,12,18,28], these findings are consistent with a role for amygdaloid LTP in fear learning/memory. However, a coincidence between changes in electrophysiological and behavioral parameters as reported recently [26] does not prove the existence of a causal relationship between them. Moreover, the nature of the potentiated AEPs is not entirely clear, as changes in neuronal activity following classical conditioning have been observed before not only within the BLAC, but also the MGm/PIN and the auditory cortex [10,20,31]. The study of the sides and the mode of AEP potentiation would greatly benefit from the use of genetically modified mice, which are altered in a locally restricted manner in the expression of particular molecules [22]. Such studies would also facilitate investigation of the mechanisms of memory extinction (extinction learning) and anxiety generalization, and relate to problems of high importance for patients with anxiety disorders. As a first step towards this goal, we established electrophysiological recordings in the BLAC of freely moving C57BL/6J mice, one of the strains most commonly used to inbreed genetically modified mice. We measured acquisition, retention and extinction of AEPs and freezing behavior to estimate how closely intracerebral processes underlying these two parameters are interrelated.

2. Experimental procedures

All surgical and behavioral procedures were approved by the Committee on Animal Health and Care of the local governmental body.

2.1. Animals and surgery

Experiments were carried out on 30 male adult C57BL/6J mice (3–4 months old). Animals were derived from the breeding stock of the University Hospital Eppendorf. They were housed individually with ad libitum food and water on an inverse 12:12 h light/dark cycle (lights on at 19:00 h) under controlled temperature conditions. For placement of the electrodes, mice were anesthetized with pentobarbital (Nembutal, 85 mg/kg, i.p.) and placed in a stereotaxic frame. A recording electrode was implanted under aseptic surgical conditions in the right BLAC according to the atlas of Franklin and Paxinos [14] (1.94 mm posterior from bregma, 3.15 mm lateral from midline, 4.20 mm beneath the surface of the skull). The electrode was made from a single Teflon-coated tungsten wire (bare diameter 76 μm) placed inside a stainless steel microtube (310 μm in outer

diameter), which was used as a reference. The distance between the tip of the wire and the end of the microtube was in the range of 0.1–0.2 mm. A silver sphere was placed on the surface of the frontal cortex and served as a ground. The electrodes were soldered to a miniature female socket and fixed to the surface of the skull by bone cement containing gentamicin as antibiotic (Merck, Darmstadt, Germany). To further characterize the nature of the first component of the AEPs, two mice were implanted with tungsten wire (76 μm) in the neck muscles for measuring electrical activity during startle responses.

2.2. Recording and analysis of auditory-evoked potentials

Mice were allowed to recover from surgery for at least 2 weeks before starting the experiment. The week before the beginning of recordings, each animal was handled for 3 min and habituated to the recording chamber for 30 min every day. All recordings and conditioning were performed in the same mouse conditioning chamber with the bottom formed by a metal grid consisting of 19 stainless-steel rods of 3.5 mm in diameter, that was placed into a sound-attenuated isolation cubicle (both from MED Associates, St. Albans, USA). A video camera mounted into the cubicle allowed the observation of animals' behavior throughout the entire experiment. The conditioning chamber was cleaned thoroughly with 70% ethanol 15 min before inserting the animals.

On the days of experiment, mice were habituated to the recording chamber for 15 min. Thereafter, they were slightly sedated with halothane for 3–5 s to connect the implanted electrode assembly to the recording hardware. Sedation was necessary to reduce stress levels and to prevent displacement and destruction of the electrode assembly due to the struggling of the animals. The electrode assembly was attached via double male connector to female connector with a miniature FET preamplifier mounted on it [9]. The preamplifier was connected to a Grass P55 amplifier via very thin wires (Oticon, Hellerup, Denmark), which were slightly pulled up by a flexible ribbon, to allow unrestricted movements while preventing destruction of the wires. Signals were amplified at a gain of 1000 and filtered between 0.1 Hz and 3 kHz. An ADC-42 analog-digital converter (Pico, Germany) and LTP101M software [2] (www.ltp-program.com) were used for control of acoustic stimulation and data acquisition. Mice had been kept in the chamber for an additional 30 min before the first acoustic stimulus to allow complete recovery from sedation. For acoustic stimulation, a 20-s series of 50-ms clicks with a leading frequency of 1 kHz was delivered at 1 Hz. A total of five series at 3-min intervals were presented per experimental day. The onset of each tone triggered the acquisition of AEPs. The resulting 100 AEPs per day (five trains of 20 tones) were averaged off-line to yield a mean AEP for that day.

Averaged AEPs were quantitatively analyzed by measuring the latencies, amplitudes and slopes of four negative-going components occurring between 8 and 60 ms after the onset of the tone stimulus. The amplitude was measured as a difference between the maximal and minimal values of a component. To estimate the slope, a linear regression analysis was performed in the range of amplitudes between 20 and 80% of the peak value using a built-in SigmaPlot 5.0 function. To ensure that these potentials were directly related to the acoustic stimulus, their dependency on tone intensities was analyzed in selected animals. Mounting the loudspeaker directly onto the perforated wall of the conditioning chamber minimized heterogeneity of tone intensities, which might have resulted from variance in the position of the animals in relation to the sound source. The relatively small dimensions of the chamber (14×16×12 cm) and the absence of bedding ensured that the resulting variability of tone intensities was negligible. To test this, control recordings of AEPs (average of 100 sweeps) were performed in a mouse anesthetized by ketamine (50 mg/kg, i.p.). The body temperature of this animal was kept constant at $38.0\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ by means of a heating pad. For electrophysiological recordings, the mouse was placed so that the head was located in the middle of the chamber (facing the loudspeaker or turning aside at 90 or 180°) or in one of four corners. The coefficient of variation of the amplitude of AEPs was only 8%. If not stated otherwise, a test intensity of 82 dB (measured using a RO-1350 Digital Sound Level Meter, Roline, Taiwan, in the middle of the chamber, 2 cm above the floor) was used throughout the experiments.

2.3. Fear conditioning protocol

A total of 12 mice with clearly identifiable and stable AEPs were selected for fear conditioning. Each mouse selected underwent eight recording sessions (one session per day). After two sessions of baseline recordings, animals received the aversive unconditioned stimulus (50-Hz AC electric footshock, 0.18 mA, 500 ms) five times during each of the following 2 conditioning days. For this purpose, animals were randomly assigned to two groups for which the tone (CS) was either paired or unpaired with the footshock (US). The two groups were exposed to the same number of tones and shocks. The conditioning protocol ensured that the time interval between two consecutive tone series and footshocks, respectively, was the same for paired and unpaired procedures. Paired shocks were applied within 1 s after the last tone of each 20-tone series. Unpaired shocks, in contrast, were applied with a random interval of 1–2 min after the last tone. Retention and extinction of AEPs and behavior were measured on the 4 days following conditioning.

2.4. Behavior

Animals' behavior was videotaped over the entire

experiment and analyzed by a trained observer blind to the respective conditioning procedure for the tone episodes (i.e. for 100 s per session). The behavior shown on the 2 pre- and the 4 post-conditioning days was analyzed first in random order, followed by that shown on the 2 conditioning days. Freezing time served as a measure of fear-related memory. Commonly, freezing is considered as immobility time, i.e. the time animals remain motionless except for breathing-related movements. However, this definition may not be precise, depending on the experimental protocol [16]. In the present study, requirements of AEP measurements (i.e. a 30-min recovery period after connecting the animals to the recording device, measurement of stable baseline responses and repeated tone presentations per day) led to extensive habituation of the animals to the recording/conditioning chamber. Mice from both groups, therefore, spent most time before tone presentation as well as in between two tone series at rest. In this relaxed state, animals rested on their legs and showed a ball-shaped body posture with the tail laid around the body and the head mostly in a vertical position (Fig. 4A). Consequently, for definition of freezing time other parameters had to be included in addition to motionless body postures to unequivocally dissociate freezing and resting responses. These parameters, indicative of a tensed state, included horizontal positioning of the head, stretched and flattened position of the body and stiffening of the tail (Fig. 4B). To better discriminate between freezing and resting, behavioral analysis was performed before, during and after each tone series with particular emphasis on the transitions between the three experimental phases.

Locomotion is accompanied by changes in brain temperature, which, in turn, affect electrical activity in the brain [1]. Hence, to estimate whether differences in locomotion between conditioned and control animals accounted for differences in AEPs, we additionally calculated the total immobility time as the sum of freezing and resting time.

2.5. Histological examination

After completion of experiments, mice were deeply anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg) and an anodal current (200 μA , 10 s) was passed through the tungsten wire for easier identification of electrode placements as sites of electrolytic lesion. Animals were killed by an overdose of halothane and their brains were removed. Frozen 20 μm coronal sections were cut with a cryocut (Leica, Germany) and stained with 0.1% toluidine blue to verify the exact placement of the electrode. Light-microscopic histological evaluation revealed that the electrodes of all analyzed animals with stable AEPs were located within the BLAC.

2.6. Statistics

For statistical analyses, slopes and amplitudes of AEPs

were expressed as a percentage of mean baseline values measured in the two pre-conditioning sessions. Freezing data are presented as freezing time normalized to the total duration of the tone presentation per session. Electrophysiological and behavioral data were analyzed by two-way ANOVA for repeated measurements with ‘Conditioning protocol’ (paired or unpaired CS/US presentation) as between-subjects factor and experimental ‘Day’ as within-subject factor.

3. Results

Auditory stimulation evoked potentials whose amplitudes clearly depended on the intensity of the tone (Fig. 1A). AEPs consisted typically of four components: P1-N1, P2-N2, P3-N3 and P4-N4 with mean negative-peak latency \pm S.E.M. of 10.7 ± 0.4 , 15.9 ± 0.4 , 24.5 ± 0.7 and 55.1 ± 2.7 ms, respectively ($n=12$; Fig. 1B). Component P3-N3 was the most negative and most stable from trial to trial throughout all experiments (Fig. 1C). The three other components were far less stable in shape and occurrence, which hampered their statistical analysis. For some animals and some sessions, there was an extra inflection between peaks N3 and P4, which, however, was not reproducible either in occurrence or in latency. Presentation of the tone occasionally triggers a startle response [13] that might interfere with recordings from the BLAC, due to the small size of the animals. Indeed, electromyograms recorded from neck muscles showed a sharp peak with the same latency as component P1-N1 (Fig. 1D). Thus, only P1-N1, but not other components, could be a derivative of the startle response of the neck muscles.

Fig. 2 shows effects of fear conditioning on the AEPs recorded in two mice before, during and after paired or unpaired CS/US presentation. Conditioning did not change the overall shape of the AEPs in animals with paired or unpaired CS/US presentation. However, after conditioning slopes and amplitudes of the most negative component P3-N3 were increased in the conditioned but not in the control mice.

Quantification of the responses (Fig. 3) confirmed the unchanged slopes and amplitudes for each of the four components in each group during the two pre-conditioning sessions. After conditioning, slopes and amplitudes of component P3-N3 were significantly increased in conditioned mice ($n=6$) in comparison to control animals ($n=6$). A significant effect of factor ‘Conditioning protocol’ as well as a significant ‘Conditioning protocol’ \times ‘Day’ interaction could be observed for each of the two parameters (Table 1). Differences between paired and control groups were statistically significant for the 2nd, 3rd and 4th post-conditioning days. Difference between paired and control groups was not related to the magnitude of AEPs before conditioning ($P > 0.2$, three-way covariance analysis with absolute values of amplitude or slope of P3-N3

component as a covariant and the two other factors as above; statistics not shown). Slopes and amplitudes of component P3-N3 were significantly higher than pre-conditioning values on the 2nd conditioning as well as the 2nd and 3rd post-conditioning days. In control animals, there were no significant changes detectable in the P3-N3 component over the entire experiment with the exception of changes in slopes on the 3rd post-conditioning day, when a significant depression of this parameter could be observed. Amplitudes and slopes of the three other negative components (P1-N1, P2-N2 and P4-N4) were increased for some animals of each group with no statistically significant differences between them (Fig. 3; Table 1).

The consequences of conditioning on fear-related behavior were evaluated by measuring freezing time during CS presentation (Fig. 4C). Before conditioning, there was no significant difference in the freezing time between animals with paired and unpaired CS/US presentation. During and after conditioning, however, animals with pairing of CS/US showed more freezing behavior compared to controls and pre-conditioning values (Table 1). To estimate the influence of locomotion on AEPs, we measured the total immobility time during the tone presentations. The immobility of control mice remained unchanged throughout the entire experiment (Fig. 4D). In animals with paired CS/US presentation, in contrast, immobility time was increased after conditioning and significantly different from that of controls on the 1st conditioning and the 2nd and 4th post-conditioning days (Fig. 4D, Table 1). With the exception of the 4th post-conditioning day, this increase in immobility time parallels changes in freezing behavior.

Comparing the behavioral and electrophysiological profiles, we found several differences. On the first post-conditioning days, animals with paired CS/US presentation showed more freezing than controls, whereas there was no difference between groups in terms of amplitude or slope of AEPs. On the 3rd and 4th post-conditioning days, the animals from both groups showed no more freezing response. However, AEPs were still significantly potentiated in animals with paired CS/US presentation.

4. Discussion

Acoustically evoked potentials typically consisted of four components. The first component coincided with the peak of electrical activity recorded in the neck muscles and thus most likely reflects the startle response. It was potentiated in both groups particularly during conditioning, a phenomenon known as fear-potentiated startle. The nature of component P2-N2 is less clear. It likely represents processes not relevant to BLAC, since AEPs recorded in another batch of animals lack this second component if the reference electrode was placed on the frontal cortex (Tang and Dityatev, unpublished observa-

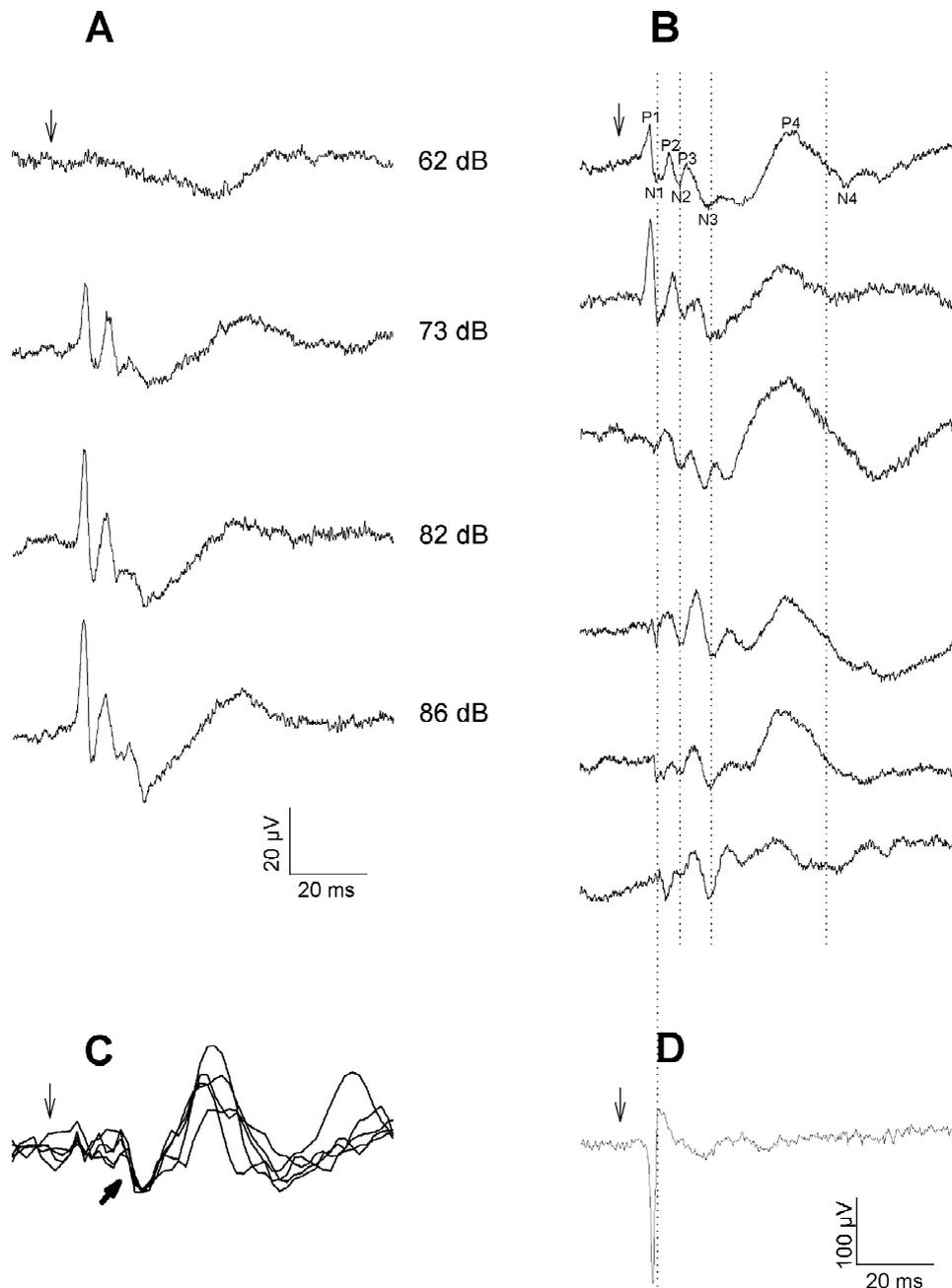


Fig. 1. Examples of auditory-evoked potentials recorded in the basolateral amygdaloid complex of freely moving mice. (A) The amplitude of evoked potentials increases with increasing intensity of the acoustic stimulus. The thin arrow here and in all other panels indicates the beginning of the tone. Each sweep is an average of 100 AEPs. The scale bars shown in A are valid for A, B and C. Sound intensities are shown on the right side of each sweep. (B) Recordings of evoked potentials in six mice 1 day before conditioning (session 2). Note that there are no a priori differences between animals assigned to paired or unpaired CS/US presentation during conditioning (three upper and three lower traces, respectively). Several positive (Px) and negative (Nx) peaks can be distinguished. Dotted vertical lines indicate mean latencies of negative peaks. Each sweep is an average of 100 AEPs. Sound intensity in B–D was 82 dB. (C) Stability of the most negative component of AEPs during one recording session. Each sweep is an average of 20 AEPs acquired during one tone series. Bold arrow indicates component P3–N3. Sweeps were additionally smoothed to facilitate visual inspection of overlapping curves. (D) Recordings of electrical activity in neck muscles in response to the tone presentation in an unconditioned mouse, indicating the occurrence of startle reaction in this animal. The trace represents an average of 100 sweeps. Note that the latency of the negative peak is the same as for the peak of the first component of AEPs.

tion). Component P3–N3 was usually the most negative and the most stable upon repeated tone presentation. Remarkably, of all four components only the third showed

consistently long-term enhancement after conditioning. Recent studies reported a similar potentiation of the most negative component in conditioned rats [26]. Differences

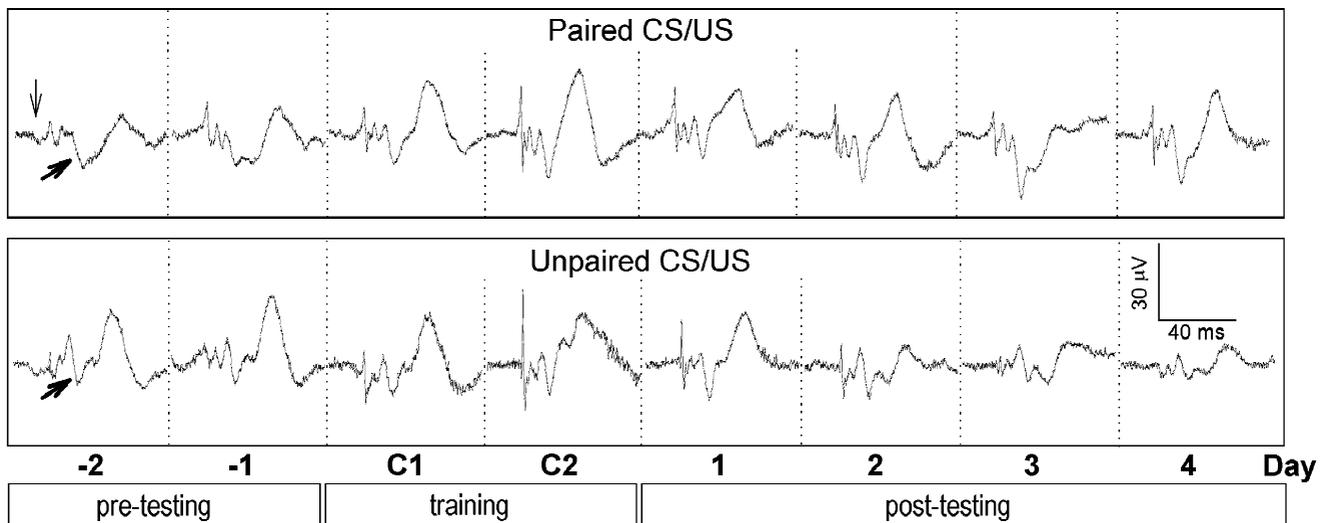


Fig. 2. Fear conditioning increases auditory-evoked potentials in the basolateral amygdaloid complex. Representative examples of AEPs recorded from a conditioned mouse (top) and a control mouse (bottom) before (-2, -1), during (C1, C2) and after fear conditioning (1–4). The downward thin arrow marks the onset of the tone presentation and the bold arrow indicates component P3-N3. Each sweep represents the average of 100 AEPs.

in latencies and shape of the AEPs between the studies might be species-related or caused by differences in the recording procedure. Particularly, the dependence of latency on the position of the electrode in the BLAC [22] could be relevant. Component P4-N4, finally, was unstable both in magnitude and shape. Moreover, it had a three times longer latency than the amygdaloid responses recorded in rats. This makes it unlikely to represent projections from the MGm/PIN and the auditory cortex, respectively.

Notably, animals with paired or unpaired CS/US presentation did not differ in component P3-N3 on the day after conditioning. This most likely reflects unspecific stress effects as recently described for rats [15]. Influences of contextual conditioning can be excluded, because control animals failed to develop an intensified freezing response, probably due to latent inhibition to the context. Unpaired CS/US presentation was frequently used as a control in other electrophysiological studies [4,26]. Interestingly, in guinea pigs unpairing of tone and footshock caused auditory sensitization, which was characterized by an increased neuronal activity in response to tone presentations irrespective of the exact frequency of the tone. After CS/US pairing, in contrast, an increased neuronal activity could be observed specifically for the frequency of the CS [3,4]. It remains to be shown whether auditory sensitization was responsible for the similarity in the AEP response shown on the day after conditioning in our experiments. From the 2nd post-conditioning day on, however, data from control mice clearly demonstrate that the potentiation of AEPs in animals with CS/US pairing is not simply the result of such a sensitization phenomenon. In fact, in animals with unpaired CS/US presentation we observed a depression of AEPs 2–4 days after condition-

ing. A similar reduction has been seen previously in rats treated in a similar way [26]. This depression cannot be explained simply by changes in the activity of the animals over the course of the experiment. Moreover, it is unlikely that it simply represents a habituation phenomenon, because AEPs were remarkably stable in either group before conditioning. It is tempting to speculate that the depression rather reflects changes in synaptic transmission caused by the unpaired CS/US presentation during which animals learn that the tone has no predictive value for the footshock (learned irrelevance).

The mechanisms leading to a potentiation of AEPs in the amygdala after CS/US pairing are still a matter of discussion. Some authors favored functional changes in synaptic contacts between thalamic and amygdaloid neurons similar to those observed after induction of LTP [11,17,18,26]. Others, in contrast, assigned those changes predominantly to mechanisms 'upstream' of the BLAC [7]. Electrophysiological studies in guinea pigs and rabbits, for instance, indicate that plastic changes in neuronal activity can occur already in the MGm/PIN and the auditory cortex following classical conditioning [10,19,31]. A critical involvement of the auditory cortex or MGm/PIN, however, does not necessarily preclude a significant contribution of the BLAC. Two recent reports showed that BLAC is essential to the development of plasticity in the auditory thalamus during fear conditioning [19,23].

In principle, there are also explanations for the potentiation of AEPs after CS/US pairing other than changes in synaptic plasticity in auditory circuits. First, the potentiation of AEPs could simply reflect differences in the perception of the tone signals due to differences in body posture and thus location of the ears with respect to the loudspeaker. Second, differences in AEPs could reflect

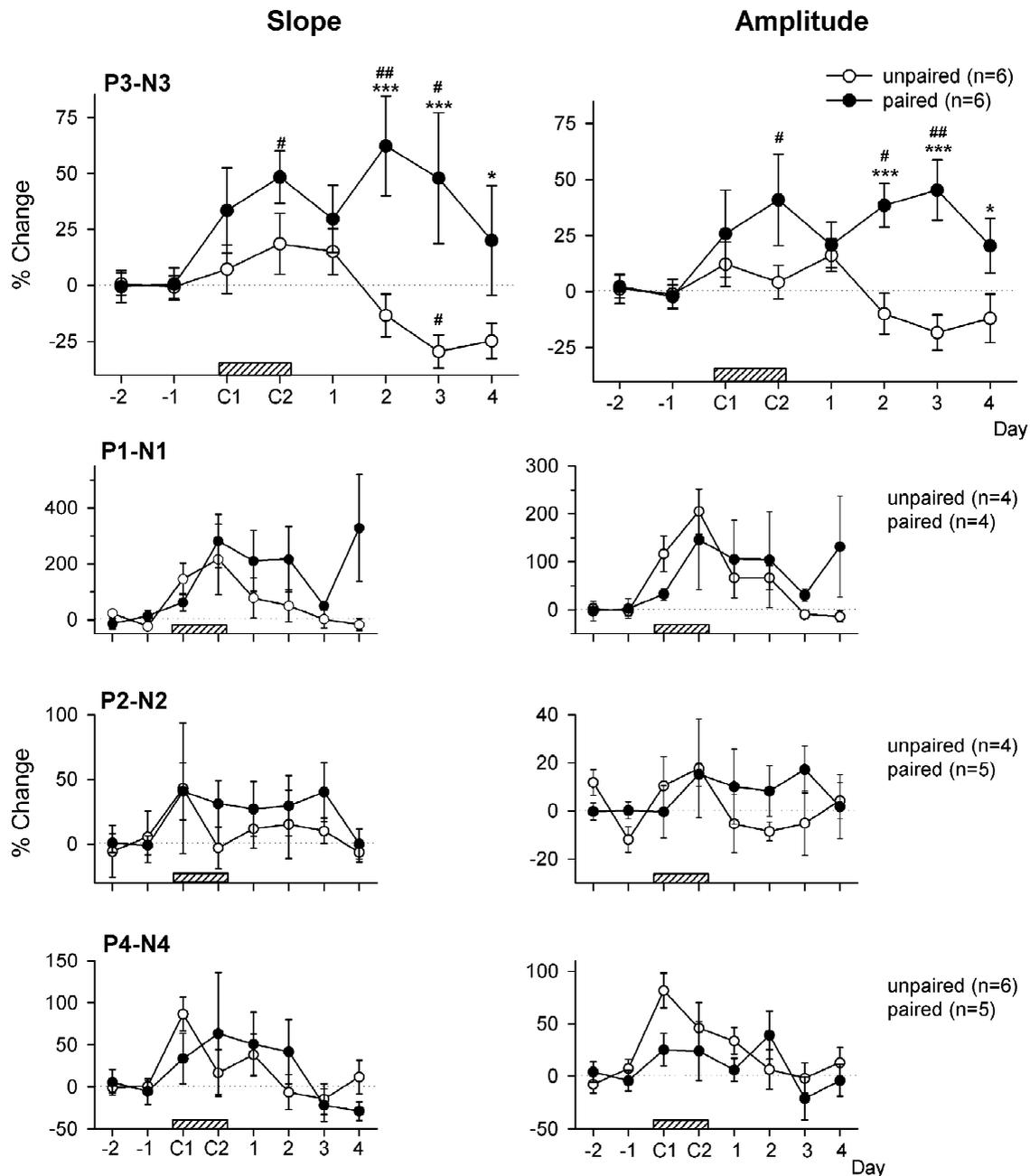


Fig. 3. Fear conditioning selectively potentiates component P3-N3 of auditory-evoked potentials. Effects of fear conditioning (hatched bar, C1+C2) on slopes and amplitudes of components P1-N1, P2-N2, P3-N3 and P4-N4. Slopes and amplitudes are normalized as a percentage of the mean values of the two pre-conditioning sessions (dotted line). Data of animals with paired ($n=6$) and unpaired ($n=6$) CS/US presentation are expressed as mean \pm S.E.M. Note that slopes and amplitudes for component P3-N3 increased significantly for the paired and decreased for the unpaired group after conditioning. Results of statistical analyses are shown for component P3-N3 only. For the three other components, there were no significant differences between the groups. In some cases, these components could not be analyzed due to instabilities in their shapes or to lack of occurrence. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ versus controls (two-way ANOVA followed by Fisher's L.S.D.), # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ versus pre-conditioning values (one-way ANOVA followed by Fisher's L.S.D.).

differences in attention and the state of arousal between the two experimental groups. Both explanations clearly have to refer to the fact that animals successfully formed an association between CS and US. However, they would preclude the usage of AEP measurements as a tool for studying cellular mechanisms of learning and memory. We

believe that synaptic plasticity plays a dominant role in the potentiation of AEPs observed, whereas the influence of head position/orientation and arousal is of minor importance: positional effects can be neglected since the AEPs recorded in the same animal positioned or oriented differently with respect to the loudspeaker were similar. If

Table 1
ANOVA reports

A: Between groups			
Component	Parameter	Factor 'Conditioning'	'Conditioning' × 'Day'
P1-N1	% Slope	$F(1,7)=0.768$; NS	$F(7,49)=1.37$; NS
	% Amplitude	$F(1,7)=0.761$; NS	$F(7,49)=2.98$; $P=0.010$
P2-N2	% Slope	$F(1,7)=0.469$; NS	$F(7,49)=0.277$; NS
	% Amplitude	$F(1,7)=0.501$; NS	$F(7,49)=1.08$; NS
P3-N3	% Slope	$F(1,10)=6.36$; $P=0.030$	$F(7,70)=2.93$; $P=0.009$
	% Amplitude	$F(1,10)=8.95$; $P=0.013$	$F(7,70)=2.78$; $P=0.013$
P4-N4		Insufficient data	
Behaviour	Freezing time	$F(1,9)=109.1$; $P<0.0001$	$F(7,63)=4.84$; $P<0.001$
	Immobility time	$F(1,9)=4.22$; NS	$F(7,63)=2.41$; $P=0.029$
B: Within groups			
Component	Conditioning protocol	Parameter	Factor 'Day'
P3-N3	Paired	% Slope	$F(7,35)=2.34$; $P=0.045$
		% Amplitude	$F(7,35)=3.36$; $P=0.007$
	Unpaired	% Slope	$F(7,35)=2.45$; $P=0.037$
		% Amplitude	$F(7,35)=1.80$; NS
Behavior	Paired	Freezing time	$F(7,28)=6.62$; $P<0.001$
		Immobility time	$F(7,28)=6.56$; $P<0.001$
	Unpaired	Freezing time	$F(7,35)=3.78$; $P=0.003$
		Immobility time	$F(7,35)=0.99$; NS

Statistical analysis of the influence of the conditioning protocols on the four components of the AEPs as well as on animals' behavior. Electrophysiological and behavioral parameters had been measured on 8 consecutive days with 2 pre-conditioning, 2 conditioning and 4 post-conditioning days. Data obtained from animals with paired or unpaired CS/US presentation were compared by two-way ANOVA ('Conditioning protocol' × 'Day') for repeated measurements of the second factor (A). Changes to pre-conditioning values were analyzed by one-way ANOVA for repeated measurements ('Day') separately per group (B). In some cases, components P1-N1, P2-N2 and P4-N4 could not be analyzed due to instabilities in their shape or to lack of occurrence. Behavioral data of one animal with paired CS/US presentation are missing for the 2nd post-conditioning day because of accidental damage of the videotape.

arousal played an important role, it is difficult to understand why the component P3-N3 but not components P1-N1 and P4-N4 was significantly different between the two groups, although all three components reflect brain activity to a similar extent.

The question remains as to the physiological significance of the changes in AEPs. Because of an apparent coincidence between the potentiation of AEPs and changes in the behavioral performance in rats, some authors discuss it as a cellular correlate for the learned association between tone and footshock [11,18,26]. In the present study, animals showed an increased freezing response during and after CS/US pairing that is indicative of a successful association between tone and footshock. Apparent dissociation between changes in the freezing response and those in AEPs could be explained by several reasons. First, activation of neurons in the LA does not directly activate effector systems, but stimulates intra-amygdaloid circuits and finally the central nucleus of the amygdala as an integration center for behavioral, autonomic and hormonal fear responses [17]. Second, the freezing response depends not only on the intensity of the association between tone and footshock, but also on the basal emotionality of the animals, which might differ among individual animals.

Third, repeated exposure to the CS after conditioning may cause overlapping effects of different memory processes, such as consolidation of the association between tone and footshock, on the one hand, and extinction of this association, on the other. Finally, the relationship between freezing time and AEP could be a complex non-linear (e.g. sigmoid or step-like) function, with a transition phase depending on the sensitivity of a particular animal to shock and acoustic stimulus intensities. At this stage one has to ask whether the appropriate parameters of acquired fear-related behavior have been analyzed, particularly since the classification of freezing behavior employed in the present study has so far not been used as a general criterion. As stated before, the sole measurement of immobility with exception of breathing-related movements was not sufficient in our case and possibly other cases also. Because of the extensive habituation to the recording environment, animals quickly acquired a resting position. Thus, additional parameters had to be used to unequivocally dissociate freezing (anxiety-related behavior) from relaxed states of immobility (i.e. resting). It would be of interest to know whether the electrophysiological parameters are more closely related to other amygdala-dependent fear responses such as changes in autonomous functions [30]. It remains

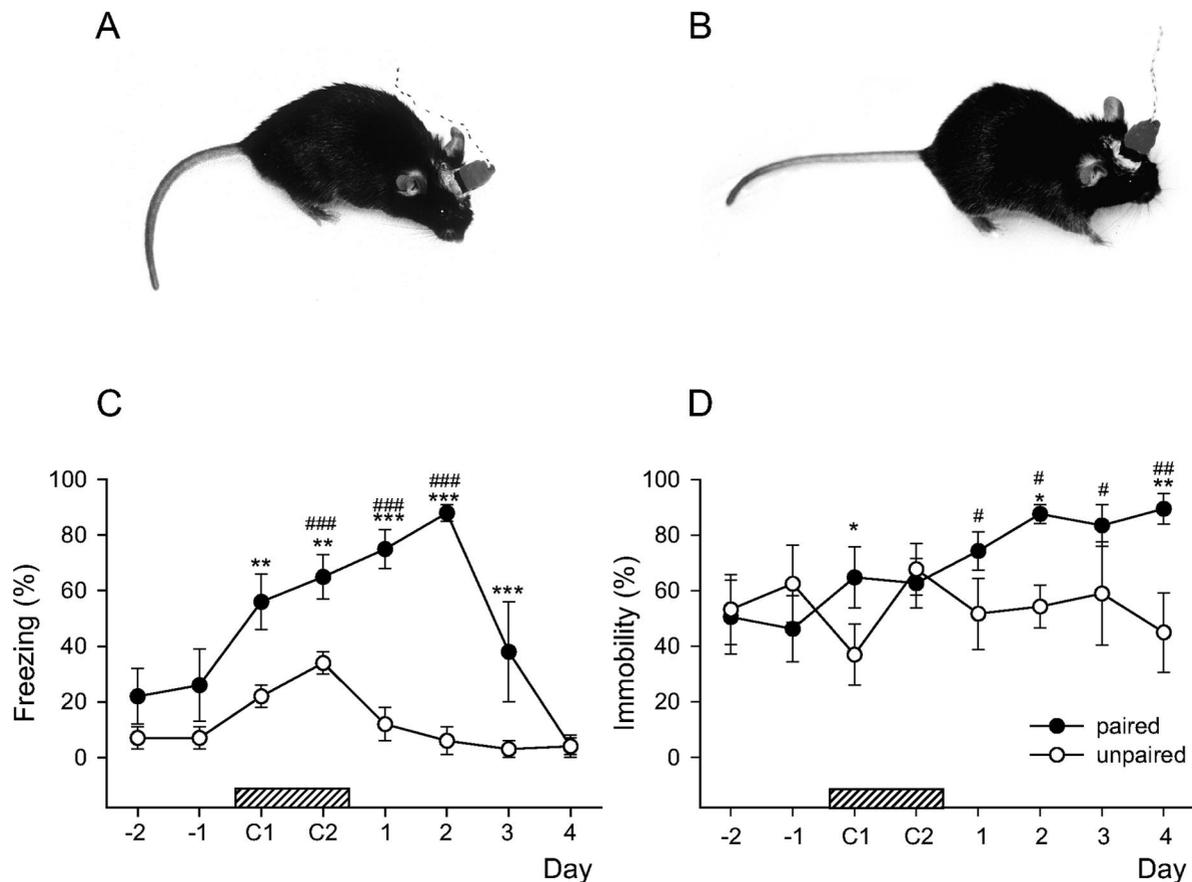


Fig. 4. Increased freezing response after fear conditioning. Freezing (B) was defined as the behavioral state during which the animals were motionless except for breathing-related movements and acquired a tensed body posture, which was characterized by horizontal positioning of the head, stretched position of the body and stiffening of the tail. Resting (A) was defined as the behavioral state during which the animals were motionless except for breathing-related movements and acquired a relaxed body posture, which was characterized by a ball-shaped posture with the animals resting on their legs with the tail around the body and the head mostly in a vertical position. For reasons of clarity, a white background was chosen for the photographs. Panels C and D demonstrate the effects of fear conditioning (hatched bar, C1+C2) on the time animals were freezing (C) or immobile (D) during the tone presentation on a given experimental day. Immobility was defined as the behavioral state during which the animals were motionless except for breathing-related movements, i.e. sum of the resting and freezing time. Data (mean \pm S.E.M.) were normalized to the total duration of tone presentations per experimental day. Animals with paired CS/US presentation showed an increased freezing response during and after fear conditioning compared to both pre-conditioning values and data obtained from animals with unpaired CS/US presentation. Animals of the two groups differed also in their immobility time. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, paired versus control mice (two-way ANOVA followed by Fisher's L.S.D.); # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$, post- versus pre-conditioning values (one-way ANOVA followed by Fisher's L.S.D.).

also to be seen whether the time-course of long-lasting potentiation of AEPs in other parts of the auditory system, including MGm/PIN and auditory cortex, matches changes in behavioral measurements.

Acknowledgements

We thank D. de Limoges for providing FET preamplifiers. This work was supported by a postdoctoral fellowship from the DAAD (J.T.) and the Volkswagenwerk-Stiftung (M.S. and C.T.W.).

References

- [1] P. Andersen, E.I. Moser, Brain temperature and hippocampal function, *Hippocampus* 5 (1995) 491–498.
- [2] W.W. Anderson, G.L. Collingridge, Data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and long-term depression, *Neurosci. Abstr.* 23 (1997) 665.
- [3] J.S. Bakin, N.M. Weinberger, Classical conditioning induces CS-specific receptive field plasticity in the auditory cortex of the guinea pig, *Brain Res.* 536 (1990) 271–286.
- [4] J.S. Bakin, B. Lapan, N.M. Weinberger, Sensitization induced receptive field plasticity in the auditory cortex is independent of CS-modality, *Brain Res.* 577 (1992) 226–235.
- [5] R. Bourchuladze, B. Fenguell, J. Blendy, D. Cioffi, G. Schutz, A.J. Silva, Deficient long-term memory in mice with a targeted

- mutation of the cAMP-responsive element-binding protein, *Cell* 79 (1994) 59–68.
- [6] R. Brambilla, N. Gnesutta, L. Minichiello, G. White, A.J. Roylance, C.E. Herron, M. Ramsey, D.P. Wolfer, V. Cestari, C. Rossi-Arnaud, S.G. Grant, P.F. Chapman, H.P. Lipp, E. Sturani, R. Klein, A role for the Ras signalling pathway in synaptic transmission and long-term memory, *Nature* 390 (1997) 281–286.
- [7] L. Cahill, N.M. Weinberger, B. Roozendaal, J.L. McGaugh, Is the amygdala a locus of ‘conditioned fear’? Some questions and caveats, *Neuron* 23 (1999) 227–228.
- [8] S.J. Cruikshank, J.M. Edeline, N.M. Weinberger, Stimulation at a site of auditory-somatosensory convergence in the medial geniculate nucleus is an effective unconditioned stimulus for fear conditioning, *Behav. Neurosci.* 106 (1992) 471–483.
- [9] S. Davis, T.V.P. Bliss, G. Dutrieux, S. Laroche, M.L. Errington, Induction and duration of long-term potentiation in the hippocampus of the freely moving mouse, *J. Neurosci. Methods* 75 (1997) 75–80.
- [10] J.M. Edeline, Learning-induced physiological plasticity in the thalamo-cortical sensory systems: a critical evaluation of receptive field plasticity, map changes and their potential mechanisms, *Prog. Neurobiol.* 57 (1999) 165–224.
- [11] M.S. Fanselow, J.E. LeDoux, Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala, *Neuron* 23 (1999) 229–232.
- [12] M.S. Fanselow, J.J. Kim, Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala, *Behav. Neurosci.* 108 (1994) 210–212.
- [13] M. Fendt, M.S. Fanselow, The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23 (1999) 743–760.
- [14] K.B.J. Franklin, G. Paxinos, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, London, 1997.
- [15] R. Garcia, J. Paquereau, R.M. Vouimba, R. Jaffard, Footshock stress but not contextual fear conditioning induces long-term enhancement of auditory-evoked potentials in the basolateral amygdala of the freely behaving rat, *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998) 457–463.
- [16] R. Gerlai, Contextual learning and cue association in fear conditioning in mice: a strain comparison and a lesion study, *Behav. Brain Res.* 95 (1998) 191–203.
- [17] J.E. LeDoux, Fear and the brain: where have we been, and where are we going?, *Biol. Psychiatry* 44 (1998) 1229–1238.
- [18] S. Maren, Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory, *Trends Neurosci.* 22 (1999) 561–567.
- [19] S. Maren, S.A. Yap, K.A. Goosens, The amygdala is essential for the development of neuronal plasticity in the medial geniculate nucleus during auditory fear conditioning in rats, *J. Neurosci.* 21 (2001) RC135.
- [20] M.D. McEchron, E.J. Green, R.W. Winters, T.G. Nolen, N. Schneiderman, P.M. McCabe, Changes of synaptic efficacy in the medial geniculate nucleus as a result of auditory classical conditioning, *J. Neurosci.* 16 (1996) 1273–1283.
- [21] M.G. McKernan, P. Shinnick-Gallagher, Fear conditioning induces a lasting potentiation of synaptic currents in vitro, *Nature* 390 (1997) 607–611.
- [22] M.R. Picciotto, K. Wickman, Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior, *Physiol. Rev.* 78 (1998) 1131–1163.
- [23] A. Poremba, M. Gabriel, Amygdalar efferents initiate auditory thalamic discriminative training-induced neuronal activity, *J. Neurosci.* 21 (2001) 270–278.
- [24] G.J. Quirk, C. Repa, J.E. LeDoux, Fear conditioning enhances short-latency auditory responses of lateral amygdala neurons: parallel recordings in the freely behaving rat, *Neuron* 15 (1995) 1029–1039.
- [25] M.T. Rogan, J.E. LeDoux, LTP is accompanied by commensurate enhancement of auditory-evoked responses in a fear conditioning circuit, *Neuron* 15 (1995) 127–136.
- [26] M.T. Rogan, U.V. Stäubli, J.E. LeDoux, Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala, *Nature* 390 (1997) 604–607.
- [27] L.M. Romanski, M.C. Clugnet, F. Bordi, J.E. LeDoux, Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala, *Behav. Neurosci.* 107 (1993) 444–450.
- [28] G.E. Schafe, N.V. Nadel, G.M. Sullivan, A. Harris, J.E. LeDoux, Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase, *Learn. Mem.* 6 (1999) 97–110.
- [29] C.F. Stevens, A million dollar question: does LTP=memory?, *Neuron* 20 (1998) 1–2.
- [30] O. Stiedl, J. Spiess, Effect of tone-dependent fear conditioning on heart rate and behavior of C57BL/6N mice, *Behav. Neurosci.* 111 (1997) 703–711.
- [31] N.M. Weinberger, Learning-induced receptive field plasticity in the primary auditory cortex, *Semin. Neurosci.* 9 (1997) 59–67.

Danksagung

Das Gelingen dieser Arbeit war nicht nur abhängig vom eigenen Fleiss und Ausdauer, sondern auch vom beruflichen und privaten Umfeld.

Auch wenn ich weiß, dass ich mit meinem Dank niemandem gerecht werde, am wenigsten denen, die unerwähnt bleiben, möchte ich mich dennoch bedanken bei:

Frau Prof. Schachner möchte ich herzlich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, in ihrem hervorragend ausgestatteten Institut zu arbeiten, danken.

Ebenso möchte ich allen Mitarbeitern dieses Instituts für die nette und hilfsbereite Atmosphäre danken. Ein besonderer Dank gilt hier Thomas Tilling, der mir nicht nur beim Erlernen der molekularbiologischen Methoden mit Rat und Tat zur Seite stand, sondern auch stets Diskussionspartner bei den Light Cycler Problemen war. Christoph Sanders möchte ich danken, weil ich von seinem enormen Wissen über verschiedene molekularbiologische Techniken und Tricks profitieren durfte. Bei Carsten Wotjak möchte ich mich für die kurze Zeit, in der er den verhaltensbiologischen Teil der Arbeit betreute, bedanken.

Großer Dank gilt auch den Verhaltensbiologen des Instituts Schachner, Anja Schrewe, Jörg Brandewiede und Fabio Morellini für die stete Diskussionsbereitschaft der Versuchsergebnisse und Kompromissbereitschaft bei der Belegung des Verhaltenslabors und des Tierraums.

Bastian Tiemann und Frank Willmann im Besonderen, aber auch allen anderen Mitarbeitern der Tierhaltung des UKE möchte ich für ihre Kooperationsbereitschaft danken.

Herrn Dr. Dimigen möchte ich nicht nur dafür danken, dass er für jedes Problem eines Wissenschaftlers eine Lösung parat hält, sondern auch für die freundschaftliche Beziehung, die hoffentlich meine Zeit in Hamburg überdauert.

Thomas Laue von der Artus GmbH in Hamburg möchte ich für die Etablierung der PCR für den Light Cycler und auch die späteren Diskussionen der aufgetauchten Light Cycler Problemen danken.

Weiterhin möchte ich der Arbeitsgemeinschaft Dr. Tillmann von der Medizinischen Hochschule Hannover danken, dass ich so freundlich in ihre Abteilung aufgenommen wurde und den Light Cycler nutzen durfte. Besonderer Dank gilt hier Torsten Kaiser, der zum einen sehr kooperativ bei der gemeinsamen Nutzung des Gerätes war und zum andern auch immer Zeit fand, um Fragen zu beantworten oder Probleme zu diskutieren.

Großer Dank gilt meiner jetzigen Chefin Prof. Gerardy-Schahn, die mir die Zeit zur Verfügung stellte, diese Arbeit in ihrem Institut abzuschließen.

Herrn Prof. Hackbarth danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und die Bereitschaft ein Gutachten zu erstellen.

Vom Graduierten-Kolleg 705 der Medizinischen Hochschule Hannover möchte ich besonders Frau PD Dr. Enss, Herrn Prof. Hedrich, Herrn Prof. Steinlechner und Robert Dallmann danken. Herr Prof. Hedrich und Frau Enss danke ich für die herzliche Aufnahme in das Kolleg. Herrn Prof. Steinlechner danke ich für die weitere Betreuung dieser Arbeit, ebenso wie für das Korrekturlesen. Robert Dallmann möchte ich für seine Verbesserungsvorschläge des Layouts und die anderen sichtbaren und unsichtbaren Hilfestellungen danken.

Ich möchte mich auch bei allen Freunden, die ich während meiner Zeit in Hamburg und auch während des Schreibens dieser Arbeit mit Sicherheit vernachlässigt habe, bedanken, dass sie so nachsichtig sind und mir nicht die Freundschaft „gekündigt“ haben.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei Jörg fürs „Rückenstärken“ bedanken. Durch seine Ermutigungen und sein Verständnis hat er mich auch in „Durststrecken“ zum Durchhalten motiviert.

Danke !!!!